

Title	マウスSRF遺伝子；ゲノム構造・発現調節及びCArGboxを介した転写制御機構
Author(s)	小山, 徹
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42653
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	小 山 徹 こ やま とおる
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 5 5 9 8 号
学位授与年月日	平成12年4月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	マウス SRF 遺伝子；ゲノム構造・発現調節及び CArG box を介した転写制御機構
論文審査委員	(主査) 教授 荻原 俊男 (副査) 教授 島田 和典 教授 木下タロウ 教授 岡部 勝

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

Serum response factor (SRF) は細胞の成長や分化に関与する数多くの遺伝子を制御する転写活性化因子群 MADS box family の一つであり、10塩基からなる CArG box 配列 (CC (A/T)₆GG) の DNA に結合する。CArG box 配列は主に2種類の遺伝子群の転写調節領域に見られた。ひとつは c-fos 遺伝子等の血清及び成長因子や他の細胞外の刺激に急速に反応する多くの遺伝子群、immediate early genes に存在する。もう一つは筋肉特異的に発現する多くの遺伝子 (アクチン、ミオシン軽鎖、ジストロフィン遺伝子) の上流プロモーター部位と第一イントロン内部に複数繰り返し存在し、筋肉系特異的遺伝子の発現に必須であることが知られている。SRF 遺伝子のノックアウトマウスは中胚葉の形成が起こらず、胎生12.5日までに死滅することが報告されていることなどから、多くの筋肉系組織が由来する中胚葉の形成に SRF-CArG box 配列転写制御システムが必須であることを示している。これらのことから、SRF-CArG box 配列の転写過程はシグナル伝達・発生分化における遺伝子制御を理解する上で特徴的なシステムの一つと考えられた。本研究では SRF の発生・分化における役割を調べる事を目的として、マウス SRF 遺伝子を単離・解析し、この遺伝子自体の発現調節領域を決定し、その発現分布及び転写調節制御について調べた。

[方法ならびに成績]

1. マウス SRF 遺伝子の単離

マウス筋肉系細胞 C2C12細胞から RT-PCR 法でマウス SRF の cDNA をクローニングし、これをプローブとして約15kbのマウスゲノム DNA のクローンを得た。マウス SRF 遺伝子は約8kbで、7エクソンから構成されており、約2.3kbの3'UTRを持っていることがわかった。蛋白質はヒト SRF より4アミノ酸短い504アミノ酸からなり、98%の相同性を保っていた。

2. マウス SRF 遺伝子の遺伝子発現調節領域の解析

マウス SRF 遺伝子の上流領域を5'側から順次欠失させたものを培養細胞に導入して、その転写活性を検討した。その結果、-281bp から-279bp の領域を欠失させると約1.5倍のプロモーター活性の上昇がみられたが、-279bp から-185bp の領域を失うと、プロモーター活性が約9分の1に低下した。また、-281~-202bp の領域のみを他の発現ベクターの5'領域に挿入すると、約5倍の高いプロモーター活性を示した。この転写活性は C2C12細胞において、

非筋肉系細胞と比較して強い活性が認められた。-281~-202bp の領域に結合する核内因子を同定するため、C2C12 細胞の核抽出液を用いてゲルシフト法を行った。非特異的な因子の結合を除き、この領域には少なくとも 5 種類の核内因子が結合する可能性があることがわかったが、既知の転写因子の結合とは一致しなかった。

3. マウス SRF の発現分布

マウスの各種細胞及び組織での SRFmRNA の発現分布を RT-PCR 法で調べた。その結果、全エクソンが転写された産物 (SRF-A) 以外に選択的スプライシングで形成されたと考えられるエクソン 5 を持たない構造 (SRF-B) が存在することがわかった。SRF-A と SRF-B の量比を RT-PCR 法と RNase Protection Assay 法で仔細に検討したところ、A は多くの組織で一様に発現していたが、B は血管平滑筋、骨格筋、心房、心室で多く発現していた。心臓では、胎生後期・成体ともに多く発現していた。また、この B は C2C12 細胞においては myoblast から myotube への分化に伴い増加した。P19 細胞と ES 細胞の *in vitro* 心発生分化系において、未分化の状態と比較して拍動コロニー形成後では B の発現量の増加が認められた。

4. SRF-A 及び SRF-B の CArG box を介する遺伝子転写活性への影響

エクソン 5 は長さ 192bp で正確に 64 アミノ酸をコードしており、このエクソンを持たない mRNA から翻訳された SRF-B においても、エクソン 6-7 にコードされている領域のアミノ酸配列にはエクソン 5 を持つ mRNA から翻訳された SRF-A と相違はないと考えられた。CArG box を含む *c-fos* 遺伝子・心筋 α -アクチンのプロモーターからルシフェラーゼを発現するレポーターと、SRF-A 及び-B の全コード領域を発現ベクターに挿入したエフェクターを作製した。このレポーターとエフェクターを培養細胞に同時に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。SRF-A はレポーターからの転写活性を増加させるのに対し、SRF-B にはその作用はみられなかった。この傾向は *c-fos* 及び心筋 α -アクチン遺伝子の両レポーターで同様の結果であった。

[総括]

マウスゲノムから SRF 遺伝子をクローニングしたところ、約 8 kb で、7 エクソンから構成されていた。その 5' 上流 -281~-202bp の領域には転写活性化配列が存在し、5 種類の核内因子が結合する可能性がある事が明らかとなった。エクソン 5 の選択的スプライシングにより、エクソン 5 を持たない SRF-B は、骨格筋・心臓で多く発現し、心臓の発生に伴い、SRF-B の発現量が増加した。SRF の選択的スプライシングは、心臓の発生・分化とともに生じるようになり、筋・心筋の発生分化に従って多く発現していた事から、エクソン 5 付近が骨格筋・心筋の発生・分化において何らかの役割を演じている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

Serum response factor (SRF) は CArG box 配列に結合する転写因子群、MADS box family の一つである。SRF は多くの筋肉特異的に発現をする遺伝子の発現調節に関与しており、筋肉系組織が由来する中胚葉の形成に必須と考えられているが、その制御機構は明らかにされていない。本研究ではマウス SRF 遺伝子のゲノム構造とその発現調節領域を解析後、SRF による CArG box 配列を介した転写制御機構の解析を行ない、SRF が筋肉系組織の発生分化に果たす役割を検討した。マウス SRF 遺伝子は 7 エクソンから構成され、5' 上流領域に約 80 塩基の転写制御配列が存在して、この領域には 5 種類の核内因子が結合する結果を得た。更に、選択的スプライシングにより SRF の活性化領域を含む第 5 エクソンを欠失した SRF アイソフォームが形成され、その発現量は筋肉系組織で多く、心筋及び骨格筋では未分化状態よりも分化完了後により多く発現している事を見いだした。このアイソフォームは CArG box 配列を介した下流遺伝子の発現を活性化する能力が強く障害されており、このことが筋の発生分化において何らかの役割を演じている可能性が示唆された。SRF による CArG box 配列を介した転写制御系の解析は筋発生分化を含む中胚葉形成過程における重要な遺伝子発現制御カスケード機構の解明につながる事が期待され、学位に値するものとする。