

学 位 論 文 題 名

マウス・ラミンB1遺伝子のクローニングと構造解析

学位論文内容の要旨

ラミンは核膜の内側に存在する核ラミナの主要な構成成分であり、タンパク構造上の特徴からIF(中間系フィラメント)タンパクファミリーに分類される。一般的に多細胞生物では同一個体あるいは細胞中に複数種のラミンが存在し、免疫学的及び生化学的にAとBの2つのタイプに分類される。AタイプにはA及びCが、BタイプにはB1及びB2が知られており、これらのラミンが個々の機能を持つのか不明だが、いずれも核構造の維持が主な機能であると考えられている。AタイプとBタイプでは発現様式が異なり、Aタイプラミンが発生分化の調節を受けるのに対し、Bタイプラミンは全ての体細胞で発現する。本研究ではラミンB1遺伝子の構造と発現調節機構の解明を目的として、マウス・ラミンB1遺伝子のクローニング、構造解析、プロモーター機能領域の検索を行った。

λ DASHをベクターとする 1.5×10^6 の独立のクローンよりなるマウスゲノミックライブラリーをスクリーニングし、10個の独立のクローンを得た。個々の λ クローンのBamHI, EcoRI, HindIIIを用いた制限酵素切断点地図を作成し、ラミンB1遺伝子コード領域を含む約66kbp(キロ塩基対)の範囲のゲノムDNAの制限酵素地図を作成した。 λ クローン挿入断片中のcDNA配列とハイブリダイズするDNA断片をプラスミドベクターにサブクローニングし、cDNA配列コード領域の限定と塩基配列の決定を行った結果、マウス・ラミンB1のcDNA配列は約43kbpに渡るゲノムDNA中に10個のイントロン(第1から第10イントロンの順に約20, 0.7, 1.0, 2.4, 6.1, 0.7, 1.6, 4.8kbp)により11個のエキソン(第1から第11エキソンの順に約600, 157, 126, 171, 125, 221, 226, 105, 120, 111, 約810bp)に分断されてコードされていることが判った。また、全てのイントロンの両端はスプライシング部位の共通配列である5'GT及び3'AGの配列であった。

マウス・ラミンB1遺伝子構造を最近報告されたヒト・ラミンB1遺伝子と比較するとエキソン/イントロン構成が全く一致していた。本研究でマウス・ラミンB1遺伝子の構造が明らかになったことにより、哺乳類で初めて同一生物種(マウス)における全ての主要な4つのラミン(A, C, B1及びB2)の遺伝子構造が既知となった(ラミンCはラミンAと同一の遺伝子領域にコードされ一次転写産物の異なるプロセッシングにより生じることが報告されている)。マウス・ラミンA, B1, B2をアミノ酸配列の相同性に基づいて並べ、各々のエキソン構成を比較した結果、以下のような差が見られた。(i)イントロン挿入位置はラミンB1に10箇所、ラミンA及びラミンB2に各々11箇所存在するが、その内9箇所のイントロン挿入位置(ラミンB1の第10イントロン、ラミンB2の第1と第11イントロン、ラミンAの第10と第11イントロンは除く)は、コドンに分断する位置も含めて一致していた。(ii)ラミンA及びラミンB1の第1エキソンに相当するラミンB2のエキソンは、B2に特異的なイントロンの挿入により2つに分断されていた。(iii)ラミンAの第11エキソンはラミンB1及びB2とアミノ酸の相同性が見られず、ラミンB1の第10エキソンと第11エキソン間(B2においては第11エキソンと第12エキソン間)

に存在していた。(iv)ラミンB1の第7エキソンと第10エキソンに相当するエキソンはマウス・ラミン間で相同性が低かったが、この2つのエキソンを異なる生物種のラミン間で比較するとラミンB1の第7エキソンだけはアミノ酸相同性が保存されていた。このためラミンB1の第7エキソンがラミンB1固有の機能を担っている可能性が示唆された。

