

ニンとの結合に関与している。従って、NC-1 ドメインの多様性を出すために、NC-1 ドメイン遺伝子に alternative splicing が生じている可能性がある。そこで、NC-1 ドメインに一致する各種 cDNA をクローニングし、alternative splicing 有無を確認した。

B. 研究方法

1) VII 型コラーゲン遺伝子の塩基配列

約 9kb の VII 型コラーゲン cDNA を制限酵素にて 1~2kb の断片に消化し、クローニングベクターに組み込み、塩基配列を決定した。

2) VII 型コラーゲンの NC-1 ドメインの機能の解析

すでにノーザンブロット法にて、VII 型コラーゲン mRNA バンドが単一であることが確認されているので、alternative splicing による産物は 500bp 以下の長さであることが予想された。そこで、有無を確認した。NC-1 ドメインに一致する cDNA を 300-500bp に分割し、それぞれを PCR で増幅した。そして、バンドが複数生ずるか確認した。また、alternative splicing が確認されれば、その部分部のゲノム DNA を、exon-trapping 用ベクターに組み込み、培養表皮細胞に導入し、alternative splicing の有無を確かめた。

C. 研究結果

1) VII 型コラーゲン遺伝子 cDNA 全長の塩基配列の確認

VII 型コラーゲン遺伝子 cDNA 全長約 9000bp あるが、その N 末端から 2200bp の部位に 27bp の挿入が見出された。その遺伝子配列を調べると、その挿入はスプライシングのアクセプター部位がイントロン側に移動することにより生じていた。尚、アミノ酸が新たに 9 加わるのみで、オープンリーディングフレームには影響はでなかった。また、その部の挿入を *in vitro* mutagenesis 技術で除去した。

2) VII 型コラーゲンの NC-1 ドメインの機能の解析

上記 1) の研究で、NC-1 ドメインに新しい alternative splicing が存在することが見出された。NC-1 ドメインは各種のコラーゲンやラミニンとの結合に関与している。そこで、他の alternative splicing が存在するかを検討した。

その結果、表皮細胞、線維芽細胞などでも、上記の 27bp の挿入は認められた。しかし、その他の部位には、alternative splicing は見つからなかった。また、培養表皮細胞に TGF- β を加えるとその alternative splicing が増加することが観察された。また、exon-trapping 法でもその 27bp の alternative splicing を確認した。

D. 考 察

一般に遺伝子は複製を繰り返すため、塩基に変異が組み込まれることがある。患者の治療に用いられる遺伝子は、言うまでもなく、いかなる塩基変異もあってはならない。今回、我々が作成した VII 型コラーゲン遺伝子 cDNA 全長に塩基の挿入が見つかったが、それが除去され、現在では安全な遺伝子であることが確認された。

近年、ヒトのすべてのゲノムの塩基配列が明らかにされ、以前は 10 万個と考えられた遺伝子数は、3 から 4 万と是正された。そして、数少ない遺伝子から、多機能をもつ蛋白質を作り出す 1 つの手段として、alternative splicing が注目されている。今回、我々の作成した VII 型コラーゲン cDNA に発見された塩基の挿入は、正常の細胞でも確認された。その alternative splicing は、蛋白では 9 アミノ酸の挿入を誘導した。さらに、細胞に TGF- β の添加でその alternative splicing が増加することは、その 9 アミノ酸の挿入が創傷治癒に関連していることが示唆された。

E. 結 論

栄養障害型の蛋白補充療法や遺伝子治療に用いることができる、VII 型コラーゲン遺伝子を作成し得た。また、VII 型コラーゲンの NC-1 ドメインに新規の alternative splicing を見出した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

研究発表や論文投稿準備中。

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表(雑誌)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
Akiyama M, Takizawa Y, Suzuki Y, Ishiko A, Matsuo I, <u>Shimizu H</u>	Compound heterozygous TGM1 mutations including a novel missense mutation L204Q in a mild form of lamellar ichthyosis	Journal of Investigative Dermatology	116	992-995	2001
Ishiko A, Akiyama M, Takizawa Y, Nishikawa T Shimizu Y <u>Shimizu H</u>	A novel leucine to valine mutation in residue 7 of the helix initiation motif of keratin10 leads to bullous congenital ichthyosiform erythroderma	Journal of Investigative Dermatology	116	991-992	2001
Akiyama M, Takizawa Y, Kokaji T, <u>Shimizu H</u>	Novel mutations of TGM1 in a child with congenital ichthyosiform erythroderma	British Journal of Dermatology	144	401-407	2001
McMillan J, <u>Shimizu H</u>	Desmosomes: structure and function in normal and diseased epidermis	Journal of Dermatology	28	291-298	2001
Sato- Matsumura KC, Yasukawa K, Tomita Y, <u>Shimizu H</u>	Toenail dystrophy with COL7A1 glycine substitution mutations segregates as an autosomal dominant trait in 2 families with dystrophic epidermolysis bullosa	Archives of Dermatology	138	269-271	2002
Yasukawa K, Sato- Matsumura KC, McMillan J, Tsuchiya K, <u>Shimizu H</u>	Exclusion of COL7A1 mutation in Kindler syndrome	Journal of the American Academy of Dermatology	46	447-450	2002

<u>Sawamura D</u> , Yasukawa K, Kodama K, Yokota K, Sato- Matsumura KC, Tanaka T, <u>Shimizu H</u>	The majority of keratinocytes incorporate intradermally injected plasmid DNA regardless of size but only a small proportion of cells can express the gene product	Journal of Investigative Dermatology (in press)			
Xianmin Meng, <u>Sawamura D</u> , Ina S, Tamai K, Hanada H, Hashimoto I	Keratinocyte gene therapy: cytokine gene expression in local keratinocytes and in circulation by introducing cytokine genes into skin	Experimental Dermatology (in press)			
Itai K, <u>Sawamura D</u> , Meng X, Hashimoto I	Keratinocyte gene therapy: inducible promoters and <i>in vivo</i> control of transgene expression	Clinical and Experimental Dermatology	26	531-535	2001
Okubo M, Tsurukubo Y, Higaki T, Kawabe T, Goto M, Murase T, Ide T, <u>Fruichi Y</u> , Sugimoto M	Clonal chromosomal aberrations accompanied by strong telomerase activity in immortalization of human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barrvirus	Cancer Genet Cytogenet	129 (1)	30-34	2001

Imamura O, Fujita K, Shimamoto A, Tanabe H, Ta keda S, <u>Furuichi Y</u> Matsumoto T	Bloom helicase is involved in DNA surveillance in early S phase in vertebrate cells	Oncogene	20 (10)	1143 -1151	2001
Kawabe Yi, Branzei D, Hayashi T, Suzuki H, Masuko T., Onoda F, Heo SJ, Ikeda H, Shimamoto A, <u>Furuichi Y</u>	A novel protein interacts with the Werner's syndrome gene product physically and functionally	The Journal of Biological Chemistry	276 (23)	20364- 20369	2001

研究成果の刊行物・別冊

20010869

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。