

マウス膜結合型トランスフェリン様蛋白 (MTf) の cDNA および 遺伝子のクローニングと構造解析

中 舂 和 子

Cloning and structural analysis of cDNA and the gene for mouse membrane-bound transferrin-like protein (MTf)

Kazuko Nakamasu

(平成10年6月18日受付)

緒 言

レクチンの一種であるコンカナバリンA (ConA) は、ウサギ軟骨細胞培養系において軟骨細胞の形態を未熟な扁平形から分化した球形に変化させ、軟骨型プロテオグリガン (アグリカン) の合成を促進し¹⁾、さらに静止軟骨細胞培養系において軟骨細胞の最終分化マーカーであるアルカリホスファターゼとX型コラーゲンの合成を誘導する²⁾。このConAの軟骨細胞に対する作用を仲介する物質を探索する過程で、ウサギ培養軟骨細胞の膜画分から76 kDaの糖蛋白が精製された³⁾。この蛋白の部分アミノ酸シークエンスおよびcDNAクローニングによる一次構造解析の結果、このConA結合糖蛋白はトランスフェリンファミリーの一員であるヒトp97/メラノトランスフェリンと高い相同性があり、これらはオーソログであると考えられた³⁾。ウサギにおけるp97/メラノトランスフェリンは他の組織と比較して軟骨に高レベルに発現していた³⁾。また、そのmRNAは関節軟骨、静止軟骨および成長板軟骨のいずれにも発現しているが、成長板軟骨においては肥大層でmRNAの発現は低下しているということが報告され、この蛋白を膜結合型トランスフェリン様蛋白 (MTf) と呼ぶことが提唱された³⁾。

MTfは当初、ヒトメラノーマ細胞に高レベルに発現している97 kDaの腫瘍抗原として発見された⁴⁻⁶⁾。しかし、MTfは正常のメラノサイトでは検出されず、正常成体組織では小腸上皮⁷⁾、脳の血管内皮⁸⁾ および好酸

球⁹⁾にわずかに発現しているのみであった。ヒトMTfは、アミノ酸配列で血清トランスフェリンやラクトフェリンと約40%の類似性を持ち、構造上トランスフェリンファミリーの一員であり¹⁰⁾、鉄と結合することも報告されている¹¹⁾。しかし、MTfの生理的な役割は未だ不明である。一方、上記のようにMTfは軟骨で他の組織より高レベルに発現していることがわかったので、軟骨におけるMTfの生理的役割や軟骨特異的発現のメカニズムに研究の焦点が向けられるようになった。

本研究では、軟骨におけるMTf遺伝子の発現調節機構を解明することを目指して、まず、マウスMTf cDNAをクローニングし、これを用いてMTf mRNAの発現様式の検討を行い、次いでMTf遺伝子をクローニングして、5'上流領域を含めた遺伝子の構造解析を行った。

材料ならびに方法

1. マウス ATDC5 細胞株の培養

マウス ATDC5 細胞を5%ウシ胎児血清と10 μg/ml ヒトトランスフェリン (Boehringer Mannheim 社) および 3×10^{-8} M 亜セレン酸ナトリウム (和光純薬工業) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (日本製薬) とハム F12 培地の1:1混合培地 (維持培地) にて、37°C, 5% CO₂ 気相下で培養した¹²⁾。また、軟骨分化を誘導する場合は、この維持培地に10 μg/ml ウシインスリンを加えた培地 (分化培地) で ATDC5 細胞を培養した¹²⁾。培地交換は一日おきに行った。本研究では、ATDC5細胞を組織培養用6穴プラスチック培養皿 (Corning 社) に 3×10^5 細胞の密度で播種し、維持培地あるいは分化培地で培養した。そして、それぞれ

広島大学歯学部口腔生化学講座 (主任: 加藤幸夫教授) 本論文の要旨は平成8年10月の第38回歯科基礎医学会学術大会, 平成9年9月の第70回日本生化学会大会において発表した。

の培地で培養した細胞から培養2, 6, 10, 14, 18および25日目に total RNA を抽出した¹³⁾。

2. マウス MTF の cDNA クローニングと塩基配列の決定

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インスリン添加により軟骨形質を誘導した ATDC5 細胞¹²⁾ から Guanidinium thiocyanate 法によって total RNA を抽出した¹³⁾。この total RNA 1 μg から reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によって2本鎖の cDNA を合成した。そして、ウサギ MTF の塩基配列³⁾ に基づいて設計したプライマーを用いて、いくつかのマウス MTF cDNA 断片を増幅した。この RT-PCR は、Marathon cDNA amplification kit (Clontech 社) を使用して行い、DNA の増幅には DNA サーマルサイクラー (GeneAmp PCR system 2400, Perkin-Elmer cetus 社) を用いた。続いて、得られた cDNA 断片を pGEM-T (Promega 社) に組み込んでクローン化し、Sequenase 7-deaza-dGTP DNA sequencing kit (USB 社) を用いて塩基配列を決定した。それから、完全長の cDNA を得るために、Marathon cDNA amplification kit (Clontech 社) を用いて rapid amplification of cDNA ends (RACE) を行った。まず、上記の2本鎖 total cDNA に Marathon cDNA アダプターをライゲーションした。アダプタープライマーと、上記で判明した塩基配列から設計した特異的プライマーとを用いて、RACE を行った。この増幅された cDNA サンプルを、4.5% ポリアクリルアミドゲルにて分離し、その cDNA の主要バンドをゲルから抽出し、pGEM-T および pGEM-T Easy (Promega 社) に組み込んでクローン化した。それらをテンプレートとして Sequenase 7-deaza-dGTP DNA sequencing kit (USB 社) および ABI prism 310 autosequencer (ABI 社) を用いて、塩基配列を決定した。

3. ノザンプロット解析

3 週齢雄 BALB/c マウスの肋軟骨、および 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インスリン添加によって軟骨形質を誘導した ATDC5 細胞から、Guanidinium thiocyanate 法にて total RNA を抽出した¹³⁾。その total RNA から Oligotex-dT30 <Super> (日本ロッシュ社) を用いて poly(A)⁺ RNA を精製した。軟骨の poly(A)⁺ RNA (1 μg) および ATDC5 の poly(A)⁺ RNA (5 μg) を 0.6M ホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲルにて電気泳動した。このゲル中の poly(A)⁺ RNA をナイロンメンブレン (Nytran S & S 社) に転写した。加えて、成体マウスの心臓、脳、脾臓、肺、肝臓、骨格筋、腎臓および精巢の poly(A)⁺ RNA (2 μg) を転写してある MTN blot

