

Title	Functional involvement of serum response factor in the transcriptional regulation of caldesmon gene
Author(s)	靱山, 卓哉
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40785">https://hdl.handle.net/11094/40785</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	もみ やま たく や 粉 山 卓 哉
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 3 7 5 1 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 医学研究科外科系専攻
学位論文名	Functional involvement of serum response factor in the transcriptional regulation of caldesmon gene (カルデスモンの転写調節に関する serum response factorの関与)
論文審査委員	(主査) 教授 松田 暉  (副査) 教授 祖父江憲治 教授 荻原 俊男

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

平滑筋細胞の形質転換（分化，脱分化）は動脈硬化症をはじめとする血管病変の発生機構において重要な要因と考えられる。その解明の手がかりとして，平滑筋細胞形質の最良の指標である細胞骨格系蛋白質の発現調節機構を明らかにすることが重要である。筋由来細胞骨格系蛋白質のプロモーター領域にはいわゆる CArG box 類似の塩基配列が広く見出されている。平滑筋細胞形質の指標となる細胞骨格系蛋白質の一つであるカルデスモン遺伝子のプロモーター領域に於いても，CArG box が平滑筋細胞の形質転換に伴う発現量の調節に重要な役割を果たしている。一方，CArG box に結合するトランス因子の一つとして serum response factor (SRF) が知られている。SRF は平滑筋細胞に限らず広汎な細胞に発現する普遍的な転写調節因子であり，休止期細胞において増殖開始シグナルに応答して前初期遺伝子群を活性化する因子である。しかし平滑筋細胞の形質転換に伴う遺伝子発現変化における SRF の役割は明らかではない。本研究では平滑筋細胞におけるカルデスモンの転写調節に関する SRF の関与を検討した。

#### 【方法ならびに成績】

1) ニワトリ胚砂嚢平滑筋細胞から精製した核抽出液及び抗 SRF polyclonal 抗体を用い，カルデスモンの CArG box (CArG1) をプローブとして supershift assay を施行した。その結果 SRF は CArG1 に結合する蛋白質の一つであることが確認された。

2) ヒト SRF の発現 vector (pSGSRF) から SRF の DNA 結合部位のアミノ酸 3 ケ所を変異させた変異体発現 vector (pSGSRFpm1) と，DNA 結合部位を残し他を欠失した変異体発現 vector (pSGNLBD) を作成した。これらの発現 vector をリン酸カリシウム法にてトランスフェクションした脱分化型ニワトリ胚砂嚢平滑筋細胞から核抽出液を精製し，CArG1 をプローブとして gel shift assay を施行した。脱分化型平滑筋細胞に強制発現させた SRF は gel shift assay で CArG1 との蛋白質-DNA 複合体を形成した。DNA 結合能を持たないアミノ酸変異型 SRF (SRFpm1) を正常 SRF と同時強制発現させると，その複合体形成は阻害された。正常 SRF と欠失変異型 SRF (NLBD) の同時強制発現では，正常 SRF-CArG1 複合体の形成阻害及び正常 SRF と欠失変異型 SRF (NLBD) の heterodimer 由来と考えられる複合体が同定された。いずれの変異型 SRF も正常 SRF と CArG1 との複合体形成を阻害し，正常 SRF に対する dominant-negative として作用すると考えられた。

3) カルデスモンのプロモーター活性に対する SRF の影響を検討するために、これらの発現 vector をニワトリ胚砂囊平滑筋細胞を血清刺激下で培養した脱分化型平滑筋細胞にリン酸カルシウム法にてトランスフェクションした一過性発現系及び、血清非存在下ラミニン上で培養した分化型平滑筋細胞にリボソーム法にてトランスフェクションした一過性発現系を用い CAT assay を施行した。正常 SRF を分化型、脱分化型いずれの平滑筋細胞に強制発現しても、カルデスモンのプロモーター活性は増強しなかった。正常 SRF に対する dominant-negative としてアミノ酸変異型 SRF (SRFpm1) あるいは欠失変異型 SRF (NLBD) を分化型平滑筋細胞に強制発現させると、いずれもカルデスモンのプロモーター活性は阻害された。この阻害されたカルデスモンプロモーター活性は、正常 SRF を同時強制発現することによって回復した。

4) ニワトリ胚砂囊平滑筋細胞から精製した核抽出液を DNA affinity beads により分画し、gel shift assay により各分画の DNA 結合能を検討した。カリウム存在下では eluted fraction に CArG1 への結合活性があるのに対し、ナトリウム存在下では eluted fraction あるいは flow-through fraction のいずれにも結合活性は認められなかった。両 fraction を混合すると結合活性は回復した。

#### 【総括】

【1】抗 SRF 抗体を用いた super-shift assay の結果、SRF はカルデスモンの CArG-box に結合することが確認された。

【2】SRF 単独の強制発現はカルデスモンの転写活性を上昇させなかったが、正常 SRF に対する dominant-negative の SRF 変異体を用いた検討から、SRF がカルデスモンの転写を促進するコア因子の一つであることが明らかとなった。

【3】核抽出液の分画の結果、SRF-CArG1 複合体形成を調節する蛋白因子の存在を見出した。

【4】SRF は、この蛋白因子と協調してカルデスモンの平滑筋細胞特異的な発現を促進することが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

カルデスモンは、平滑筋細胞形質転換（分化、脱分化）に伴いアイソフォームと発現量が変化する。即ち平滑筋細胞形質転換の良好な指標となりうる細胞骨格系蛋白質のひとつである。カルデスモン遺伝子の転写調節においてプロモーター領域の CArG box と呼ばれる塩基配列が重要であることが報告されている。一方 *c-fos* のプロモーター領域の CArG box には血清刺激に対する応答を調節する因子である serum response factor (SRF) が結合することが知られている。本論文は、この平滑筋細胞形質転換機構の解明のため、カルデスモン遺伝子の転写調節における SRF の関与を検討したものである。まず、ゲルシフトアッセイにより、カルデスモンの CArG box と SRF の結合を確認した。次に、SRF 及びそのミュータントを一過性に発現した平滑筋細胞を用いた CAT アッセイにより、正常 SRF がミュータント SRF によって阻害されたカルデスモンのプロモーター活性を回復させることを見いだした。また、平滑筋細胞核抽出液を分画し、SRF とカルデスモンの CArG box の結合を調節する因子の存在を見いだした。即ち、SRF がカルデスモンの転写を促進するコア因子であること及び、協調して平滑筋細胞特異的な発現を調節する因子が存在することを示唆するものである。

この結果は粥状動脈硬化、primary pulmonary hypertension、移植心冠動脈硬化などの血管病変の発生機構において重要な要因のひとつである平滑筋細胞の形質転換機構の解明に重要な知見であり、本論文は学位に値すると考えられる。