

Spot 35/calbindin D 28 k 遺伝子の解析

新潟大学遺伝子実験施設

桑野良三

Expression of the Spot 35/calbindin D 28 k gene

Ryozo KUWANO

*Research Laboratory for Molecular Genetics,
Niigata University*

Spot 35 protein was first discovered from the cerebellum as a specific protein. Immunohistochemistry demonstrated wide distribution of this protein in the Purkinje cells, intestine, sensory organs and kidney. cDNA cloning and nucleotide sequence showed that Spot 35 protein is identical with calbindin D 28 k, a vitamin D dependent calcium binding protein. Two vitamin D response elements (pDRE and dDRE) were found in the 5' upstream region of the Spot 35/Calbindin D 28 k gene. Promoter activities were determined by using luciferase as a reporter gene in MDBK cells which produced endogenously Spot 35/Calbindin D 28 k. Transcription of the chimeric gene containing the pDRE was enhanced by 1, 25 (OH)₂D₃ stimulation in an orientation-dependent fashion.

Key words: cerebellum, calcium binding protein, transcription, vitamin D response element
小脳, カルシウム結合蛋白, 転写, ビタミンD応答配列

はじめに

生体の機能を知るために、構成する個々の器官に分けてそれぞれの持つ箇有の性質を明らかにしていき、ついで、それらを統合して全体像を組み立てるやり方がある。神経系の箇有の性質を解明する一つのアプローチとして、特異蛋白を探し、蛋白化学、生物活性を明らかにし、その遺伝子が神経系で発現する必然性を追究する研究が行なわれている。つまり固有の蛋白の発現はその細胞の形態や機能を分化させるとの考えに基づいている。ここで

は小脳特異的蛋白として発現された Spot 35 蛋白を紹介する。

Spot 35 蛋白

ラットの脳を大脳、小脳、脳幹部に分けて調製した可溶性蛋白を2次元電気泳動で分析したところ、部位により発育に伴って増加したり、減少する蛋白、一過性に出現する蛋白が存在するを見いだした¹⁾。2次元電気泳動で分離された蛋白をCBBで染色し、蛋白スポットに任意の番号をつけて解析した(図1)。これらの蛋

Reprint requests to: Ryozo KUWANO
Research Laboratory for Molecular
Genetics, Niigata University
Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学遺伝子実験施設 桑野良三

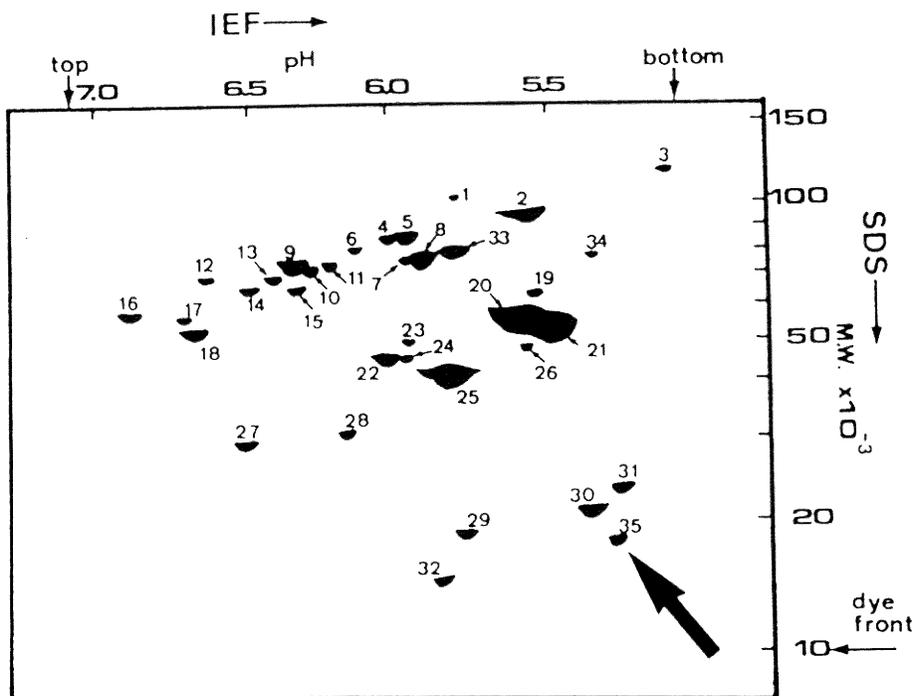


図 1 脳可溶性画分の 2 次元電気泳動
矢印が Spot 35 蛋白

白のうち Spot 35 と名付けた蛋白を精製した。この蛋白は分子量 28,000, pI 5.3 の EF ハンド型のカルシウム結合能を有する新しい蛋白で、小脳に特異的に存在し、生後10日頃から増加することが分かった¹⁾²⁾。

