

氏名・(本籍)	しら かつ まさ き 白 形 正 樹
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理博第 1087 号
学位授与年月日	昭 和 63 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 生物学専攻
学位論文題目	筋細胞分化に伴う骨格筋型ミオシン軽鎖遺伝子の転写制御
論文審査委員	(主査) 教 授 小 西 和 彦      教 授 竹 内 拓 司 教 授 藤 井 義 明

## 論 文 目 次

第1章	序 論
第2章	材料と方法
第3章	結 果
第4章	考 察
	要 約
	謝 辞
	参考文献
	図 表

## 論文内容要旨

真核生物遺伝子の転写調節には様々な DNA エLEMENT が関与している。転写開始部位のすぐ上流には、多くの遺伝子でプロモーターELEMENT が共通にあり、RNA ポリメラーゼ II による正確で効率の良い転写に関与している。これらに加えて、様々な遺伝子の誘導的発現や、組織特異的発現や、発生段階に特異的な発現に関与するELEMENT がある。これらのELEMENT は各々の遺伝子に特異的であって、塩基配列や機能が異なり、しかも、遺伝子により位置も異なる。現在、転写制御機構の解明に向けて、これら転写に関与する DNA ELEMENT と、それに特異的に結合する因子の同定が種々の遺伝子で行われている。

骨格筋の発生過程に於て、単核の筋芽細胞は互いに融合して多核の筋管細胞を形成する。この筋細胞分化にともなって、ミオシン軽鎖 1f を含む多くの筋細胞特異的なタンパク質遺伝子の転写が誘導される。また誘導が同時に起こることから、これらの遺伝子の転写制御は細胞分化と関連して互いに協調的に行われていると考えられているが、この様な複数遺伝子の協調的制御は明らかになっていない。

著者は、筋細胞分化に伴うニワトリ骨格筋型ミオシンアルカリ軽鎖 (MLC1f/MLC3f) 遺伝子の転写制御に関わる遺伝子上流領域を明らかにすることを目的に、制御関与すると予想される上流領域を、細菌由来の chloramphenicol acetyltransferase (CAT) の構造遺伝子の 5' 側上流に結合することにより融合遺伝子を作製し、培養細胞に導入した。

### (1) ウズラ筋細胞における MLC1f/MLC3f 遺伝子の発現

融合遺伝子のトランジェント発現実験に形質転換したウズラ筋芽細胞を用いた。この細胞はラウス内腫ウイルスの温度感受性変異株 (RSVtsNY68) を感染させた筋芽細胞で、許容温度 (35°C) で培養すると細胞は分化せずに増殖を続けるが、培養温度を非許容温度 (41°C) に上昇させると 3 日後には大きな筋管細胞を形成する。最初に、MLC1f mRNA 量の変化を RNA プロット法により検討し、非許容温度で培養を行い細胞を分化させると、この細胞の MLC1f/MLC3f 遺伝子の転写が細胞の分化と関連して誘導されたことを示した。

### (2) 融合遺伝子の構築とトランジェント発現実験

転写制御に関わる領域を同定するために、ニワトリ MLC1f/MLC3f 遺伝子 5' 端の非翻訳領域内の +63 から上流 -3381 までの領域を CAT 構造遺伝子の 5' 端に結合し、融合遺伝子 pLC3381 を作製した (図)。この融合遺伝子をリン酸カルシウム法によりウズラ筋芽細胞に導入すると転写され、細胞内に CAT 活性が発現した。pLC3381 を導入後分化させた筋管細胞の CAT 活性は相対活性で 6.4% であった。この値は筋芽細胞における発現よりも 4.4 倍高い値であり、細胞分化に伴い融合遺伝子の転写が促進されたことを示唆していた。さらに、融合遺伝子の転写産物を RNase マッピング法を用いて解析し、導入された融合遺伝子は正しい転写開始点から転写され、しかも細胞の分化に伴って促進されたことを示した。従って、観察された CAT 活性の増加は細胞自身の MLC1f/MLC3f 遺伝子の細胞分化に伴う転写誘導に対応していることが明

