

氏名(本籍)	にぶ <sup>ゆたか</sup> 裕 (山口県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第1,344号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Identification and characterization of an enhancer in the human angiotensinogen gene (ヒト・アンギオテンシノーゲン遺伝子のエンハンサーの同定とその解析)
主査	筑波大学教授 農学博士 村上 和雄
副査	筑波大学教授 農学博士 日下部 功
副査	筑波大学助教授 農学博士 星野 貴行
副査	筑波大学助教授 医学博士 中山 和久

## 論 文 の 要 旨

レニン-アンギオテンシン系は、生体の血圧調節に重要な役割を果たしていると考えられている。アンギオテンシノーゲンは、昇圧ペプチド・アンギオテンシンⅡの前駆体で、主に肝臓で産生され血中に放出される。最近、一部の高血圧患者は、正常人に比べて、血中のアンギオテンシノーゲン濃度が高いことが報告された。また、発生工学的手法を用いた解析により、マウスにて、ラット・アンギオテンシノーゲン遺伝子を過剰発現させると高血圧を呈すことが報告された。そこで、アンギオテンシノーゲン遺伝子の発現メカニズムを理解することは、高血圧の原因の解明のためにも、きわめて重要な課題となってきた。

一般的に、多くの遺伝子でその発現制御は、転写調節の段階が最も重要と考えられている。近年、プロモーターからの転写レベルを増大させるエンハンサーは、5'上流だけでなく、転写開始点より下流にも存在することが明らかとなってきた。5'上流1.3 kb 及び3'下流領域を含む全長14 kb のヒト・アンギオテンシノーゲン遺伝子を持つトランスジェニックマウスにおいて、肝臓でその mRNA の高い発現が認められている。さらに、ヒト肝臓癌由来の HepG 2 細胞において、同遺伝子の転写開始点より下流領域の3.8 kb DNA 断片にエンハンサーの存在が示唆されていた。このような背景から、本研究は、同遺伝子の転写開始点より下流領域の3.8 kb DNA 断片に着目してエンハンサーの同定を中心に解析を行い、同遺伝子の発現メカニズムを理解することを目的とした。

その3.8 kb DNA 領域を様々な大きさに断片化し、ヒト・アンギオテンシノーゲン遺伝子のプロモーターを持つクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子に、順方向および逆方

向に連結した。これを、HepG 2細胞に一過性に導入し、CAT アッセイを行った。その結果、エクソン 5 から 3'下流領域の全長832 bp の B 2 領域 (+1399から+2230の領域)に、エンハンサーを同定した。4種類の培養細胞 (HepG 2, A-172, T 98 G, HeLa) を用いて細胞特異性を検討した結果、このエンハンサーは、HepG 2細胞でのみ働いた。

また、エンハンサーのコア領域は複数存在すると予想し、まず、エンハンサーの3'側半分 (+1807から+2230の領域)について、HepG 2細胞を用いたCAT アッセイによりコア領域を検索した。その結果、3'下流領域の24 bp (+2191から+2214の領域)にコア領域を同定した。4種類に培養細胞 (HepG 2, A-172, T 98 G, HeLa) を用いて細胞特異性を検討した結果、このコア領域は、HepG 2細胞でのみ働いた。次に、コア領域に結合する核内因子を同定するため、ゲルシフトアッセイを行った。その結果、2種類の核内因子を検出した。2種類の核内因子は、4種類の培養細胞 (HepG 2, A-172, T 98 G, HeLa) の中ではHepG 2細胞にのみ存在した。このうち、新しい核内因子をhAEF-1 (human angiotensinogen enhancer factor-1)と命名した。

さらに、HepG 2細胞を用いたCAT アッセイにより、別のコア領域をエンハンサー5'側半分 (+1399から+1807の領域)から検索した。その結果、エクソン 5 の80 bp (+1399から+1478の領域)にコア領域を同定した。2種類の培養細胞 (HepG 2, A-172) を用いてコア領域の細胞特異性を検討した結果、HepG 2細胞でのみ働いた。次に、コア領域に結合する核内因子を同定するため、ゲルシフトアッセイを行った。その結果、複数の核内因子を検出した。このうち、新しい核内因子をそれぞれNF-ANG-2, -5, -7, -9, -10 (nuclear factor of angiotensinogen gene)と命名した。

## 審 査 の 要 旨

高血圧患者の9割以上を占める本態性高血圧症の成因は、いまだ明らかになっていないが、近年における高血圧成因研究は、分子生物学的手法の進歩に伴い新たな局面を迎えている。高血圧の発症機序を遺伝子レベルで解明することを目標におき、血圧を調節する複雑な機構1つ1つを理解していく研究が増えてきた。特に最近では、生体の血圧調節に重要なレニン-アンジオテンシン系の構成要素の1つであるアンジオテンシノーゲンが本態性高血圧症の成因に関与すると考えられるようになってきた。また、遺伝子発現の調節機構と各種疾患の関係が重要視されている。このような状況の中、ヒト・アンジオテンシノーゲンについて、培養細胞を用いてその遺伝子の発現調節機構の詳細な解析を、はじめて行ったことは非常に意味あることと思われる。本論文では、同遺伝子が効率よく転写されるために重要な領域とこの領域に結合する核内因子を新規なものも含めて複数同定している。今後、その核内因子のクローニング、及び、その解析といった方向で研究は発展していく要素を持っている。これらのことは、単にヒト・アンジオテンシノーゲン遺伝子の発現調節機構の理解にとどまらず、高血圧症成因の解明や高血圧発症の予知につながると期待される。

よって、著者は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。