Spot 35 抗体を用いた免疫組織化学による検索から、小脳プルキンエ細胞にこの蛋白が局在することが明らかになった。また、小脳以外でも腎臓、感覚器などのある特定の細胞に局限して存在することがわかった^{3)~5)}。

一方、ビタミンD依存性に誘導されるカルシウム結合蛋白の研究から分子量 9k と 28k の蛋白が小腸、腎臓に見つかり各々 Calbindin D 9k, Calbindin D 28k と名付けられた。Calbindin D 28k 遺伝子は腎臓においてビタミンDに反応して誘導が観察されるが、小脳においては非依存性に発現している。その後、cDNA クローニングと構造解析から Calbindin D 28k は Spot 35 蛋白であった^{6)~9)}。以下、この蛋白を Spot 35/Calbindin D 28k とよぶこととする。

遺伝子のクローニング

クローニングした cDNA をプローブに用いて脳の部

位別の mRNA の定量、発育に伴う変化を測定した^{10)~12)}。免疫組織化学で Spot 35/Calbindin D 28k 蛋白の局在を明瞭に染色することができ、どの細胞で実際に Spot 35/Calbindin D 28k 遺伝子から mRNA に転写されているのかを *in situ* hybridization 法で観察した¹³⁾。Spot 35/Calbindin D 28k 蛋白の発現は、遺伝子の転写レベルで制御されていることが明らかになったので、遺伝子のクローニングとその構造を解析した。

マウス遺伝子ライブラリーからラット cDNA (pRS 35-7)⁸⁾ をプローブに用いて遺伝子を単離した。全長約 30kb あり、11のエクソンからなる遺伝子で、全体の構造は種を越えて良く保存されていた (図 2)。

遺伝子の発現調節機構を解析するうえで正確な転写開始点を決めることは重要である。cDNA の 5' 非翻訳領域から mRNA に相補的な 2 種類のオリゴヌクレオチドを合成した。これをプライマーに用いて、Spot 35/Calbindin D 28k を発現している小脳と腎および発現していない肝の mRNA を鋳型として逆転写反応を行った。このプライマー伸長法で得られた産物を、同一のプライマーによるシーケンシングと同時に泳動を

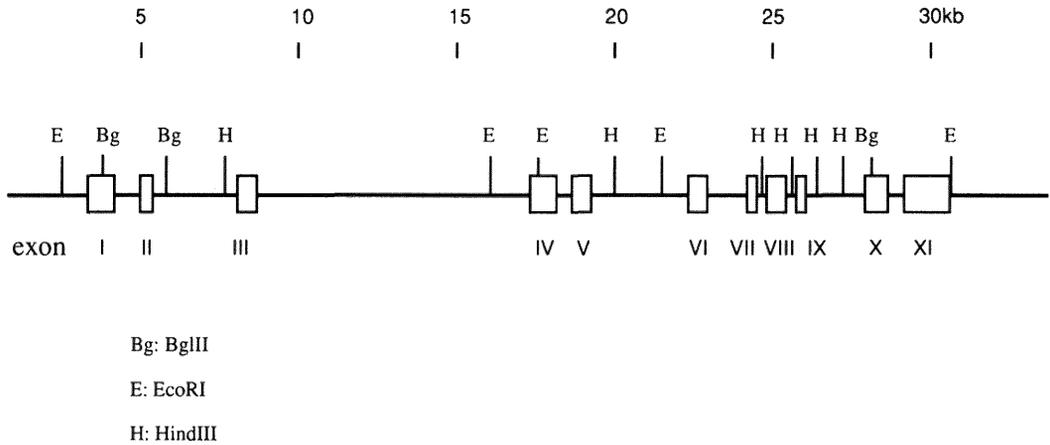


図2 Spot 35/Calbindin D 28 k 遺伝子の構造
エクソン11 (I~XI) からなる全長 30 Kb の遺伝子。

rat osteocalcin		GGGTGA	atg	AGGACA	(-460~-446)
human osteocalcin		GGGTGA	acg	GGGCA	(-499~-485)
mouse osteopontin		GGTTCA	cga	GGTTCA	(-757~-743)
pocine osteopontin		GGGTCA	tat	GGTTCA	(-2259~-2245)
rat calbindin-D9k		GGGTGT	cgg	AAGCCC	(-489~-475)
chickin calbindin-D28k		GGCTGA	aca	GGGACA	(-320~-306)
mouse calbindin-D28k	(pDRE)	AGGTGA	tga	AAGTCA	(-1160~-1146)
	(dDRE)	AGGTGA	aca	GGTTCA	(-2295~-2281, antistrand)