(Clontech 社) メンブレンを用いた。これらのメンブレンを 2.0 kb の [³²P] 標識マウス MTF cDNA プローブ、または対照として 613 bp の [³²P] 標識マウスグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) cDNA プローブとハイブリダイゼーション反応させた。プローブの標識には、Oligolabeling kit (Pharmacia Biotec. 社) を使用した。反応後のメンブレンは、0.2×SSC, 0.5% SDS 溶液で、65°C にて、30分間洗浄した。その後、それらのメンブレンのオートラジオグラフィーによって反応バンドを検出した。

4. RT-PCR サザンプロット解析

維持培地および分化培地にて培養した ATDC5 細胞から、Guanidinium thiocyanate 法によって total RNA を抽出した¹³⁾。それぞれ 1 μg の total RNA から、SUPERSCRIPT preamplification system (Life Technologies 社) を用いて 1 本鎖目の cDNA を合成した。続いて、MTF (5'-CGAGATCCAGAAGTGTGGAGATA-3' と 5'-GTCCTGGGCCTTGTCAGAAAGTC-3')、II 型コラーゲン (5'-CACACTGGTAAGTGGGGCAAGACCG-3' と 5'-TGC-CCAGTTCAGGTCTCTTA-3')¹⁴⁾ および GAPDH (5'-GTCAAGGCCGAGAATGGGAA-3' と 5'-GCTTCACCA-CCTTCTTGATG-3')¹⁵⁾ のプライマーを用いて RT-PCR を行った。この PCR は、変性反応を 94°C で 30 秒、伸長反応を 68°C で 1 分間のサイクルを 30 回の条件で行った。得られた PCR 産物を 1% アガロースゲルにて電気泳動し、分離した。ゲル中の DNA を 1.5M NaCl を含む 0.5N NaOH 溶液中で 1 時間変性した後、1M Tris-HCl, pH 8.0, 1.5M NaCl 溶液で 30 分間中和し、これを Hybond-N メンブレン (Amersham 社) に転写した。これらのメンブレンを 2.0 kb の [³²P] 標識マウス MTF cDNA プローブ、320 bp の [³²P] 標識マウス II 型コラーゲン cDNA プローブおよび 613 bp の [³²P] 標識マウス GAPDH cDNA プローブとハイブリダイゼーション反応させた。プローブの標識には、Oligolabeling kit (Pharmacia Biotec. 社) を使用した。反応後のメンブレンを前述と同様の方法で、反応バンドを検出した。

5. マウスゲノムライブラリーの作製と MTF 遺伝子クローニング

3 週齢雄 BALB/c マウスの肝臓よりゲノム DNA を抽出し、制限酵素の MboI で部分消化した。その DNA を λ EMBL3 ベクター (Stratagene 社) の BamHI サイトにライゲーションし、パッケージング操作後、宿主大腸菌の XL1-blue MRA (P2) (Stratagene 社) にトランスフェクションした。このライブラリーの 1×10^6 個のプラークから、2.0 kb の [³²P] 標識マウス MTF cDNA

プローブを用いたブランクハイブリダイゼーション法によるスクリーニングによって、7個の陽性クローンを得た。それらの陽性クローンの λ DNAを調製し、それらをそれぞれ *Bam*HI, *Eco*RI および *Sa*II で消化した。それらの DNA 断片を 1% アガロースゲルにて分離し、ゲル中の DNA を 1.5M NaCl を含む 0.5N NaOH 溶液中で 1 時間変性した後、1M Tris-HCl, pH 8.0, 1.5M NaCl 溶液で 30 分間中和し、これを Hybond-N メンブレン (Amersham 社) に転写した。これらのメンブレンと、翻訳領域のほとんどすべてと 5' および 3' 端の 200 bp を含む、3 種類の [³²P] 標識マウス MTf cDNA プローブとでハイブリダイゼーション反応を行った。反応後のメンブレンを前述と同様の方法で、反応バンドを検出した。それらのバンドを検討して、マウス MTf 遺伝子の制限酵素地図を作製した。また、いくつかの陽性クローンを pUC119 プラスミドにサブクローニングし、それらと λ DNA を用いて、MTf 遺伝子の全てのエキソンとエキソン-イントロン境界、および 5' 上流領域の約 2.5 kb の塩基配列を決定した。

6. マウス MTf 遺伝子のサザンブロット解析

マウスゲノム DNA 50 μ g を *Bam*HI, *Eco*RI および *Sa*II でそれぞれ消化した。それらを 0.8% アガロースゲルで電気泳動し、Hybond-N メンブレン (Amersham 社) に転写した。それらのメンブレンを 2.0 kb の [³²P] 標識マウス MTf cDNA プローブとハイブリダイゼーションさせた。反応後のメンブレンを前述と同様の方法で、反応バンドを検出した。

7. 転写開始点の決定

マウス MTf 遺伝子の転写開始点を決定するために、プライマー伸長法を行った。T4 polynucleotide kinase (TaKaRa 社) を用いて ³²P にてプライマー (5'-TTCCTC-TTCCCTGGTCTCTCTGGCCCTCAC-3') をラベルした。これを胎生 18 日マウス全胎児から調製した poly(A)⁺ RNA 2 μ g にアニールさせた。それから、Triezenberg¹⁶⁾ の方法に従って 200 ユニット SuperScript II (Life Technologies 社) を用いて、伸長反応を行った。放射性の伸長した DNA の大きさは、同じプライマーを用いたシーケンスラダーを 6% ポリアクリルアミドゲル内で同時に電気泳動することによって解析した。

8. トランスフェリンファミリーの系統樹の作製

現時点で報告のある 21 種類のトランスフェリンファミリー構成員とマウス MTf をあわせて 22 種類のタンパク質のアミノ酸配列に基づいて、DNA 解析ソフトの GeneWorks (Oxford Molecular Group, Inc.) (広島大学

歯学部中央研究所所属) を用いて系統樹を作製した。

結 果

1. マウス MTf cDNA クローニングと構造解析

材料と方法で記したように、分化誘導した ATDC5 の total RNA をテンプレートとし、ウサギ MTf の塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いて、マウス MTf cDNA を RT-PCR 法にてクローニングした。そして、完全長の cDNA をクローニングするために 5', 3'-RACE を行った。増幅された cDNA をサブクローニングし、いくつかの独立したクローンをシーケンスすることによって、マウス MTf cDNA の全塩基配列を決定した (図 1)。

