The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Transcriptional Activation of β-Tropomyosin Mediated by Serum Response Factor and a Novel Barx Homologue, Barx1b, in Smooth Muscle Cells
Author(s)	中村, 真子
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43785
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【86】

氏　　名	中村真子（なかむらまこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　16883　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学位論文名	Transcriptional Activation of β-Tropomyosin Mediated by Serum Response Factor and a Novel Barx Homologue, Barx1b, in Smooth Muscle Cells （平滑筋細胞における serum response factor と新規 Barx ホモログ Barx1b によるβ-トロポミオシン遺伝子の転写調節機構）
論文審査委員	（主査） 教　授　祖父江憲治 （副査） 教　授　平野　俊夫　　教　授　宮坂　昌之

論文内容の要旨

【目的】

生体の筋肉組織には平滑筋・骨格筋・心筋の3種類が存在する。骨格筋や心筋はその構造から横紋筋と呼ばれ急速な収縮を起こすのに対し、消化管・血管平滑筋はゆっくりとした持続的な収縮を起こすのが特徴である。平滑筋を構成する平滑筋細胞は外界の環境に応じて2種類の形質を示す。平滑筋組織中では筋原線維に富み、収縮性を有している分化型、一方、血清などの刺激により蛋白質合成能が亢進し、遊走能を獲得した脱分化型である。興味深いことに、平滑筋細胞が形質転換する際には、多くの細胞骨格蛋白質が発現量の変化やアイソフォーム変換を示す。カルデスモン及びα-トロポミオシン（α-TM）は高分子量型から低分子量型へアイソフォーム変換し、α1インテグリン・β-トロポミオシシ（β-TM）・カルポニンは発現量が顕著に低下する。カルデスモン・α1インテグリン・SM22α各遺伝子上にはCArG box（CC(A/T)6GG）と呼ばれるコンセンサス配列が存在し、serum response factor（SRF）と呼ばれるトランス因子が結合することにより、正の転写調節が行われていることが明らかにされている。しかしながら、SRFの発現は骨格筋・心筋などの非平滑筋組織でも認められることから、SRF単独で平滑筋細胞特異的な転写調節を説明することはでさない。そのため、SRF以外に組織特異性を規定する因子が存在すると考えられる。

私はβ-TM遺伝子に着目しその平滑筋細胞特異的転写調節機構の解析を行った。β-TMには骨格筋型・平滑筋型・線維芽細胞型の3種のアイソフォームが存在し、骨格筋型、平滑筋型β-TMの転写開始点上流のプロモーター領域は共有されている。骨格筋細胞ではCArG box、C box、E boxがシスエレメントとして転写制御を担っていると報告されている。しかしながら、平滑筋細胞に関してはその転写制御は不明であった。私はβ-TM遺伝子の平滑筋特異的発現をCArG boxに注目して解析を行った。また、平滑筋特異性を決定する因子として部位特異的な発現を示すホメオドメイン蛋白質がSRF/CArG box相互作用を調節しているのではないかと考え、分化型平滑筋細胞に発現するホメオボックス遺伝子のスクリーニングを行った。さらに得られたホメオボックス遺伝子とSRFがβ-TM遺伝子の転写活性に与える影響について検討を行った。

【方法ならびに成績】

ニワトリゲノムライブラリーからニワトリβ-TMプロモーター領域のクローニングを行い、分化型平滑筋細胞に導入してプロモーター解析を行った結果、平滑筋細胞においてはE box、C boxは転写に関与せずCArG boxのみが転写活性に重要なシスエレメントであることを明らかにした。さらに同部位にSRFが結合することを確認した。

次に、平滑筋特異的転写調節因子として部位特異的な発現をするホメオドメイン蛋白質に着目し、ニワトリ砂嚢平滑筋ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果得られたクローンを用いてニワトリ胚における発現を解析した結果、平滑筋組織に特異的に発現するものを1クローン認めた。そのクローンは、ホメオドメインタンパク質Barxファミリーと相同のホメオドメイン、Barx特異的配列、Barファミリーに特徴的であるFILドメインを持つ一方、他のファミリータンパク質と比較した所、NH2末端に13カ所、COOH末端に10カ所のアミノ酸置換が存在することから新規Barxファミリー遺伝子であると考えBarx1bと命名した。Barx1bとSRFを分化型平滑筋細胞に同時に強制発現させるとβ-TM遺伝子の転写活性は約5倍上昇し、さらにCArG boxに変異を加えるとBarx1b、SRFによる転写増強は阻害された。この結果、CArG box/SRFが転写増強に必須でありBarx1bとSRFは転写に協調的に働いていることが示唆された。そこでBarx1bとSRFを10T1/2細胞に強制発現させ、免疫沈降法により解析を行った結果、両者は細胞内で複合体の形成を認め、さらにpull down解析の結果両者の結合に必須なドメインはBarx1bのホメオドメインと種を越えて保存されているその上流11残基、およびSRFのMADSドメインであった。さらに10T1/2細胞でSRFとBarx1bを強制発現させプロモーター解析を行った結果、両者による協調的な転写増強が認められ、ゲルシフト解析によりSRFとBarx1bはβ-TMプロモーター上でternary complexを形成することを明らかにした。以上より、平滑筋細胞におけるβ-TMの転写はホメオドメインタンパク質Barx1bとSRFにより協調的に制御されていることを示した。

【総括】

今回の解析により、平滑筋細胞におけるβ-TM遺伝子の転写にはCArG boxが必須でありトランス因子としてSRFが結合していることを明らかにした。さらに、調節因子Barx1bがβ-TMプロモーター上でSRFと複合体を形成しβ-TMの平滑筋細胞特異的転写を協調的に制御していることを示した。

論文審査の結果の要旨

申請者は、平滑筋マーカー分子の一つであるβ-トロポミオシンの平滑筋細胞における転写に着目して解析を行った。β-トロポミオシンはこれまで、平滑筋細胞での転写制御機構は報告されていない。申請者は初めに平滑筋細胞内で同遺伝子の転写調節に関与するシスエレメントの同定を行った。その結果、CArG boxと呼ばれる特異的な配列にserum response factor（SRF）が結合し、正の転写調節を行っていることを明らかにした。さらに、その転写を制御する組織特異的な調節因子として新規BarxファミリーBarx1bのクローニングを行った。Barx1bはSRFと協調的に働きβ-トロポミオシン転写増強を行っており、両者は*in vitro*、*in vivo*で結合していた。また、DNA上でternary complexを形成していることを確認した。これらの結果より、平滑筋細胞内におけるβ-トロポミオシンの転写にはBarx1bが調節因子として関与していることを明らかにした。本研究はβ-トロポミオシン遺伝子の転写機構の解明のみならず、初めて平滑筋の組織特異的な調節因子の同定を行ったことからも学位に値すると考えられる。