図3 ビタミンD応答配列
任意の3塩基の繰り返し配列の構造からなる。()内に応答配列の位置を示す。

行ない転写開始点を決めた。

転写開始点の上流 3.5 kb までシーケンスし、プロモーター領域を解析した。いくつかの特徴的配列が見られた。特に上流 2.4 kb にマウスゲノム中で 100~200 kb に1個存在し、約 400 bp からなる MT 配列があった。この MT 配列にどのような機能があるかについては現在不明である。それより下流に2箇所にビタミンD応答エレメント (DRE) を見だし、これらはいずれも梅園の提唱している3-4-5ルールを満たしていた¹⁾ (図3)。転写開始点から遠位にある DRE (dDRE) は逆方向であった。図3には他の遺伝子のビタミンD応答配列を示した。

ビタミン D 応答領域

暗がり飼育したビタミンD欠乏ラットの小脳では、ビタミンD欠乏状態でも Spot 35/Calbindin D 28 k mRNA は発現していたが、腎臓においては活性型ビタミンD (1, 25 (OH)₂D₃) の投与によって、Spot 35/Calbindin D 28 k 遺伝子の転写が誘導された。そのビタミンD応答に関する領域を決定するには、Spot 35/Calbindin D 28 k が本来発現している培養細胞で遺伝子発現を解析する必要がある。数種類の腎由来の樹立培養細胞のうち MDBK が、Spot 35/Calbindin D 28 k を内在性に発現していることをノーザン分析で見出した。塩基配列