マウス MTf cDNA は、2217 bp の open reading frame を含み、poly (A)⁺ を除く 4158 bp の全長は、ノザンブロット解析で見られる mRNA の大きさとよく一致していた。翻訳される 738 個のアミノ酸配列に基づいて、データベース検索を行った結果、マウス MTf は、ヒト p97 と 86%、ヒト血清トランスフェリンと 41% 類似していた。シグナルペプチドの切断部位は、コンピューター解析の結果、19 番目と 20 番目のアミノ酸残基の間であると予測された。C 末端の 25 個のアミノ酸配列は、ヒト MTf においても示唆されたグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー形成部に相当し^{10,17)}、疎水性のアミノ酸残基が多く、マウス MTf においても GPI アンカーを形成することが考えられた。また、ホモロジーブロット解析の結果、MTf は他のトランスフェリンファミリーと同様に 2 つの繰り返し構造を有していた。

2. MTf mRNA の組織分布

成体マウスの心臓、脳、脾臓、肺、骨格筋、腎臓、精巣、および軟骨の Poly(A)⁺ RNA を用いて、ノザンブロット解析を行い、MTf mRNA の成体マウスにおける組織分布を検討した。MTf mRNA は、軟骨と精巣で検出され、その大きさは 4.1 kb と計算された (図 2)。また、MTf mRNA は、その他の組織では検出されず、ATDC5 細胞においては、軟骨組織と比較して発現レベルがかなり低いものの検出された。

3. マウス ATDC5 細胞における MTf mRNA の発現

MTf mRNA の発現が、軟骨における肥大層以前の段階ではどのように変化するのか、軟骨形質の発現を誘導できるマウス ATDC5 細胞株を用いて、RT-PCR サザンブロット解析によって検討した。

10 μ g/ml インスリンを添加して軟骨形質の発現を誘導した ATDC5 細胞培養系において、培養 3 日目にコ

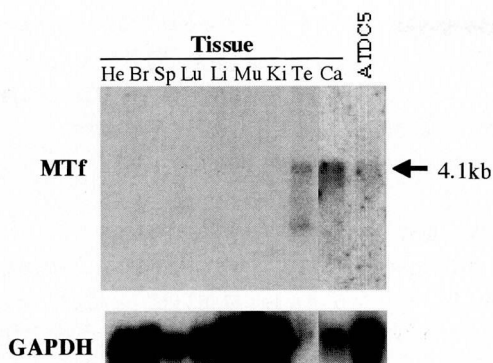


図2 ノザンブロット法によるMTfの組織分布。
He:心臓, Br:脳, Sp:脾臓, Lu:肺,
Li:肝臓, Mu:骨格筋, Ki:腎臓, Te:精
巢, Ca:軟骨, ATDC5:ATDC5細胞。

ンフルエントに達し、6日目には細胞の凝集がみられた。引き続き培養10日目には軟骨結節の形成が始まり、その後、結節は増大していき、形態的には軟骨の分化が進行するモデルになっていると考えられた。一方、インスリン非添加群では、コンフルエント後にインスリン添加群のような細胞の形態変化は観察されなかった(図3A)。

この培養系を用いたRT-PCR サザンプロット解析の結果、インスリン添加群では、MTf mRNAは培養2日目には検出されなかったが、培養6日目以降に出現し、代表的な軟骨形質であるII型コラーゲンのmRNA発現とよく似たパターンを示した(図3B)。一方、インスリン非添加群では、II型コラーゲンの発現はほとんど見られず、MTf mRNAは、2日目には検出されず、培

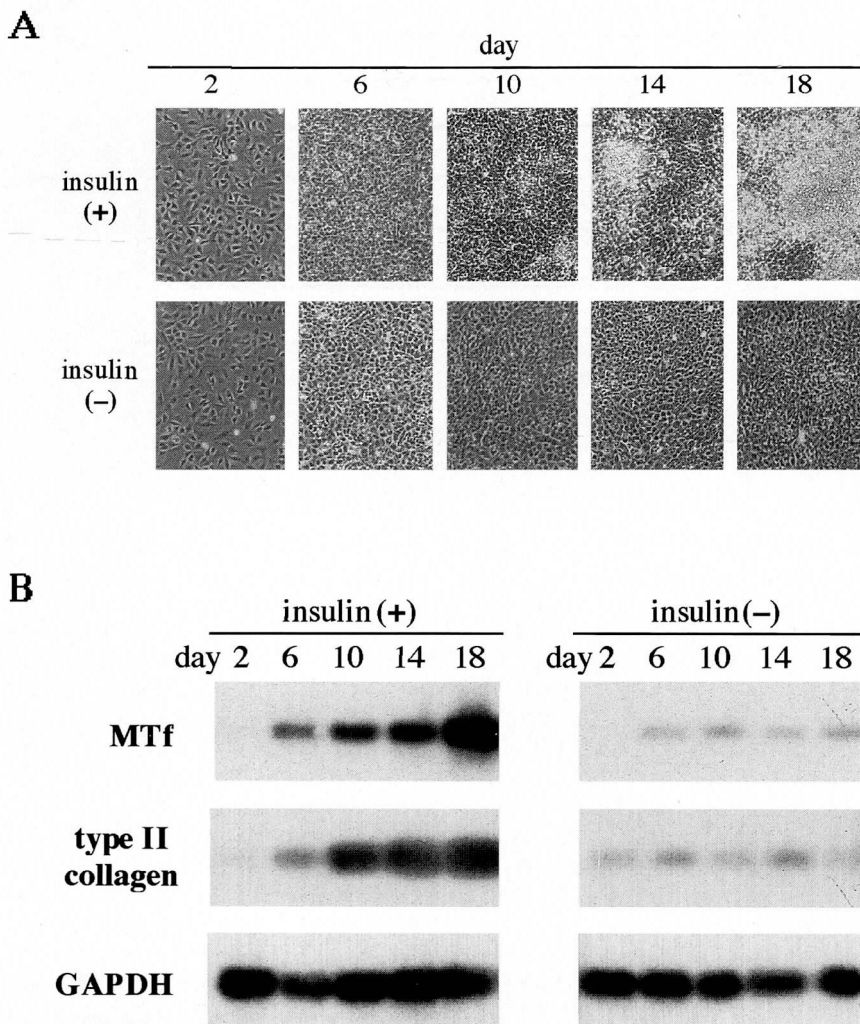


図3 ATDC5細胞培養系での培養2, 6, 10, 14, 18日目における細胞形態変化の観察(A)とMTf mRNAの発現(RT-PCRサザン法)(B)。

養6日目以降にはわずかに検出されたが、その発現量は増大しなかった。

4. マウス MTF 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

マウスの肝臓からゲノムDNAを抽出してライブラリーを作製し、マウス MTFcDNA をプローブに用いてスクリーニングを行った。得られたゲノムクローンを *Bam*HI, *Eco*RI, *Sa*II で消化し、各クローンの断片を検討して、制限酵素地図を作製した(図4)。また、全て

のエクソンおよびエクソン-イントロン境界部の塩基配列を決定した(表1)。その結果、得られたゲノムクローンは、MTF 遺伝子の全長をカバーしており、MTF 遺伝子は全長約 26 kb で、16個のエクソンからなっていることがわかった。

