

Title	c-Myc gene single strand binding protein-1, MSSP-1, suppresses transcription of α -smooth muscle actin gene in chicken visceral smooth muscle cells
Author(s)	木村, 和博
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41621
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 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	木 村 和 博
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 4 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	c-Myc gene single strand binding protein-1, MSSP-1, suppresses transcription of α -smooth muscle actin gene in chicken visceral smooth muscle cells. (鶏砂嚢平滑筋細胞でのMSSP-1による平滑筋型 α -アクチンの転写抑制)
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 米田 悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

種々の細胞系において細胞分化機構の解析が遺伝子レベルで進められ、細胞特異的に発現している遺伝子の転写制御因子が細胞分化過程で重要な役割をしていることが明かにされている。しかしながら、平滑筋細胞では、分化及び形質転換を含めた遺伝子発現調節のメカニズムについては不明な点が多い。そこで、平滑筋細胞特異的遺伝子の発現制御機構を解明することを目的とした。

平滑筋分子マーカー遺伝子の平滑筋型 α -アクチン(α -SMアクチン)はその発現量が血管平滑筋細胞の分化に伴ない増加し、脱分化すると低下する。我々は従来困難であった平滑筋細胞分化維持系をニワトリ砂嚢平滑筋を使用し確立した。そして、この分化維持系を使用しこの遺伝子の発現を転写レベルで解析し、これらを制御しているシスー及びトランスー因子の同定を行った。

【方法ならびに成績】

α -SMアクチンのプロモーター領域をCATレポーター遺伝子の upstream に組み込んだ種々のプラスミドを作製した。孵卵15日胚より採取し、ラミニン上で無血清及び血清培地下で培養したニワトリ砂嚢平滑筋細胞に、これらのプラスミドを導入し、そのプロモーター活性を測定した。

その結果、-193~+1の領域を持つプラスミドは高いプロモーターを示し、この領域での変異、欠失により pu-rich motif 及び二つの CArG Box が positive element として作用することが明らかになった。さらに、この領域のDNAと核内蛋白質との結合を解析するにあたりゲルシフトアッセイを行った。これらの領域に結合する核内蛋白質が検出され、さらに競合DNA及び抗体を使用することにより transcriptional enhancer factor-1 (TEF-1), serum response factor (SRF) が各々のシスエレメントにトランス因子として結合することが判明した。

一方、-212~-238の領域は前記プロモーター活性を低下させ、negative element として作用することを新たに見出した。前述のようなプラスミドの変異、欠失を行うことによりそのコア領域の配列が TATCTTA であることが明らかとなった。さらにゲルシフトアッセイおよびサウスウエスタンアッセイにより一本鎖及び二本鎖 DNA 特異的核蛋白質が TATCTTA を含むこの領域に特異的に結合することを明らかにした。この結合蛋白質はセンス方向の一本鎖DNAに特に強く結合する特性も同時に明らかにした。

つぎに、この負の制御に関与していると予想される核蛋白質の同定を試みた。鶏胚15日砂嚢平滑筋細胞から作成した cDNA library をセンス方向の一本鎖DNA をプローブとしてサウスウエスタンスクリーニングを行った。その結果、負の制御に関与していると予想される核蛋白質の一つを同定した。シーケンスにより、この蛋白質は human MSSP-1 (c-myc gene single strand binding protein-1) のホモログであることが明らかとなった。実際にこの蛋白質が negative element にあたる領域に特異的に結合することを融合蛋白質、抗体を使用したゲルシフトアッセイにより確認した。さらに、この蛋白質の機能を解析するために培養ニワトリ砂嚢平滑筋細胞に発現ベクターに組み込んだ MSSP-1 を過剰発現させると、 α -SM アクチンプロモーター活性が抑制されることを見出した。

【総括】

平滑筋細胞において α -SM アクチン遺伝子のプロモーターは、複数のシスエレメント及び核内因子による正および負の調節を受けていることが示唆された。正の制御には、TEF-1, SRF が各々 pu-rich motif 及び二つの CArG Box のシスエレメントを介して関与している。負の制御では、-212~238の領域が negative element として作用している。さらに、MSSP-1 がこのシスエレメントを介して負の制御に関与するトランス因子の一つであることが明らかになった。現在、これら転写制御に関与するさらなるトランス因子について解析中である。

本研究によって得られた知見は今後血管平滑筋細胞の形質転換(分化・脱分化)の分子機構の解明だけでなく、それと密接に関連した動脈硬化症や高血圧症などの疾患の病態機構の解明にも役立つものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

平滑筋細胞の代表的分子マーカーである平滑筋型 α -アクチン遺伝子の転写調節機構を解析することを目的とした。ニワトリ α -SM アクチンのプロモーター活性を解析した。その結果、pu-rich motif 及び二つの CArG Box が positive element として作用し、各々に transcriptional enhancer factor-1 (TEF-1), serum response factor (SRF) がトランス因子として結合することが認められた。また、それらの上流に negative element として作用する領域が新たに認められ、一本鎖及び二本鎖 DNA 特異的核蛋白質がこの領域に結合することを明らかにした。この負は制御に関与していると予想される核蛋白質の一つを同定した。この蛋白質は human MSSP-1 (c-myc gene single strand binding protein-1) のホモログであり、MSSP-1 の過剰発現により α -SM アクチンのプロモーター活性が実際に抑制されることを明らかにした。

以上より、平滑筋細胞における α -SM アクチン遺伝子のプロモーターは、複数の核内因子による正および負の調節を受けている事が明らかとなった。具体的には、正の調節因子では TEF-1, SRF が同定され負の調節因子として MSSP-1 が新たに同定された。本研究は平滑筋細胞形質転換(分化・脱分化)の分子機構だけでなくそれと密接に関連した動脈硬化症や高血圧症などの疾患の病態機構の解明にも有用であり学位論文に値すると考えられる。