



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Osmolarity in renal medulla of transgenic mice regulates transcription via the 5'-flanking region of canine BGT 1 gene                          |
| Author(s)    | 金子, 哲也                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1997, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/39994">https://hdl.handle.net/11094/39994</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

|               |                                                                                                                                                                               |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | かね こ てつ や<br>金 子 哲 也                                                                                                                                                          |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                     |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 3 0 1 6 号                                                                                                                                                                 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 9 年 3 月 25 日                                                                                                                                                               |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>医学研究科内科系専攻                                                                                                                                                |
| 学 位 論 文 名     | Osmolarity in renal medulla of transgenic mice regulates transcription via the 5'-flanking region of canine BGT 1 gene<br>(トランスジェニックマウスを用いたベタイン輸送体 (BGT 1) 遺伝子の浸透圧感受性領域の機能解析) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 堀 正二<br><br>(副査)<br>教 授 松澤 佑次    教 授 安東 明夫                                                                                                                        |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

哺乳類腎臓髄質はその尿濃縮機構のゆえに高浸透圧にさらされる。腎臓髄質細胞はオスモライトと総称される数種類の有機浸透圧物質を細胞内に蓄積し高浸透圧環境に適応する。イヌ腎臓由来の培養細胞である MDCK 細胞においてオスモライトの 1 つであるベタインの蓄積は、高浸透圧刺激に応答したベタイン輸送体 (BGT 1) 遺伝子の転写亢進を介しておこる。in vitro の系で BGT 1 遺伝子の転写開始点 5' 上流 2.4kb 以内に浸透圧感受性エンハンサー活性をもつ部位の存在が明らかにされている。本研究は BGT 1 遺伝子 5' 上流 2.4kb 部分の浸透圧応答性を in vivo で検討することを目的とする。

### 【方法】

BGT 1 遺伝子 5' 上流約 2.4kb にレポーター遺伝子としてクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (以下 CAT) を接続したコンストラクトをもつトランスジェニックマウス (以下 TG) を作製した。3 系統の TG (Na 5, Na11, Na21) が得られた。TG の genomic DNA をサザンブロット解析し TG のゲノムあたりのトランスジーンコピー数を評価した。それぞれ Na 5 : 4 コピー, Na11 : 9 コピー, Na21 : 8 コピーのトランスジーンを有していた。この 3 系統の TG に対し、腎臓髄質浸透圧を上昇させる操作として、72 時間脱水負荷と高張食塩水腹腔内投与を行った。まず正常 C57BL/6 マウスに高張食塩水腹腔内投与を行い、腎臓髄質でのマウス内因性 BGT 1 mRNA 発現を経時的に検討し、高張食塩水負荷 4 時間後にマウス内因性 BGT 1 mRNA レベルがピークになることを確認した。この結果をふまえ、TG に対する負荷プロトコールは以下の 5 群とした。対照群 : 72 時間自由飲水, 脱水負荷群 : 72 時間脱水, 脱水負荷後飲水再開群 : 脱水負荷後 24 時間自由飲水, 高張食塩水負荷群 : 高張食塩水腹腔内投与 4 時間後, 高張食塩水負荷後飲水再開群 : 高張食塩水腹腔内投与 4 時間後より 24 時間自由飲水。

各群に TG を 3 匹ずつ用いそれぞれの負荷後、腎臓髄質を含む諸臓器における CAT mRNA およびマウス内因性 BGT 1 mRNA の発現レベルをノザンブロット解析で検討した。

### 【成績】

得られた TG のうち Na11 の系統を用いて以下の検討を行った。他の Na 5, Na21 の TG の結果も同様の傾向であった。対照群, 脱水負荷群で脳, 心臓, 肺, 肝臓, 脾臓, 小腸, 筋肉, 腎臓皮質, 腎臓髄質についてノザンブロットにおいては CAT mRNA 発現を腎臓髄質のみに認めた。マウス内因性 BGT 1 mRNA は肝臓, 腎臓髄質に発現を認めた。

腎臓髄質のみに注目して CAT mRNA レベルとマウス内因性 BGT 1 mRNA レベルを検討した。脱水負荷後 CAT mRNA レベルは対照群の $2.7 \pm 0.1$ 倍に上昇し、マウス内因性 BGT 1 mRNA レベルは対照群の $2.5 \pm 0.6$ 倍に上昇した。脱水負荷後飲水再開群で CAT mRNA、マウス内因性 BGT 1 mRNA はともに対照群レベルに復した。高張食塩水負荷群で CAT mRNA レベルは対照群の $3.2 \pm 0.2$ 倍、マウス内因性 BGT 1 mRNA レベルは $3.6 \pm 0.2$ 倍と上昇した。高張食塩水負荷後飲水再開群で CAT mRNA は対照群レベルに復し、マウス内因性 BGT 1 mRNA も高張食塩水負荷群に比して有意に低下した。以上すべてのプロトコールにおいて CAT mRNA は腎臓髄質のみに発現し、肝臓のマウス内因性 BGT 1 mRNA レベルは負荷による変化を認めなかった。

#### 【総括】

BGT 1 遺伝子 5' 上流 2.4kb に CAT 遺伝子を接続したコンストラクトをもつ TG において以下の結果が得られた。

1. CAT mRNA は Northern blot では検討した組織のうち腎臓髄質のみに発現を認めた。
2. 腎臓髄質において脱水負荷及び NaCl 投与により CAT mRNA 発現レベルは約 3 倍に上昇し、飲水再開により負荷前レベルに復した。
3. 腎臓髄質において CAT mRNA 発現レベルの増加はマウス内因性 BGT 1 mRNA と同様であった。

BGT 1 遺伝子の 5' 上流 2.4kb は TG の腎臓髄質において浸透圧応答性にレポーター遺伝子発現を制御することが示された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究によりベタイン輸送体 (BGT 1) 遺伝子の 5' 上流部分 2.4kb は培養細胞系のみならずトランスジェニックマウス腎臓髄質においても高浸透圧刺激に应答してレポーター遺伝子発現を上昇させることが明らかとなった。またレポーター遺伝子である CAT 遺伝子は腎臓髄質のみで発現を認め、マウス内因性 BGT 1 遺伝子が発現している肝臓では発現を認めなかった。この結果より肝臓における BGT 1 遺伝子発現に必要な同遺伝子中のシスエレメントと腎臓における発現に必要なシスエレメントが異なる可能性が示唆された。今後の同遺伝子の臓器特異的発現の制御機構解明にも有用な情報が得られたと考える。本研究は腎臓の浸透圧ストレス応答機構解明の基礎的検討に位置づけられる。以下より本研究は学位授与に値するものとする。