5. MTF 遺伝子のサザンブロット解析

図5に見られるように、ハイブリダイズした *Bam*HI 消化断片は、11.5, 4.8 および 1.3 kb, *Eco*RI 消化断片は、11.0, 5.5, 2.0, 1.9 および 1.1 kb, そして *Sa*II 消化

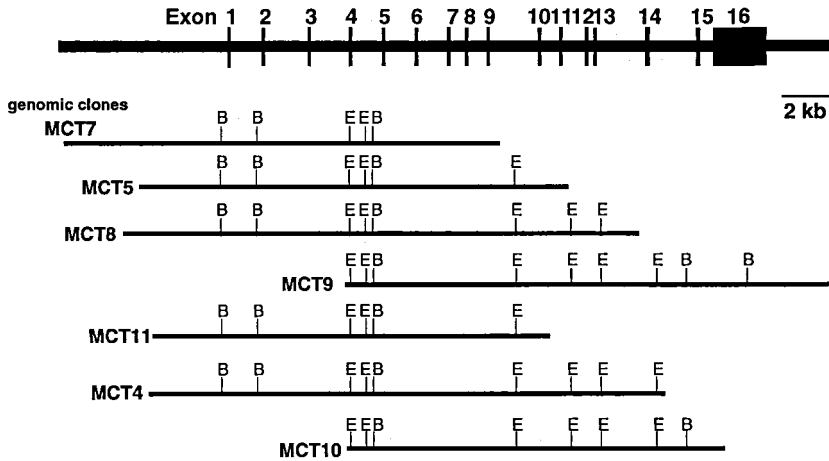


図4 マウス MTF 遺伝子の制限酵素地図と単離されたゲノムクローン。
B: *Bam*HI, E: *Eco*RI

表1 マウスの MTF 遺伝子のエクソン-イントロン境界配列

Exon number	Intron	Exon	Intron	size (bp)	
				Exon	Intron
1	TGCGCACTG	g t g a g a g t g t	208	1147
2	t g c c c c a c a g	TCGTCTTGT....CTCATCAAG	g t g a g g c c t c	155	*1500
3	t c t c c a t t a g	GAACAAAAA....ATGACCAAG	g t a a g g g t c c	100	*1400
4	c c c c t c c t a g	ACATTGGGA....TGCTCAAAG	g t g a g a a t t t	183	*1000
5	c g t c c c a c a g	CCGTTGGTG....AGCCTCCG	g t g a g g g g g g	157	*1100
6	t c c t a t g c a g	GTGCCTGGC....ATACTGATG	g t g a g g g g c g	68	*1100
7	t a c c t t c c a g	GAAACACCC....GAAGGCCAG	g t g a g g t g g c	188	*500
8	t c a c a c a c a g	CTTCTGTTC....ATCCCAACC	g t g a g t c c t c	181	*600
9	c c c t a c a c a g	GGCTGCCCC....CAAATCCAG	g t g c g c t g c c	152	*1700
10	t c c c c t g c a g	GCTGGGCAC....TGTATGCTG	g t g c g t a t t c	97	*700
11	c t c c t t g c a g	AGGAGGACA....TCCTCACAG	g t a t c g c c c t	195	*800
12	t c t g c c c c a g	CGGTGAGCC....GGCCTTCAG	g t a c t t g g t g	157	97
13	g t g t t g c a c a g	GTGCCTTTG....ACACAAATG	g t a c g t g a g g	68	*1900
14	t g t c c c t c a g	GTCACAATC....AAGGCCCAG	g t a a g c c a a g	188	*1600
15	a t g t t t c c a g	GACCTGTTT....CCGGTGCAG	g t a g g g g a g c	199	514
16	c c a t c c c c a g	GGGCCGCGG....		1876	

*印はおよその長さ。

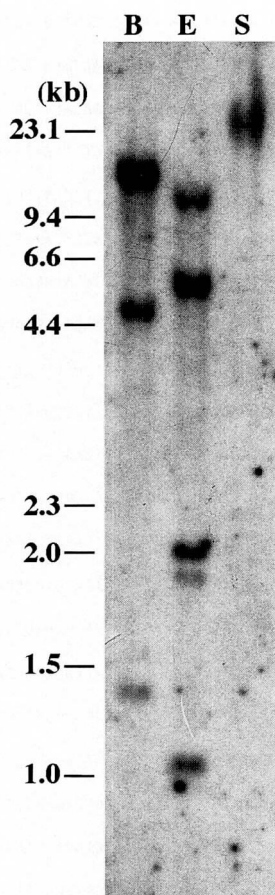


図5 マウスMTf遺伝子のサザンプロット解析。
B: *Bam*HI, E: *Eco*RI, S: *Sal*I. 左端にサイズマーカーを示す。

断片は約 26 kb であった。これらのハイブリダイズしたバンドの DNA 鎖長は、MTf 遺伝子の制限酵素地図から予測される長さと一致していた。これらの結果から、MTf 遺伝子はマウスゲノムあたり 1 つであると考えられた。

6. 転写開始点の決定

マウス MTf 遺伝子の転写開始点を決定するために、プライマー伸長法を行った。

その結果、翻訳開始コドンの ATG の A から 158 bp 上流の G の位置にバンドが検出され (図 6)、この位置を転写開始点と判断した。

7. マウス MTf 遺伝子の 5' 上流領域の構造解析

MTf 遺伝子の 5' 上流約 2.5 kb にわたって塩基配列を決定した (図 7)。そしてこの領域において、既知の転

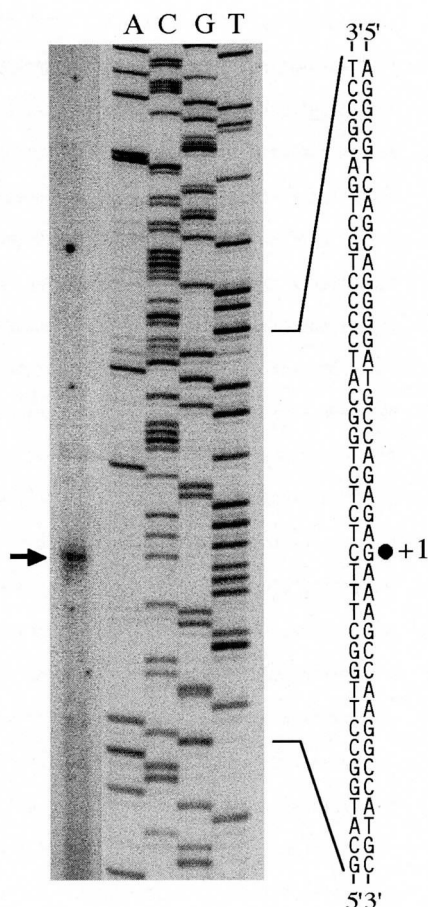


図6 プライマー伸長法によるマウス MTf 遺伝子の転写開始点の決定。
矢印はプライマーの伸長によって得られた DNA 断片の位置を示す。

写因子の結合部位コンセンサス配列のデータベース検索を行った。

その結果、転写開始点近辺の上流領域では典型的な TATA ボックスは存在しなかった。また、同領域に GC ボックスに類似した配列および CCAAT ボックス配列が見出された。その他に、この 2.5 kb の領域には AP1, SOX, Oct, cAMP 応答エレメント結合蛋白といった転写因子の結合部位に類似した配列が見出された (図 7)。また、軟骨特異的に発現する II 型コラーゲン遺伝子および X 型コラーゲン遺伝子のサイレンサー領域に見られる配列も見出された。