らかになった。

### (3) 誘導に必要な遺伝子上流領域

pLC3381 に含まれていた上流領域を 5' 端から徐々に除いた融合遺伝子を調製し、それらの発現を比較した。その結果、2つの領域、-3381から-3178と、-2096から-1936の領域を除くと筋管細胞で発現する CAT 活性が著しく低下した。特に-2096から-1936の領域の削除により、活性は pLC2096 の 1/4.5 に減少し、誘導の割合も 6.2 から 1.6 に低下した。一方、この領域の削除は筋芽細胞の発現には影響を及ぼさなかった。従って、この領域が誘導に必要であることが示唆された。-735 を越える削除は筋芽細胞と筋管細胞のどちらの細胞での発現も、領域を除くに従い減少し、-735 から +1 までの領域が basal level の発現に参与していることを示していた。-2096 から -1936 までの領域が誘導に必要であることを確認するために、この領域を含む、-2214 から -1744 の領域だけを pLC3381 より除いた pLC $\Delta$ H の発現を検討した。予想されたように、pLC $\Delta$ H を導入した筋管細胞の活性は pLC1936 と同じ低いレベルであった。これらの結果により、MLC1f/MLC3f 遺伝子の誘導的な転写促進に必要な制御エレメントが-2096から-1936の間の160bp中に局在していることが示された。

### (4) ニワトリ筋細胞における融合遺伝子の発現

ウイルスで形質転換した筋細胞を用いて得られた結果を確認するために、初代培養したニワトリ筋芽細胞に一連の融合遺伝子を導入し、その発現を検討した。その結果はウズラ筋細胞を用いて得られた結果とほぼ一致しており、-2096から-1936まで除くと CAT 活性の発現は 1/11 に減少した。また pLC $\Delta$ H の発現も pLC1936 と同じレベルであった。発現した CAT 活性が融合遺伝子の正しい転写開始より転写された mRNA 量を反映していることをプライマー伸長法により確認した。したがって、確かに、-2096から-1936の領域が、ニワトリ筋管細胞における MLC1f/MLC3f 遺伝子の転写を促進していることが明らかになった。さらに、筋管細胞における高い発現が分化に伴って誘導された発現であることを、CAT 活性発現の時間経過を調べることにより明らかにした。

### (5) 制御エレメントの性質

-2096から-1936までの上流領域は、SV40 初期遺伝子のプロモーターと結合しても転写は促進せず、プロモーター特異的に転写を促進するエレメントであることが示唆された。また融合遺伝子は pLC3381 と pLC1936 を 4 種類の非筋細胞に導入しその発現を調べた結果、この DNA エレメントが筋細胞特異的に転写を促進していることも明らかになった。

### (6) 上流領域塩基配列の解析

-3381までの遺伝子上流領域の塩基配列を決定した。詳しい塩基配列の検討により、誘導的に転写を促進する-2096から-1936の領域に特徴的な塩基配列が明らかになった。その配列は12ntの不完全な direct repeat とそのすぐ下流に8ntの不完全な inverted repeat が続く配列であった。これらの塩基配列と類似したエレメントは-957に12ntの反復配列に類似した配列があった他は、-3381までの上流領域には存在しなかった。

