

氏名(本籍)	わた なべ つよし 渡 辺 剛 (山口県)
学位の種類	博 士 (学 術)
学位記番号	博 甲 第 1,637 号
学位授与年月日	平成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	生物科学研究科
学位論文題目	Studies on the Regulation of Troponin T Gene Expression in Chicken Skeletal Muscle: Mechanism of Fast Troponin T Gene Expression (骨格筋特異蛋白質トロポニン T 遺伝子の発現機構—速筋型遺伝子の発現調節の解析—)
主 査	筑波大学教授 理学博士 平 林 民 雄
副 査	筑波大学教授 理学博士 山 根 國 男
副 査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌
副 査	筑波大学教授 理学博士 宗 像 英 輔

論 文 の 内 容 の 要 旨

筋肉細胞は細胞分化を分子レベルで解析するよいモデルとして注目されている。特に筋分化因子として Myo D ファミリーが単離されて以来、分子レベルの解析に一層の拍車がかかっている。筋収縮の調節蛋白質の一つであるトロポニン T には多くのアイソフォームが存在し、速筋型トロポニン T については、選択的 RNA スプライシングなどにより、遅筋型や心筋型よりもはるかに多くのアイソフォームが産出されている。これらのアイソフォームは筋組織特異的、発生段階特異的に発現されており、発生初期の骨格筋では心筋型、遅筋型、速筋型とも発現するが、発生が進むにつれ、速筋型もしくは遅筋型のみを発現するようになる。本研究ではこれらを遺伝子レベルで解析することを目標とし、まず速筋型に注目して、その発現制御機構を調べた。

1. ニワトリ速筋型トロポニン T 遺伝子のクローニング——トロポニン T の発現機構を遺伝子レベルで解析を行うために、ニワトリ速筋型トロポニン T のゲノム遺伝子のクローニングを行った。まず PCR により、直接ゲノム遺伝子の断片をクローニングすることにした。エクソン 1-2, 9-10, 14-15 の三つの領域で PCR を行った結果、それぞれ 4kb, 0.7kb, 0.7kb の産物が得られた。これらのプローブを用い、ニワトリゲノムライブラリーからスクリーニングを行ったところ、二種類のクローンが得られたが重複はしなかった。そのため LA Taq ポリメラーゼを用いた PCR を利用してその間をうめる領域のクローニングを試みた。エクソン 2, 10 に相当する領域でプライマーを合成し、PCR を行ったところ、約 20kb の産物が得られた。以上の結果からニワトリ速筋型トロポニン T 遺伝子の全長は 30kb 以上になること、その長さはラット速筋型の約 2 倍、ニワトリ心筋型の 3 倍の長さであることが分かった。

2. 速筋型遺伝子の転写調節の解析——ニワトリ心筋型の遺伝子のプロモーター領域では TEF-1 ファミリーの結合する M-CAT がその遺伝子発現に重要であることが示唆されている。この M-CAT は心筋で発現する遺伝子のプロモーターに多く見られ、その重要性が注目されている。一方、速筋型や遅筋型の転写調節に関しては殆ど解析されていないので速筋型遺伝子の転写調節について解析することにした。その転写制御を調べるためにエクソン 1 を含む上流領域に CAT 遺伝子をつなぎ、ニワトリ胚筋細胞に導入し、CAT アッセイを試みた。その結果、-264bp から -44bp の領域が発現調節に重要な働きをするものと考えられ、この領域には MEF 2, 二つの E box, CArG box, M-CAT-like エレメント CCAC box など遺伝子の発現に関与するシスエレメントが存在した。これら

に変異を導入し、CATアッセイを行い調べたところ、MEF 2、二つのE box、M-CAT-likeエレメントが遺伝子発現に影響を与えていることがわかった。M-CAT-likeエレメントの配列はM-CATとは三番目の塩基が異なっているため、このエレメントに結合する因子がM-CAT結合因子と同じか否か、ゲルシフトアッセイにより調べた。その結果、M-CAT結合因子とは別の因子がM-CAT-likeエレメントに結合することが分かった。

以上の結果から、速筋型トロポニンT遺伝子は少なくともMEF 2、MyoD family、M-CAT-likeエレメント結合因子の三つの転写因子の協調により制御されると結論され、速筋型遺伝子のプロモーター構造が心筋型のそれとは異なっていることは、二つの遺伝子が異なった転写制御を受けていることを示している。遅筋型に関しては、クローニング、転写制御について解析を進めており、これらと合わせて骨格筋のトロポニンT遺伝子の発現制御機構を明らかにする基礎が築かれた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は筋肉分化における速筋の発生過程をトロポニンT遺伝子の発現制御機構から解明しようとした意欲的研究で、遺伝子の発現制御の研究という競争の激しい分野にあって、この遺伝子の詳細な遺伝子構造の解明と新しい制御エレメントの発見は大きな成果である。特にM-CAT-likeエレメントに関する研究で、M-CATエレメントとは異なること及びM-CAT-likeエレメントに特異的結合因子の存在を証明したことは今後他の筋肉種（遅筋及び心筋）における遺伝子発現の研究を進めるにあたり重要な研究成果であると評価できる。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。