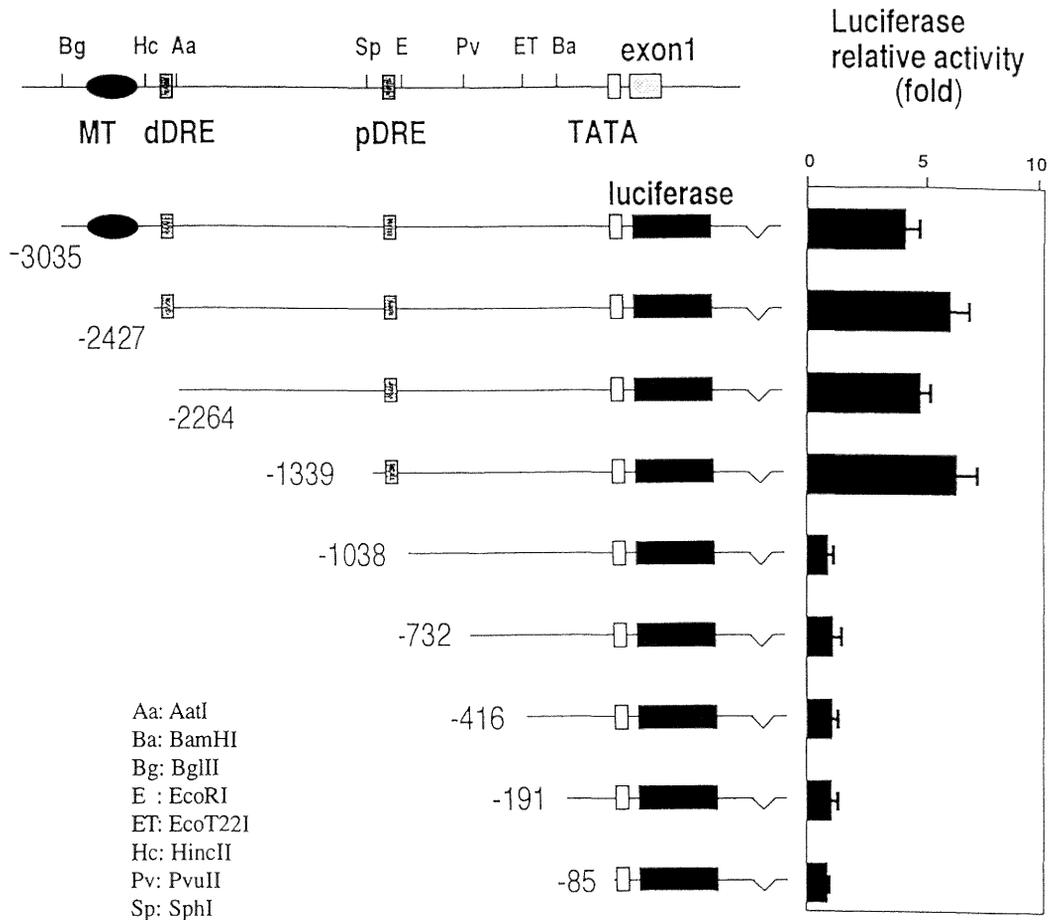


図 4 MDBK 細胞における Spot 35/Calbindin D 28 k 遺伝子の転写活性

第 1 エクソンの +93 より上流を含む DNA 断片 9 種類をルシフェラーゼ遺伝子に連結した。各々のプラスミドを電ポレーション法で MDBK 細胞に導入し、一過性に発現したルシフェラーゼの活性を測定した。無血清培地に 1, 25 (OH)₂D₃ を 10⁻⁷ M 添加した時の活性の増加を無添加時の活性に対して表した (棒グラフ)。

から予想されたビタミン D 応答配列が、実際にこの MDBK においてビタミン D に応答するかを検討した。

Spot 35/Calbindin D 28 k 遺伝子の転写領域を含む 5' 上流域に、レポーター遺伝子としてのルシフェラーゼを連結した融合遺伝子を、MDBK に電ポレーション法で導入して一過性発現系で転写活性を測定した (図 4)。牛胎仔血清中のビタミン D を活性炭で吸着した培地で MDBK を培養した後、無血清培地に置換して 1, 25 (OH)₂D₃ を 10⁻⁷ M 添加した。導入効率を補正するために一定量の β ガラクトンダーゼ遺伝子を同時に導入した。1, 25 (OH)₂D₃ の未添加のルシフェラー

ゼ活性に対して添加した場合の相対活性を図 4 の右に示す。右の棒グラフから明らかな様に、-1339 と -1038 の間にビタミン D に応答する領域の存在が示唆された。この領域に pDRE が含まれていた。上流の dDRE を含む領域はビタミン D の応答に変化がなかった。また更に MT は転写調節にどのように関与するかは不明である。

SV 40 のプロモーターを用いたヘテロの転写系で pDRE と dDRE による活性化の機構を調べたところ、pDRE だけが方向性を持ってビタミン D に応答して活性化を示した。

おわりに

Spot 35/Calbindin D 28 k は小脳、腎臓、感覚器の細胞など特定の細胞に局限し、ビタミンDに依存して遺伝子の発現が上昇する細胞と、そうでない細胞が明確に分かれて存在している。ビタミンD欠乏マウスにおいて、ビタミンDに反応して腎臓の遠位尿細管で Spot 35/Calbindin D 28 k の発現の上昇を観察した。マウス遺伝子をクローニングし、その構造と塩基配列を決定した。転写開始点の上流に2箇所ビタミンD応答配列(pDRE, dDRE)が存在することを見だし、腎由来の培養細胞MDBKにおいて、高感度のルシフェラーゼを用いた一過性発現系でpDREだけがビタミンDに反応することを確認した。Spot 35/Calbindin D 28 k 蛋白質は小脳の特異蛋白として発見されたが、一連の研究から、小脳以外にも特定の細胞に発現し、発現時期や部位によってその機能が異なることが推定された。組織・細胞レベルでの詳細な解析に基づいて、生体で本遺伝子の発現調節を観察する必要がある、トランスジェニックマウスあるいはノックアウトマウスを作出して、個体レベルで解析を始めている。

謝辞

本学の吉田と高橋が発見した Spot 35 蛋白質の研究は、新潟大学の多くの研究者、大学院生によって継続し発展している。本研究の糸口を与えて頂いた脳研究所の高橋康夫名誉教授、吉田豊講師(薬理学教室)に深謝しますと共に、学外からご指導いただいた免疫組織化学の近藤尚武教授(東北大学) in situ hybridization の渡辺雅彦助教授(北海道大学)トランスジェニックマウス作出の花岡和則教授(北里大学)の各先生に感謝致します。現在、Spot 35 蛋白質の遺伝子発現調節と機能の解析が大学院の風間順一郎君、竹田徹朗君、中嶋治彦君(第二内科)、藤原満君(耳鼻科)、白井学君(自然科学研究科)、伊藤康宏君(農学部畜産)達によって進められている。

