

Title	ヒト血管型平滑筋アクチン遺伝子の発現調節機構の解析
Author(s)	鎌田, 真司
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37116
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	鎌 田 真 司
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9084 号
学位授与の日付	平成 2 年 3 月 24 日
学位授与の要件	医学研究科病理系専攻 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発現調節機構の解析
論文審査委員	(主査) 羽倉 明 (副査) 藤尾 啓 教授 松代 愛三

論文内容の要旨

〔目的〕

アクチンは細胞骨格を形成し、細胞運動及び細胞増殖と密接に関連すると共に、筋肉組織に於いては筋肉収縮に重要な役割を果たしている。哺乳動物には少なくとも 6 種類のアクチンアイソフォームが知られており、血管型平滑筋アクチンは血管平滑筋細胞で組織特異的に発現しているタイプである。近年増加しつつある動脈硬化症による死亡は、血管内皮傷害により引き起こされた脱分化した中膜平滑筋細胞の血管内皮への遊走と異常増殖が主要原因と考えられる。今回、血管平滑筋細胞で収縮、運動、増殖などに重要な役割を果たしていると思われるヒト血管型平滑筋アクチン遺伝子の発現調節機構の解析を行った。

〔方法ならびに成績〕

マウス C2 筋肉細胞は、*in vitro* で筋芽細胞から筋管細胞へ分化誘導が可能である。抗平滑筋アクチン抗体を用いたウェスタンブロット分析で分化誘導時の平滑筋アクチンの発現誘導が確認されたため、この細胞を用いて発現調節機構の解析を行った。これまでに筋肉特異的に発現する遺伝子群及び血清により発現が誘導される遺伝子群に共通に見いだされる転写調節に関与する DNA 配列として、10塩基対の CA₂RG (CC(A-Trich)₆GG) box が知られているが、ヒト血管型平滑筋アクチン遺伝子にもプロモーター領域に 2ヶ所、第一イントロン内に 1ヶ所存在している。これらの領域の転写調節に於ける役割を明らかにするために C2 細胞を用いて CAT アッセイを行ったところ、正の転写調節を行うことがわかった。これらの領域に結合する核内因子が C2 細胞核抽出物中に存在するかどうかをゲルシフト法により調べた結果、2つの領域共に核内因子が結合することが明らかとなり、さらにメチル化干渉法により核内因

子の結合部位はCArG boxであることがわかった。この核内因子はゲルシフト法による競合実験より、他のアクチンアイソフォームに存在するCArG box並びに、c-fosの血清刺激による発現誘導に関与するSRE(Serum Responsive Element)にも結合しうることが示唆された。

次に、このCArG box binding factor(CBF)のクローニングを試みた。核内因子の結合が最も強かった第一イントロン内のCArG boxを含むオリゴヌクレオチドをプローブとして、C2細胞より作製した λ gt11 cDNAライブラリーをスクリーニングしたところ同じmRNAに由来する2つのクローンが得られた。このmRNAは全長約1.6kbからなり、285アミノ酸をコードしていた。転写因子の特徴として既に知られている構造(helix-turn-helix, leucine zipper, zinc finger等)は見られずN末側70残基は酸性アミノ酸に富み、C末側30残基は親水性で柔軟な構造をとりうると考えられる。この遺伝子はゲノムのサザン分析よりマウスゲノム中に単一コピー存在し種を越えて保存されている事、ノーザン分析より分化誘導前のC2細胞でも発現しマウスの殆どの組織で発現している事が明らかとなった。 β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質を用いたゲルシフト法、メチル化干渉法によりこの遺伝子がコードする蛋白質はCArG boxに結合出来ることを確認した。アミノ酸レベルでホモロジー検索を行ったところ、一本鎖DNA結合蛋白質と約40%の相同性が認められたため、ゲルシフト法の競合実験により一本鎖DNA結合性を調べた。今回クローンした融合蛋白質で形成されるバンドは一本鎖DNAにより競合されたが、C2細胞核抽出物で形成されるバンドは競合されなかったため、両者は異なる性質を有していると結論した。

〔総括〕

in vitro で分化誘導可能なマウスC2筋肉細胞を用いてヒト血管型平滑筋アクチン遺伝子の発現制御に関与する二領域を同定した。一方はプロモーター領域、他方は第一イントロン内の領域であり、いずれの領域にもC2細胞の核内因子が結合すること、さらにはその結合部位はCArG boxであることを明らかにした。CArG boxに結合する核内因子のクローニングを試みたが、今回用いた方法では目的とする遺伝子は得られず、CBFのCArG boxへの結合にはCBFの修飾、あるいは他の因子との複合体の形成が必要であることが示唆された。従って、CBFのクローニングさらにはCArG boxとCBFを中心としたアクチン遺伝子群および血清により発現が誘導される遺伝子群の発現調節機構を明らかにすることが今後に残された課題である。

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を用いて発現調節機構の解析を行ったものである。その結果、同遺伝子の転写調節領域には筋肉細胞分化誘導時の発現上昇に関与する領域が有り、またそこに結合する核内因子の存在が明らかとなった。さらに、その結合部位はCArG boxである事、細胞核内因子は他のアクチンアイソフォーム及び血清刺激により発現が誘導される遺伝子が持つCArG boxにも結合し得る事を示し、これら遺伝子群の発現調節の少なくとも一部は共通の機構によって担われている可能性を

示唆した。

本研究における成果は、今後血管平滑筋細胞における遺伝子発現調節機構を調べる上で貴重な情報を提供すると共に、アクチン遺伝子群及び血清刺激により発現誘導される遺伝子群の発現調節機構を解明する上で大いに役立つものであり、学位論文として価値あるものと認められる。