### (7) 上流領域に結合する核因子の検索

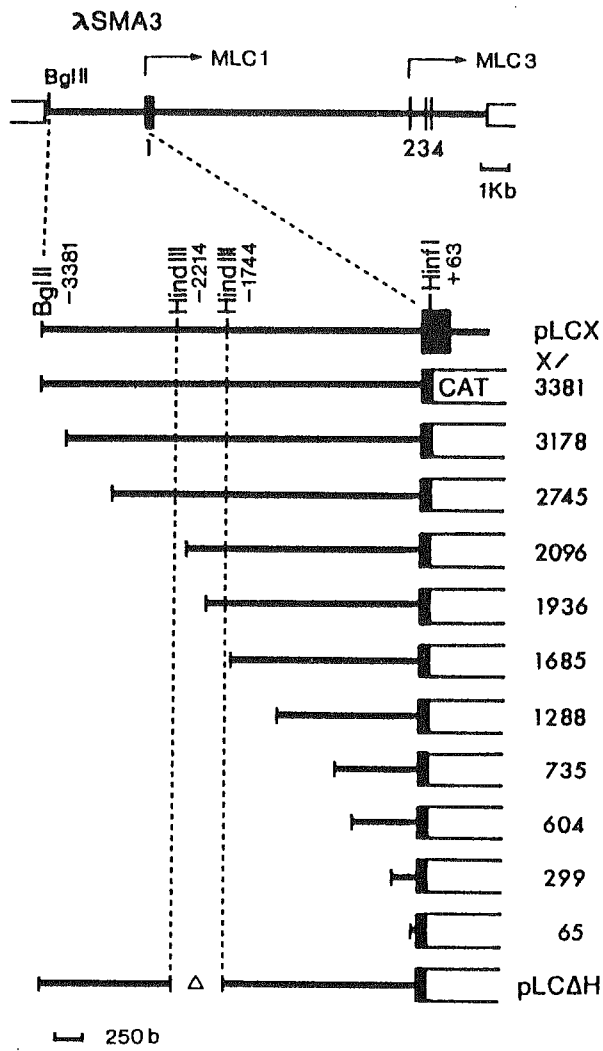
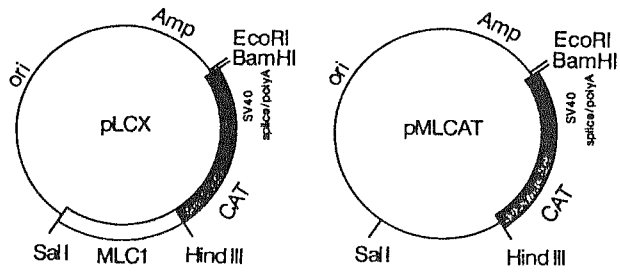
ニワトリ15日胚の胸筋より核抽出物を調製し、ゲルシフト法により-2096から-1936の領域に結合する核因子を検索した。その結果、-2096から-2044までの領域内の塩基配列を特異的に認識して結合する因子が存在した。また反応前に核抽出物を Proteinase K 処理及び加熱処理することによりシフトしたバンドが消えたことから、結合した因子はタンパク質であると推定された。この領域は12ntの direct repeat を含むことから、おそらく核因子はこの反復配列を認識していると考えられた。

### (8) 考察

以上記載したように、MLC1f/MLC3f 遺伝子と CAT 遺伝子との融合遺伝子を作製し、筋細胞を含む種々の細胞でその発現を調べた。その結果、この融合遺伝子は筋細胞内で正しい転写開始点から転写され、しかも MLC1f/MLC3f 遺伝子と同様に組織特異的にしかも細胞分化に関連してその転写が誘導されたと結論を下した。また、細胞分化に伴う転写誘導に関与する DNA エLEMENT が、転写開始点の上流-2096から-1936の領域に位置していることが明らかになった。

筋細胞分化に伴い、多くの骨格筋型収縮タンパク質の遺伝子が協調的に活性化される。そこで、各遺伝子で明らかになった転写制御領域を比較することにより、転写誘導に関わる共通の DNA エLEMENT が見つかることが予想された。現在までに誘導に関わる転写制御領域の塩基配列が報告されている収縮タンパク質遺伝子はニワトリ  $\alpha$ -アクチンと、ヒト心筋アクチンのみであり MLC1f/MLC3f 遺伝子を加えて3遺伝子の制御領域を比較した。その結果、MLC1f/MLC3f 遺伝子の転写制御領域中に存在した12及び8ntの反復配列と、同一または類似した配列は  $\alpha$ -アクチン、心筋アクチンの遺伝子にはなかった。また、心筋アクチン遺伝子の制御エレメントである CC (A+T rich)。GG 配列は MLC1f/MLC3f 遺伝子上流にはなかった。これらのエレメントの他にも、3遺伝子の制御領域に共通の塩基配列及び類似した塩基配列は発見できなかった。以上のようにこれらの制御領域は筋細胞分化に伴う転写促進に関与している点では同じ機能を持つにもかかわらず、塩基配列に関しては類似性が特にみられないことが明らかになった。今回調べていない領域に共通の制御エレメントが存在する可能性や、また、ある transacting factor が塩基配列の異なる制御領域を等しく認識、結合し、これらの遺伝子の転写を同時に促進させる可能性は、否定できない。しかしながら、MLC1f/MLC3f 遺伝子と  $\alpha$ -アクチン遺伝子が協調的に発現していない細胞も存在していることを考慮すれば、制御領域に共通の cis-acting エLEMENT が無かったことは予想外の結果ではない。おそらく、筋細胞分化にともなう協調的転写誘導は、より複雑な機構によって行われているのであろう。

