



Title	Smooth Muscle Cell Phenotype-dependent Transcriptional Regulation of the $\alpha 1$ Integrin Gene
Author(s)	小畠, 秀人
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40770">https://hdl.handle.net/11094/40770</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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">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	小畠秀人
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第13679号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Smooth Muscle Cell Phenotype-dependent Transcriptional Regulation of the $\alpha 1$ Integrin Gene ( $\alpha 1$ インテグリン遺伝子の平滑筋細胞形質転換にともなう転写制御)
論文審査委員	(主査) 教授 祖父江憲治
	(副査) 教授 宮坂昌之 教授 越智 隆弘

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

インテグリン $\alpha 1 \beta 1$ はラミニンおよびコラーゲンを認識するヘテロダイマー型接着分子で、そのうちの $\alpha 1$ サブユニットは平滑筋に特異的に発現している。発生過程では、平滑筋細胞の分化に伴い $\alpha 1$ インテグリンの発現量は急増する。また、血清存在下で平滑筋細胞を培養すると脱分化をきたし、他の平滑筋細胞特異的マーカー蛋白質と同様、 $\alpha 1$ インテグリンの発現量も著しく低下する。本研究では、平滑筋細胞形質転換（分化・脱分化）に伴う $\alpha 1$ インテグリンの転写調節機構を解析した。

#### 【方法ならびに成績】

ニワトリ胚における $\alpha 1$ インテグリンmRNAの発現様式をin-situハイブリダイゼーションにより調べたところ、その発現組織分布は平滑筋特異的であり、また胎生中期以降、平滑筋組織の発育に伴いその発現量は増加していることが示された。培養平滑筋細胞における $\alpha 1$ インテグリンmRNAの発現量をノーザンプロットで解析した。ニワトリ胚砂囊平滑筋より単離した平滑筋細胞を、ラミニンコート上で血清非存在下で培養すると平滑筋細胞特異的マーカー蛋白質の発現は維持される（分化型平滑筋細胞）が、血清存在下で培養するとただちにこれらの発現は著減し、収縮能も失われる（脱分化型平滑筋細胞）。本研究では、これら分化型および脱分化型平滑筋細胞をもちいた。 $\alpha 1$ インテグリンmRNAの発現は、平滑筋細胞脱分化に伴い著減した。同様の変化は血管平滑筋においても認められた。従って、 $\alpha 1$ インテグリンは、分化型平滑筋細胞に特異的に発現しており、その発現調節は転写レベルでおこなわれていることが示された。

$\alpha 1$ インテグリンの平滑筋細胞形質依存的転写調節を解明するために、同遺伝子のプロモーター領域を同定し、その転写活性を解析した。 $\alpha 1$ インテグリン遺伝子の5'側隣接領域には、他のインテグリンプロモーターと同様TATA boxまたはCCAAAT boxは存在しなかった。また、2カ所のAP1サイトと1カ所のAP2サイトに相同な配列と、筋細胞特異的遺伝子のプロモーターにしばしば見いだされるCArG box様配列が存在した。この領域の転写活性をCATアッセイにより測定した。分化型砂囊平滑筋細胞においては、-516から+281bpの領域で十分な転写活性を示したが、CArG box様配列の欠失、あるいは変異により転写活性は著しく低下した。AP1サイトまたは、AP2サイトに変異を導入しても転写活性は低下しなかった。一方、砂囊および血管の脱分化型平滑筋細胞における同領域の転写

活性は非常に低く、 CArG box 様配列への変異導入による転写活性の変化は認めなかった。以上のことから、 CArG box 様配列が分化型平滑筋細胞においてのみポジティブエレメントとして働いていることが示された。

CArG box 様配列を含む 2 本鎖 DNA をプローブとしてゲルシフトアッセイをおこなったところ、 CArG box 様配列と結合して複合体を形成する核蛋白質は、 砂囊、 血管いずれでも分化型の平滑筋細胞核抽出液に多量に存在することが示された。この複合体形成は、 脱分化型においては著減しており、 転写活性の差を反映していた。また、 CArG box に結合する転写調節因子である SRF (serum response factor) に対する抗体の添加により複合体のバンドがスーパーシフトしたことから、 この DNA／核蛋白質複合体には SRF が含まれていることが示された。以上の結果から、 平滑筋細胞における  $\alpha 1$  インテグリン遺伝子の形質依存的発現は、 転写因子 SRF の CArG box 様配列への結合により調節されていると考えられた。ところが、 平滑筋細胞の脱分化に伴う SRF の発現量減少は軽度であり、 また、 SRF は平滑筋以外の筋細胞を含む広範な細胞に発現していることから、 SRF の発現だけでは  $\alpha 1$  インテグリンの平滑筋特異的発現は説明できない。したがって、 SRF の CArG box 様配列への結合の調節には、 他の因子が関与していることが示唆された。

### 【総括】

1.  $\alpha 1$  インテグリン mRNA は平滑筋組織に特異的に発現していた。また、 培養平滑筋細胞における  $\alpha 1$  インテグリン mRNA の発現量は、 平滑筋細胞の脱分化に伴い著減した。
2.  $\alpha 1$  インテグリン遺伝子のプロモーター解析により、 CArG box 様配列とこれに結合する転写因子 SRF が  $\alpha 1$  インテグリンの内臓および血管平滑筋細胞での形質依存的発現に重要であることを明らかにした。
3. SRF の発現分布、 平滑筋細胞形質転換に伴う発現量変化は、  $\alpha 1$  インテグリンの平滑筋細胞特異的、 形質依存的発現を SRF 単独で説明しうるものではなく、 SRF と協調的に働く他の因子がこの発現調節に関与している可能性を示唆した。

### 論文審査の結果の要旨

$\alpha 1$  インテグリンは発生過程において各組織で一過性に発現するが、 発育に伴い漸減する。しかしながら、 平滑筋細胞と血管内細胞のみは発現後期に至るまで高い発現レベルを維持していることが知られている。本研究は、  $\alpha 1$  インテグリンの平滑筋細胞における発現様式を検討したものである。その結果、  $\alpha 1$  インテグリンの発現が平滑筋細胞の形質（分化・脱分化）に依存していることを蛋白質・mRNA レベルで明らかにした。さらに、 この平滑筋細胞形質に依存した  $\alpha 1$  インテグリンの転写レベルでの発現調節をプロモーター解析の手法を用いて検討し、  $\alpha 1$  インテグリン遺伝子のプロモーター領域に存在するシスエレメント CArG box とこれに作用する転写因子 SRF が転写調節に重要であることを初めて明らかにした。本研究は、 平滑筋細胞の発生機序を解明していくうえで、 また動脈硬化症病変部における平滑筋細胞の脱分化機序を解明していくうえで意義のあるもので、 学位の授与に値するものと考えられる。