



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | ヒト血管型平滑筋アクチン遺伝子の5' 上流域の解析                                                                                                                       |
| Author(s)    | 中野, 芳朗                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1988, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/36025">https://hdl.handle.net/11094/36025</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【13】

|         |                                                    |
|---------|----------------------------------------------------|
| 氏名・(本籍) | なかのよしろう<br>中野芳朗                                    |
| 学位の種類   | 医学博士                                               |
| 学位記番号   | 第 8090 号                                           |
| 学位授与の日付 | 昭和 63 年 3 月 25 日                                   |
| 学位授与の要件 | 医学研究科生理系専攻<br>学位規則第 5 条第 1 項該当                     |
| 学位論文題目  | ヒト血管型平滑筋アクチン遺伝子の 5' 上流域の解析                         |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授 角永 武夫<br>(副査)<br>教授 松原 謙一      教授 中田 篤男 |

論文内容の要旨

〔目 的〕

近年、動脈硬化症において血管平滑筋細胞が重要な役割を果たしている事がわかってきている。血管型平滑筋アクチンは血管平滑筋細胞で特異的に見いだされ、細胞の収縮や運動性に最も深く関与する蛋白質である。従って、血管平滑筋の運動性の変化や細胞増殖性の変化に血管平滑筋アクチン遺伝子の発現の変化が関与していると考えられるが、この遺伝子の構造と機能、特にその発現の調節機構は不明であった。そこで血管型平滑筋アクチン遺伝子の分離を行い、血管型平滑筋アクチン遺伝子の発現に最も重要な役割を果たしていると考えられる 5' 上流域の構造決定、並びに発現に重要な働きをする領域の同定を行った。

〔方法ならびに成績〕

単離したヒト血管型平滑筋アクチン遺伝子の initiation codon から上流約 7 kb をダイデオキシ法により塩基配列を決定した。同時に上流の種々の Fragment を pSVO CAT vector に挿入し、chloramphenicol acetyl transferase (CAT) 活性を示標として promoter 領域を同定した。その結果 initiation codon の上流 3.8 kb にニワトリの血管型平滑筋アクチン遺伝子 promoter および非翻訳領域と相同性の高い部位が存在し、この部位を含む fragment は promoter 活性を示す事がわかった。initiation codon を含む coding exon の一部を用いて primer extension 法を行い 42 (+ 2) bp から成る非翻訳領域を同定した。

プロモーター及び非翻訳領域は 250 bp にわたってニワトリの血管型平滑筋アクチン遺伝子と 80% の相同性があった。-50~-45 及び -178~-167 には lysozyme の遺伝子で報告されているサイレンサー様

配列GGAGGAGA AATGCAGTGGAが存在し、-72~-63、-120~-111には、心筋アクチン遺伝子の発現に大きな影響を及ぼすCArG-boxが2個存在した。また、-182~-175、-172~-164には、SV40のエンハンサー様の配列GTGGAATGも存在した。この領域から上流約1 kbは種々の細胞においてpromoter活性を示した。そこでこの遺伝子の発現に必須の領域を決定するために、5'上流からの欠失組み換え体を作製し、種々の培養細胞にリン酸カルシウム法を用いて導入し、48時間後の細胞抽出液中のCAT活性測定により発現制御領域をしらべた。その結果、いずれの細胞においても-122まで欠失すると最も強い活性を示すが、更に-40まで欠失するとその活性がなくなる事がわかった。この領域は、2つのCArG boxを含んでおりCArG boxが発現に重要な役割をしている事が示唆された。また-122より上流域は発現に抑制的に働いている事も示唆された。

プロモーター領域の外に第一イントロン内の110bpの長さの領域(1035~1145)には、ニワトリの血管型平滑筋アクチン遺伝子と77%のhomologyが存在し、CArG boxおよびポリオーマウィルスのエンハンサーに類似した配列(AGGAAATGC)が並んで存在し、パリンドローム構造を形成していた。この部位を含む180bpを、SV40のエンハンサーを欠きプロモーター活性のみをもったpA10 CAT vectorの上流及び下流に組み込むと、エンハンサー活性が種々の細胞で見い出された。

#### [総括]

ヒト血管平滑筋アクチン遺伝子にはcoding exonの上流3.8kbに他のアクチンアイソフォームと同様に非翻訳exonが存在した。これで6種のアクチンアイソフォームの全ての遺伝子に共通して非翻訳exonが存在することが判明した。その上流のプロモーター領域および第一イントロンの一部の領域は種を超えて保存されており、それぞれ遺伝子発現に関与すると思われる配列を含んでいた。

非翻訳領域の上流1 kb断片は、種々の細胞でプロモーター活性を示し、上流120bpまで欠失すると最も強いプロモーター活性を示した。この領域内には2つのCArG boxが存在し、更にこの2つのCArG boxを除くと活性が急に低下する事からこの2つのCArG boxがこの遺伝子の発現に重要な役割をしている事、また120bpより上流域には発現に抑制的に働く配列が存在する事が示唆された。第一イントロン内の種を超えて保存されている領域は種々の細胞でエンハンサー活性を示した。

以上、プロモーター領域および第一イントロン内には血管型平滑筋アクチン遺伝子の基本的な発現調節に関与するいくつかの配列が存在し、遺伝子の発現は複数の因子により調節されていることが示唆された。

### 論文の審査結果の要旨

本研究はヒト血管型平滑筋アクチン遺伝子の発現制御領域を検索したものである。その結果、他のアクチンアイソフォームと同様に非翻訳第一エクソンが存在する事、種を超えて保存されたプロモーター領域及び第一イントロン内の領域に発現を促進する領域及び発現を抑制する領域がある事を示した。

この成果は、今後平滑筋細胞における遺伝子発現を調べるうえで貴重な情報を提供するものであり、

学位に値すると考えられる。