8. 系統進化過程におけるトランスフェリンファミリー内の MTf の位置付け

軟骨から精製、クローニングされたウサギおよびマウス MTf は、アミノ酸配列の比較の結果、ヒトのメラ

```

-2542 TTAGGAACCTTAGTATTTATCCAGCACAGACATTTTCACTTATACTTGTCTCTGCCTCAGTCAGTGGTTAGTAATAGGTTTTGTTGAACGTGGAATAA
      API
-2442 TTTTTAAAGAACTATTGGAAATATGAACAACAACCTCACATCTATTACCTTGTAACAATTAATGTACACTCCTCTCAATATAAAAATACGTGCAAGTCGGCAC
-2342 ATGGAACAAATGCGATGTGGAAAGTTGCTAATGAGCGCACAGGGGAGCTTTCTCTGAGGAAAGATGAGTGATCTAATCTCTGAGACACTCGCTTTGGGCTGT
      SOX API
-2242 CTAATAATTAGACTTGTCTCAGCTCCAGATGAGGACGCTAGAGCGGTGTGCCGAAACGCGCCATATGTCGCCGAGTGGGAGTCTCTACAAAAAGATTTTTCT
      CHS
-2142 AAATCTTGTGAGTGTCTAATTAATAAAATACCTACTCTCCCTAGTGGTATTAAAGACTGGAAAGAGACAGTTTCTCTGAGGATAGCTCCATTTCTCTGAACATC
-2042 CCTGCTTGGTTGGTGGGCTTTACCTGACACTAAATCTGCTTTCTCCCATGGCCCTATCCACAGATGCTCTCCAGGTACCTCAAATTCAACACATG
-1942 TGACTTTGGCATGTCCCGACTTTTCAGTCACCAAATACTAATCTTCCCGTACACCCCACCTTTTCTTACTGGTATCACTGGTCCAGGCCCGCTCCACGGA
      API
-1842 TTACAACAGTCTTTAAATGCCAGGGGTTGGTTCAAAAGTTGTACTGGCTGATCCGGCTATCACAGACGACTTCTTGTAGGAAAGGCAGGGAGTTT
-1742 GGAGAGGGTCAAAGCATATCTACAGCTGGATGGTGTGCGCTGGTGGACGGACCTTCTCTCCAGCCAGCTTATCACTCTAACGTGCTCTTGTGACTTCT
      SOX
-1642 GGCACGGGTAGTAGTAGGGAACAAGAGGACACAGCACAGGACATTCTGTCTCAGCCTAGACCAGCAGACGACTTACAGACTGGCAGAGTGAATGGTGC
-1542 CCTGCCGGTAGCGCATTGAAGGCTAGCTCCCTCTACCTGAGGATTTCTTTATGTAATAACAGGACTGAGACCTGTTGATAACAGGACATTCCACCATC
      SOX
-1442 ACTTCCAGCTCCACAAGTTCAGGCTCTTAGAACCTCAGGGACCGTCTCTGTGGGACTGCTTAGCCAAAATCTAGGCTGCTGGTCTTGAGCCATGAG
-1342 TAGTAGATAGAGGGATGGCTCCAGGGGGTCCCTGCAAGTGTATCCAGGGAAGAGAACTGTGTGAAAAGAGATGAAAATCAGTGCCAAATGCACTTCA
      Oct
-1242 TCAACTGGTCAGACTTCAAGAAAGTCTAATGCCAGGCAGCTACTGTCAAGTATTTAAAAACAGTCACAATGTGGGAAAAGATCTCCAGGCCAACAGTC
      API SOX
-1142 AGTCCAATCCACCAATTGCATGTGTTCAAGATAGCTCAAGGTGCTACTACATAGAAAATCTTCTACAGAGCAGCATGTGACTATGAGGGTGGCTTCTATA
-1042 GCTAAAAAGGCCTAGAGACTCTGCCGAAAGCGTAAAGATCAGCAGGCCATGCAGTACATGTGACATCTCCTTTAGGAATGGATAGCAGTCTAGGATATCC
-942 AGAAGAGGAAGAGTTTGGGATAATCATGCTGGGGGATTTGGGTGTCCATAGATAGCAAAATGGTACCAGGTCATTAACAACCTTCACTCTCAGCTTTC
-842 CGCATAGAAATATTAGATTGCAAGTATTGCTTTTTATCTCCCCATTAAAGGAGACATCCCTGTGTGATTAACATTCTCTGGATCTCTTGGTCTCTCTG
      Oct
-742 TGAGACAAAGGCCCTGTGCTCAACTGCTGCCAGCCTGATGATCTGAGCTTGGTCCCTGGAAATCCACCTGGTGGAAAGGGGAGGACCGACTCCACACA
-642 AGTTGTTCTCTGACCTCCACAAACAGCACAGCACAGAAAAATAAATAAATAATGAAAAATATTTAAAGATCACACACCGAGGACCTAGATTCTCTGGC
      CXS
-542 CAGGCCCTTAGCCCTCACCATACCACTGCAGCTGCTCAGCAATGCCCTGGGGAGCAGCCTCATCCGGGCCATGGCCAAATCTCATTGTTTTGCCCTCAGC
-442 AGCACCAGTTGTTAGTCAAGGTTGTGCATTAGTTATAAAAATCTATTGCCACTCGGAAAAGTAACCTTCTGTAATAGTGTAACTGCCAACTAGACA
      API CRE API
-342 CAGTCTAGAGAACTAAGAGATGAGTCTCTGAGAAAGGTCTGCAAAATCATGGATCCATCCTCGAGTGTGATGATGCAATTGTGTGAAAGGGAAGGTAG
-242 CAGTGAATTAAGGGACCGACTTTCCCGAGGCTCAGACTCGACCTTCCAATTATTTTCTTCCAAITTCGAATGTGTCCTGTCCAGTAGAATGTGACAT
      CAAT box CAAT box CAAT box
-142 TGGAGTCCTTAGCACAGAAAAGGATGGTCTGAAATGGCAAATTGTTGAGGACAGAGAGCCAGGGAGTAGCTAGGTCGGGTCAGCAACCTTGGACCGGC
      SOX GC box GC box
-42 CGGCAGGGGGCAGAGGAGGCGTCAAGCAGGGGATGCCAGAGAGAAAGCCAAAGGCCATGCTGGTCAAGCTAGTGTGTTCAAGTGCAGGGTGTGTTGAGGGGCGT
      GC box +1
58 GGACTCTCCCGGGCTGCGCTTAAATAGTGAAGGCCAGAGAGACCAAGGAAAGGAAAGCCAGGACAGACCCGCCAGCACCAGCCAAACCGTTGGC
158 ATGAGGCTCTGAGCGTGACTTTTTGGTACTCTGTCCTGCGCACTG.....
MetArgLeuLeuSerValThrPheTrpLeuLeuLeuSerLeuArgThr