今後、個々の遺伝子の転写調節ばかりでなく、細胞分化に伴って複数の遺伝子全体を協調的に制御する機構が、筋細胞を材料に解明されて行くことが期待される。



## 論文審査の結果の要旨

真核生物遺伝子には転写促進や転写制御に関わる DNA エlementがあり、さらにこれら Element と特異的に結合して転写制御に関与する因子が存在することが明らかになって来ている。しかしながら、これらの因子による転写制御の分子機構は推論の域を出でいない。また、細胞分化に伴う複数遺伝子の協調的転写制御機構も解明されていない。本研究は遺伝子転写制御に関する上記の問題を解明するための端緒として、まず、筋細胞分化に伴うニワトリ骨格筋型ミオシンアルカリ軽鎖 (MLC1f/MLC3f) 遺伝子の転写制御に関わる遺伝子上流域の解明と、その領域に特異的に結合する因子を筋細胞核中に求めることを試みたものである。

まず、ラウス肉腫ウイルスの温度感受性株を感染させたウズラ筋芽細胞を非許容温度で培養すると筋管細胞を形成し、MLC1f mRNA 量が増加することを観察し、MLC1f/MLC3f 遺伝子の転写が細胞分化に関連して誘導されることを示した。

次に、転写制御に関わる領域の同定のために、ニワトリ MLC1f/MLC3f 遺伝子 5' 端の非翻訳領域内の +63 から上流 -3381 までの領域をクロラムフェニコールアセチル転移酵素 (CAT) 構造遺伝子 5' 端に結合させた融合遺伝子 PLC3381 を作製し、これをウズラ筋芽細胞に導入し、この筋芽細胞から筋管細胞を形成させ、細胞分化に伴う CAT 活性の上昇を観察した。また融合遺伝子の転写産物の解析から、この CAT 活性の増加は細胞自身の MLC1f/MLC3f 遺伝子の細胞分化に伴う転写誘導に対応していることを明かにした。

また、PLC3381 の上流領域を 5' 端から徐々に除いた融合遺伝子を調節し、これらの発現を比較し、-2096 から -1936 の領域が誘導に必要であることを示した。この領域を含む -2214 から -1744 領域を PLC3381 から除いた PLC $\Delta$ H の発現を検討し、MLC1f/MLC3f 遺伝子誘導的転写促進に必要な Element は -2096 から -1936 の間の 160bp 中に局在していることを明かにした。

次で、これらの結果を確認するために初代培養したニワトリ筋芽細胞に上記の融合遺伝子を導入して、その発現を検討し、ウイルスで形質転換をしたウズラ筋細胞を用いた場合とほぼ一致した結果をえた。

さらに、-3381 までの遺伝子上流領域の塩基配列を決定し、-2096 から -1936 の領域に 112nt の不完全な direct repeat と、そのすぐ下流に 8nt の inverted repeat が続く特徴的な配列があることを示した。

一方、ニワトリ 15 日胚の胸筋より核抽出物を調製し -2096 から -1936 の領域に結合する因子の検索を行い、-2096 から -2044 内の塩基配列を特異的に認識するタンパク質と推定される因子の存在を確認した。

以上、本論文に示された結果は、重要な新知見であり、著者が自立して研究活動を行なうに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。

よって、白形正樹提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。