参考文献

- 1) **Yoshida, Y. and Takahashi, Y.:** Compositional changes on soluble proteins of cerebral mantle, cerebellum, and brain stem of rat brain during development A two-dimensional gel electrophoretic analysis. *Neurochem. Res.*, **5**: 81~96, 1984.
- 2) **Yamakuni, T., Usui, H., Iwanaga, T., Kondoh, H., Odani, S. and Takahashi, Y.:** Isolation and immunohistochemical localization of a cerebellar protein. *Neurosci. Lett.*, **45**: 235~240, 1984.
- 3) **Hozumi, I., Iwanaga, T., Fujita, T., Yamakuni, T. and Takahashi, Y.:** A Purkinje cell-specific protein (Spot 35 protein) showing wide distribution in the endocrine system of some mammals. An immunohistochemical study. *Acta Histochem. Cytochem.*, **19**: 545~553, 1986.
- 4) **Iwanaga, T., Takahashi-Iwanaga, H., Fujita, T., Yamakuni, T. and Takahashi, Y.:** Immunohistochemical demonstration of a cerebellar protein (Spot 35 protein) in some sensory cells of guinea pigs. *Biomed. Res.*, **6**: 329~334, 1985.
- 5) **Yamagishi, M., Nakamura, H., Nakano, Y. and Kuwano, R.:** Immunohistochemical study of the fourth cell type in the olfactory epithelium in guinea pigs and in a patient. *ORL*, **54**: 85~90, 1992.
- 6) **Takahashi, Y., Yamakuni, T., Kuwano, R., Kumanishi, T. and Ohama, E.:** Gene expression of a rat cerebellar Ca-binding protein, Spot 35 protein. *Ca protein signaling* (ed. Hidaka, H.) 257~262, 1989.
- 7) **Yamakuni, T., Kuwano, R., Odani, S., Miki, N., Yamaguchi, Y. and Takahashi, Y.:** Nucleotide Sequence of cDNA to mRNA for a cerebellar Ca-binding Protein, Spot 35 Protein *Nucleic Acids Res.*, **14**: 6768, 1986.
- 8) **Yamakuni, T., Kuwano, R., Odani, S., Miki, N., Yamaguchi, K. and Takahashi, Y.:** Molecular Cloning of cDNA to mRNA for a Cerebellar Spot 35 Protein *J. Neurochem.*, **48**: 1590~1596, 1987.
- 9) **Hunziker, W. and Shrikel, S.:** Rat brain calbindin D28: six domain structure and extensive amino acid homology with chicken calbindin D28. *Mol. Endocrinol.*, **2**: 465~473, 1988.
- 10) **Yamakuni, T., Kuwano, R., Araki, K., Usui, H., Inoue, Y. and Takahashi, Y.:** Developmental and regional changes of mRNA for a cerebellar protein (Spot 35) in the rat brain. *J. Neurochem.*,

- 50: 282~284, 1988.
- 11) **Abe, H., Amano, O., Yamakuni, T., Kuwano, R., Takahashi, Y. and Kondo, H.:** Transient expression of a calcium-binding protein (Spot 35 calbindin) and its mRNA in the immature pituicytes of embryonic rats. *Cell Tissue Res.*, **266**: 325~330., 1991.
 - 12) **Abe, H., Watanabe, M., Yamakuni, T., Kuwano, R., Takahashi, Y. and Kondo, H.:** Localization of gene expression of calbindin in the brain of adult rats. *Neurosci. Lett.*, **138**: 211~215, 1992.
 - 13) **Usui, H., Katagiri, T., Yoshida, Y., Nishiyama, A., Ichikawa, T., Kuwano, R., Takahashi, Y. and Kumanishi, T.:** In situ hybridization histochemistry of Spot 35 protein, a calcium-binding protein, in the rat brain. *Mol. Chem. Neuropathol.*, **15**: 207~216, 1991.
 - 14) **Umesono, K., Murakami, K., Thompson, C.C. and Evans, R.M.:** Direct repeats as selective response elements for thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D₃ receptor. *Cell*, **65**: 1255~1266, 1991.
-