```

図7 マウス MTF 遺伝子の 5' 上流領域に塩基配列。

API : API 結合部位のコンセンサ配列, SOX : SOX 蛋白質結合部位のコンセンサ配列, Oct : オクタマー配列, CRE : cAMP 応答配列 : CHS : II 型コラーゲン遺伝子のサイレンサー配列内に見出される配列, CXS : X 型コラーゲン遺伝子のサイレンサー配列内に見出される配列。二重下線部は転写開始点を示す。

ノーマ特異的抗原として精製, クローニングされた p97, およびニトリの好酸球特異的な抗原として精製, クローニングされた EOS47 と, オソログであると考えられている^{3,9)}。また, MTF は一次構造の類似性から, 血清トランスフェリン, ラクトフェリンおよびオボトランスフェリンとともにトランスフェリンファ

ミリーを形成している。

そこで, トランスフェリンファミリーの系統樹を作製し (図 8), 系統進化過程におけるトランスフェリンファミリー内の MTF の位置付けを検討した。

その結果, MTF は他のトランスフェリンファミリーと共通の分子を祖先とするが, 他の 3 つのサブファミ

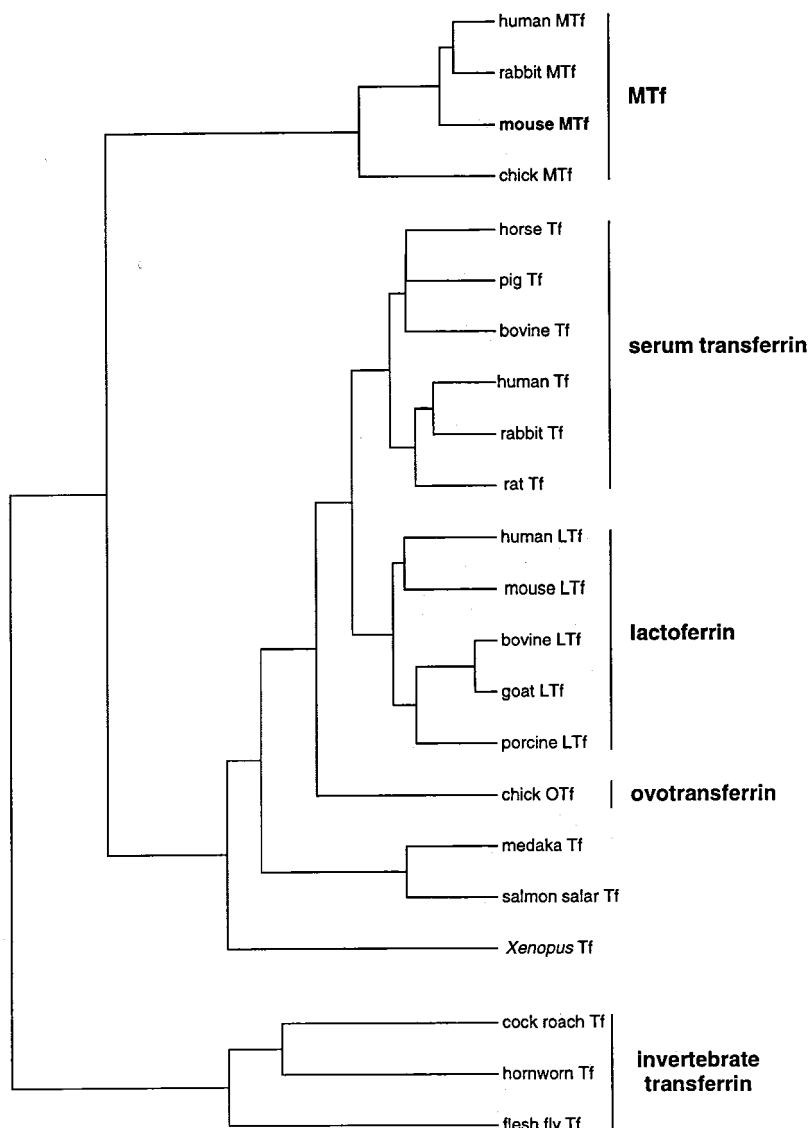


図8 トランスフェリンファミリーの系統樹.

リーとは異なるサブファミリーを形成し、この分岐は他の3つのサブファミリーの分岐以前に生じたことが示された。

9. MTf とその他のトランスフェリンファミリーの遺伝子構造および鉄結合に関与するアミノ酸残基の比較

MTf 以外のトランスフェリンファミリーの遺伝子構造は、ヒト血清トランスフェリン¹⁸⁾、ウサギ血清トランスフェリン、ウシ胎児ラクトフェリン¹⁹⁾、ニワトリオボトランスフェリン²⁰⁾ およびメダカトランスフェリ

ン²¹⁾ で報告されている。それらは全て、エキソンの数は17個で、よく似た構造をとっている。それらと共通の構造が MTf 遺伝子にも存在するかを検討した。

図9の模式図からもわかるように、MTf 遺伝子では、第2エキソンから第8エキソンまでと第9エキソンから第15エキソンまでが互いに類似しており、他のトランスフェリンファミリーと同様にエキソン単位で分子内に2つの繰り返し構造を有していた。このことから、MTf 遺伝子は他のトランスフェリンファミリーと共通の原始遺伝子が遺伝子重複を起こし、現在の遺伝子が生じたと考えられた。また、MTf 遺伝子のエキソン数