また、マウスラミンB1の遺伝子構造は他のラミン遺伝子と同様にIFタンパクファミリーに属する遺伝子の構造の特徴を保持しており、IFタンパクファミリーが同一の祖先から進化してきたという今までの説を支持する結果が得られた。

プロモーター機能領域の検索を行うために、塩基番号-222（翻訳開始コドンの最初の塩基を+1とする）から上流約3kbpを持つゲノムDNA断片を5'側から種々の長さ欠失させた欠失体にレポーター遺伝子を結合したプラスミドを作成し、各々の欠失体のプロモーター活性をトランスフェクション法により測定した。その結果、塩基番号-749以上欠失させると欠失の大きさに依存して徐々にプロモーター活性は低下し、塩基番号-322まで欠失させても-749と比較して約20%の転写活性を保持していたため、プロモーター活性領域は塩基番号-749~-222に存在すると考えられた。また、比較的急激に活性が低下する領域に転写因子C/EBP, MLTF, AP2及びSP1の認識配列が見い出された。ヒトのプロモーターをマウスのプロモーターと塩基配列の相同性に基づいて並べると、マウスで比較的急激に転写活性が低下した領域にヒトでも転写因子C/EBPとMLTFの認識配列が見出された。そのためC/EBPとMLTFがラミンB1遺伝子の転写に必要である可能性が示唆された。プロモーター活性を持つ領域を含むDNA断片（塩基番号-810~-1）はGC含量が高く、複数の転写因子SP1の認識配列が存在し、典型的なTATA配列がないなど、多くのハウスキーピング遺伝子のプロモーターに見られる構造をしていた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 本 和 則

副 査 教 授 盛 田 フ ミ

副 査 教 授 矢 澤 道 生

学 位 論 文 題 名

マウス・ラミンB1遺伝子のクローニングと構造解析

ラミン蛋白質は真核細胞の核膜の内側に存在するラミナの主要構成成分であり、染色体の複製や転写に関与していると思われる。また、細胞分裂にともなう核膜の消失と再生の過程にはラミンの磷酸化と脱磷酸化が重要な役割を果たしている。ラミンにはA/CタイプとBタイプの2つに大別され、その発現はA/Cタイプでは発分化にともなう調節を受けるが、Bタイプは全ての体細胞で発現している。

著者は、cDNAのクローニングと塩基配列が決定されているが、ゲノムDNAについては報告のないマウスのラミンB1遺伝子のクローニングとその構造について研究した。cDNAからは不明な転写の調節に関与する上流域の塩基配列と、遺伝子のエキソン・イントロン構造とその各々の長さを求めることができるからである。λファージベクターによるゲノムライブラリーから選別して10個のクローンを単離することにより、66,000塩基対にわたる遺伝子の全体をカバーすることができた。制限酵素 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III による切断地図を完成させた。さらに、遺伝子上流部分とともに、全てのエキソン・イントロンの境界を含む領域の塩基配列の決定を行い、遺伝子のエキソン・イントロン構造を明らかにすることができた。様々な長さの11個のエキソン、10個のイントロンより成っている。他のマウス・ラミンや他の生物のラミン遺伝子との構造比較、さらにラミンが属する中間フィラメント構成蛋白質スーパーファミリー間での比較が可能となり、ラミンの進化の過程を考察できた。

上流領域には、複数の転写因子の結合配列が存在するが、SP1因子の認識配列が多数存在している。上流からの欠失を多数作製し、マウス細胞に導入して、その転写活性への影響をレポーター遺伝子の発現で調べると、プロモーター活性が徐々に減少する。この現象は多くのハウスキーピング遺伝子で同様に観察されており、

多くの転写因子認識部位が関与し、1つ1つの欠失により、少しずつプロモーター活性が弱くなることを示している。

著者の研究により、マウスの体細胞で発現している全ての種類のラミンのゲノム遺伝子の構造が決まったことになる。他の生物種ではまだ例がない。従って、以上の研究はラミン遺伝子の構造解析に貢献するところ大である。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。