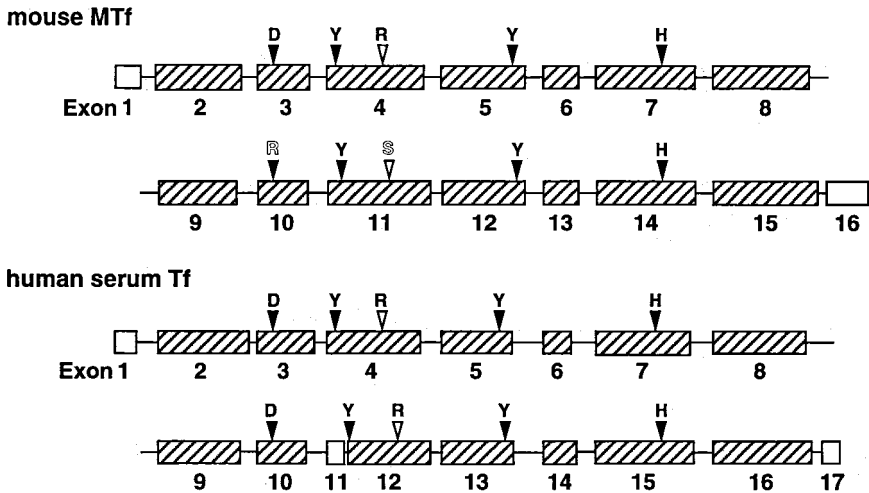


図9 マウス MTF 遺伝子とヒト血清トランスフェリン遺伝子の構造を比較した模式図。

斜線のボックスは対応したエクソンと類似しているエクソン、白抜きボックスは類似性の無いエクソンを示す。▼印は鉄結合アミノ酸残基の位置、▽印は鉄結合に必要なアニオンが結合するアミノ酸残基の位置を示す。白抜きの文字は鉄結合に関与するアミノ酸残基と異なることを示す。

表2 各種トランスフェリンファミリー構成員の鉄結合に関与するアミノ酸残基の比較

Protein	Source	repeat 1 (N端側ドメイン)	repeat 2 (C端側ドメイン)
MTF	mouse	D Y R Y H	R Y S Y H
	human	D Y R Y H	S Y S Y H
	rabbit	D Y R Y H	N Y S D H
	chick	D Y R Y R	G Y R Y Q
serum transferrin	mammal	D Y R Y H	D Y R Y H
lactotransferrin	mammal	D Y R Y H	D Y R Y H
ovotransferrin	chick	D Y R Y H	D Y R Y H

太字はトランスフェリンファミリー内で保存されているアミノ酸残基を示す。

は他のトランスフェリンファミリーより1つ少ないが、これは、他のトランスフェリンファミリー遺伝子の第11エクソンに相当するエクソンが存在しないためであった。MTfサブファミリーの第16エクソンはGPIアンカーを形成する部位を含んでおり、その他のトランスフェリンファミリーの最終エクソンと類似性はなかった。また、トランスフェリンファミリーには2つの繰り返し構造のそれぞれが鉄結合ドメインを含んでいる。MTfサブファミリーでは、鉄結合に関与するアミノ酸残基はN端側ドメインでは保存されていたが、C端側ドメインでは保存されていなかった(表2)。

考 察

本研究では、マウス MTF 遺伝子をクローニングするために、まずマウス MTF cDNA をクローニングし、ま

た、その mRNA の発現を検討した。続いて5'上流領域を含む遺伝子のクローニングと構造解析を行った。

MTfはメラノーマ細胞で高レベルに発現し^{4-6, 22, 23}、胎児や新生児の動物の小腸上皮⁷、脳の毛細血管内皮⁸および未成熟好酸球⁹の画分にある程度発現しているが、ほとんどの正常成体組織においては非常に低レベルであると報告されていた^{4-6, 22, 23}。しかし最近 Kawamoto らは、MTfは4週齢のウサギ軟骨において、小腸と脳を含む他の組織よりも著しく高レベルに発現していることを報告した³。

マウスにおいても MTf mRNA は、軟骨で他の組織と比較して高レベルに発現していた。そして、マウスでは MTf mRNA は精巣においても検出された。また、軟骨形質を誘導できる ATDC5 細胞においては、MTf mRNA は軟骨形質の発現を誘導したときに、II型コ

ラーゲンと類似した時間経過で発現した。また、Kawamotoらは、各種軟骨組織におけるMTf mRNAは、関節軟骨、静止軟骨および成長板軟骨のいずれにも発現していたが、成長板軟骨においては肥大層でMTf mRNAの発現が低下すると報告している³⁾。これらの知見から、MTf mRNAの発現は、軟骨細胞の形質発現、特に最終分化以前の段階の形質発現に関連していることが示唆された。

本研究の結果から、トランスフェリンファミリーの進化過程において、他の3つのトランスフェリンサブファミリーの分岐以前に、MTfはそれらと分岐したことが示された。また、MTf遺伝子は他のトランスフェリンファミリーの遺伝子と同様な繰り返し構造を有し、イントロン挿入部位も類似しているが、MTf遺伝子は他のトランスフェリンファミリーの遺伝子よりもエキソン数は1つ少なかった。また、MTfはC末端部にGPIアンカーを形成する部位を持ち、鉄結合に関与するアミノ酸残基はC末端側ドメインで一部が他のトランスフェリンファミリーと異なっていた。これらの結果とMTfの存在様式および軟骨における発現パターンから、MTfは鉄輸送以外の機能を担っていることが示唆された。

アグリカン、リンクプロテイン、II型、X型およびXI型コラーゲンなど軟骨細胞外基質の分子のいくつかは、軟骨にかなり特異的に発現している。これらの分子は、ある種の軟骨以外の組織でもわずかに発現しているが、軟骨細胞のマーカーとして広く用いられている²⁴⁾。本研究では、マウスMTf遺伝子の5'上流領域において、II型コラーゲンおよびX型コラーゲンの遺伝子に存在する調節エレメントと類似の配列が見出され、MTf遺伝子の5'上流領域にも軟骨特異的なエレメントがあることが示唆された。軟骨細胞のマーカーとして用いられている軟骨基質分子の遺伝子解析は、軟骨特異的な遺伝子発現調節のメカニズムに関して重要な知見をもたらしてきた²⁵⁾。一方、MTfは軟骨において発現が増強されている最初に発見された軟骨細胞膜のタンパク質である³⁾。MTf遺伝子の発現調節の解析は軟骨特異的な遺伝子発現調節のメカニズムの解明に新たな知見を与えるものと期待される。

結 論

1. マウスMTf mRNAは、軟骨と精巣に発現しており、ATDC5細胞培養系において、軟骨基質の発現誘導時に発現していた。
2. マウスMTf遺伝子は16個のエキソンからなり、全長は約26 kbであった。
3. マウスMTf遺伝子の5'上流領域で、軟骨特異

的なII型コラーゲンおよびX型コラーゲンの遺伝子に存在する調節エレメントと類似の配列などが見出された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学歯学部口腔生化学講座加藤幸夫教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文作成上、御助言、御校閲を賜りました本学歯科薬理学講座土肥敏博教授、本学歯科保存学第二講座栗原英見教授に深謝致します。

また、本研究遂行上、終始御指導、御鞭撻を頂いた本学口腔生化学講座河本健博士、能城光秀助教授、藤本勝巳博士、来田吉弘先生、申鳴先生、白求恩医科大学地方病研究所生化学研究室Weiquin Yan教授、東京慈恵会医科大学整形外科小谷野康彦先生に深謝致します。

最後に本研究を進めるに際し、多大なる御支援を頂いた本学口腔生化学講座の関係者各位に感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Yan, W., Nakashima, K., Iwamoto, M., and Kato, Y.: Stimulation by concanavalin A of cartilage-matrix proteoglycan synthesis in chondrocyte cultures. *J. Biol. Chem.* **265**, 10125-10131, 1990.
- 2) Yan, W., Pan, H., Ishida, H., Nakashima, K., Suzuki, F., Nishimura, M., Jikko, A., Oda, R., and Kato, Y.: Effects of concanavalin A on chondrocyte hypertrophy and matrix calcification. *J. Biol. Chem.* **272**, 7833-7840, 1997.
- 3) Kawamoto, T., Pan, H., Yan, W., Ishida, H., Usui, E., Oda, R., Nakamasu, K., Noshiro, M., Kawashima-Ohya, Y., Fujii, M., Shintani, H., Okada, Y., and Kato, Y.: Expression of membrane-bound transferrin-like protein p97 on the cell surface of chondrocytes. *Eur. J. Biochem.* **256**, 503-509, 1998.
- 4) Woodbury, R.G., Brown, J.P., Yeh, M.Y., Hellström, I., and Hellström, K.E.: Identification of a cell surface protein, p97, in human melanomas and certain other neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 2183-2187, 1980.
- 5) Brown, J.P., Wright, P.W., Hart, C.E., Woodbury, R.G., Hellström, K.E., and Hellström, I.: Protein antigens of normal and malignant human cells identified by immunoprecipitation with monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **255**, 4980-4983, 1980.
- 6) Dippold, W.G., Lloyd, K.O., Li, L.T., Ikeda, H., Oettgen, H.F., and Old, L.J.: Cell surface antigens of human malignant melanoma: definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 6114-6118, 1980.

- 7) Danielsen, E.M., and van Deurs, B.: A transferrin-like GPI-linked iron-binding protein in detergent-insoluble noncaveolar microdomains at the apical surface of fetal intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* **131**, 939–950, 1995.
- 8) Rothenberger, S., Food, M.R., Gabathuler, R., Kennard, M.L., Yamada, T., Yasuhara, O., McGeer, P.L., and Jefferies, W.A.: Coincident expression and distribution of melanotransferrin and transferrin receptor in human brain capillary endothelium. *Brain Res.* **712**, 117–121, 1996.
- 9) McNagny, K.M., Rossi, F., Smith, G., and Graf, T.: The eosinophil-specific cell surface antigen, EOS47, is a chicken homologue of the oncofetal antigen melanotransferrin. *Blood.* **87**, 1343–1352, 1996.
- 10) Rose, T.M., Plowman, G.D., Teplow, D.B., Dreyer, W.J., Hellström, K.E., and Brown, J.P.: Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 1261–1265, 1986.
- 11) Baker, E.N., Baker, H.M., Smith, C.A., Stebbins, M.R., Kahn, M., Hellström, K.E., and Hellström, I.: Human melanotransferrin (p97) has only one functional iron-binding site. *FEBS Lett.* **298**, 215–218, 1992.
- 12) Atsumi, T., Miwa, Y., Kimata, K., and Ikawa, Y.: A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell. Differ. Dev.* **30**, 109–116, 1990.
- 13) Smale, G., and Sasse, J.: RNA isolation from cartilage using density gradient centrifugation in cesium trifluoroacetate: an RNA preparation technique effective in the presence of high proteoglycan content. *Anal. Biochem.* **203**, 352–356, 1992.
- 14) Metsaranta, M., Toman, D., de Crombrughe, B., and Vuorio, E.: Mouse type II collagen gene. Complete nucleotide sequence, exon structure, and alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **266**, 16862–16869, 1991.
- 15) Sabath, D.E., Broome, H.E., and Prystowsky, M.B.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA is a major interleukin 2-induced transcript in a cloned T-helper lymphocyte. *Gene.* **91**, 185–191, 1990.
- 16) Triezenberg, S.J.: Primer extension. in *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidmen, J.A. Smith and K. Struhl, F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidmen, J.A. Smith and K. Struhl). Vol. 1, John Wiley & Sons, New York, 4.8.1–4.8.5., 1987
- 17) Food, M.R., Rothenberger, S., Gabathuler, R., Haidl, I.D., Reid, G., and Jefferies, W.A.: Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 3034–3040, 1994.
- 18) Park, I., Schaeffer, E., Sidoli, A., Baralle, F.E., Cohen, G.N., and Zakin, M.M.: Organization of the human transferrin gene: direct evidence that it originated by gene duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 3149–3153, 1985.
- 19) Seyfert, H.M., Tuckoricz, A., Interthal, H., Koczan, D., and Hobom, G.: Structure of the bovine lactoferrin-encoding gene and its promoter. *Gene.* **143**, 265–269, 1994.
- 20) Jeltsch, J.M., Hen, R., Maroteaux, L., Garnier, J.M., and Chambon, P.: Sequence of the chicken ovotransferrin gene. *Nucleic-Acids-Res.* **15**, 7643–7645, 1987.
- 21) Mikawa, N., Hirono, I., and Aoki, T.: Structure of medaka transferrin gene and its 5'-flanking region. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **5**, 225–229, 1996.
- 22) Brown, J.P., Woodbury, R.G., Hart, C.E., Hellström, I., and Hellström, K.E.: Quantitative analysis of melanoma-associated antigen p97 in normal and neoplastic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 539–543, 1981.
- 23) Woodbury, R.G., Brown, J.P., Loop, S.M., Hellström, K.E., and Hellström, I.: Analysis of normal neoplastic human tissues for the tumor-associated protein p97. *Int. J. Cancer.* **27**, 145–149, 1981.
- 24) Linsenmayer, T.F.: Collagen. in *cell biology of extracellular matrix* (E.D. Hay, E.D. Hay). Plenum publishing Co., New York, 7–44, 1991
- 25) Mundlos, S., and Olsen, B.R.: Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways. *FASEB J.* **11**, 125–132, 1997.