

氏名(本籍)	徐 旻 奭 (韓 国)
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 甲 第 973 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 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	In Vivo and In Vitro Analyses of Human Renin Gene Expression (ヒトレニン遺伝子発現に関するin vivoとin vitroでの分析)
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	筑波大学教授 理学博士 宗 像 英 輔
副 査	筑波大学助教授 薬学博士 岡 田 典 弘

論 文 の 要 旨

レニンは、血圧調節に関与している酵素・ホルモン系の一つレニン-アンジオテンシン系において、ホルモン前駆体である基質アンジオテンシノーゲンを特異的に限定分解してペプチドホルモンを生成するタンパク質分解酵素である。レニン-アンジオテンシン系は生体内で水や電解質代謝を調節する最も重要なシステムで、血圧維持や高血圧の病態に深くかかわっている。腎から分泌されたレニンは基質であるアンジオテンシノーゲンを分解しアンジオテンシン I を産生し、アンジオテンシン I は肺の変換酵素によりアンジオテンシン II に変換されて生理活性ペプチドとなる。産生されたアンジオテンシン II は、血管平滑筋を収縮させると共に、副腎でのアルドステロン合成を刺激することによって血圧を上昇させる。

近年、ヒトレニン遺伝子の単離および構造解析が行われた。次に、研究されるべき重要な点は、ヒトレニン遺伝子の発現調節とレニン遺伝子の産物の生体内での機能を解析することである。一般的に、クローン化した遺伝子の発現調節やタンパク質の分泌機構を研究するには、株化した培養細胞が有効な手段としてよく使われている。しかしヒトレニン遺伝子の発現調節に関する研究においては、レニンを安定に産生する細胞株がないために立ち遅れている。そこで、生体におけるヒトレニン遺伝子の発現調節研究の基礎としての発現分布を調べるため、さらにヒト高血圧症のモデル動物作製の第一歩としてヒトレニン遺伝子導入マウスを作製した。

遺伝子導入マウスとは、クローン化したDNAを染色体の一部に組み込んだ人為的に作られたマウスのことである。最近、遺伝子導入マウスが数多く報告されており、特にヒト疾患モデル動物の作出はこの分野の大きな関心事でもあって、いろいろな所から注目を集めている。また、遺伝子の

発現調節の研究だけでなく、形態形成の研究にも応用され、遺伝子やその産物の機能の解析に重要な手段となっている。更に、多くの遺伝病は欠損症なので正常の遺伝子の機能を欠損させてやることによって、目的とする疾患を起こすことも報告されている。また、クローン化した遺伝子を、変異を導入した相同組換え体を選択することによって、目的とする染色体の部位に導入する方法も開発されている。このようなことから今回の実験では、遺伝子導入マウスの作製とその解析が主な assay系として使われた。

一方、今回の研究では、ヒトレンイン遺伝子のプロモーターの活性化について、プロモーターの機能を調べるのに最もよく使われているCAT assayという方法を用いて分析を行った。

〔I〕ヒトレンイン遺伝子導入マウスの作製とその解析

ヒトレンイン遺伝子は、9個のイントロンと10個のエクソンから構成されていることが知られている。しかし転写開始点から上流のプロモーター部位に関する研究はあまり報告されていない。そこで、今回の実験では、ヒトレンイン遺伝子のプロモーターをそのまま使用して遺伝子導入マウスを作製するたににした。これは、マウスに存在する転写調節因子 (*trans-acting factor*) が、ヒトレンイン遺伝子のプロモーターにあると思われる制御配列 (*cis-acting element*) に対し特異的に作用することが出来れば、プロモーター機能解析の基礎となることを期待したからである。ヒトレンイン遺伝子の発現調節領域を含む15kbのDNAを調整し、マイクロマニピレーターを用いてマウスの受精卵に注入した。この受精卵を偽妊娠雌マウスへ移植し子供を産ませた。子マウスの尾から染色体DNAを調整した後、DNAの検索系の一つであるSouthern blot法でヒトレンイン遺伝子が導入されたかどうかを調べた。得られた遺伝子導入マウスは、hRN 5-4, hRN 8-3, hRN 8-5, hRN 8-12の4株で、それぞれ導入されたヒトレンイン遺伝子数は、1コピー以上であった。また、それぞれの株とも次世代にヒトレンイン遺伝子を伝達していた。ヒトレンイン遺伝子導入マウスにおけるヒト遺伝子の発現を確かめるため、ヒトレンインcDNAをプローブとしてhRN 8-12, hRN 8-12-10の腎臓から取ったRNAをNorthern法で検討した。ヒトレンインmRNAは、腎臓で最も強く発現することから、腎臓からのRNAを調べたものである。その結果、遺伝子導入マウス中のヒトレンインmRNAの長さは、ヒト腎におけるmRNAと同一であった。これはマウスにおいて導入されたヒトレンイン遺伝子が正しくスプライシングされたことを示すものであった。次にヒトレンインmRNAの発現分布を調べるため、hRN 8-12について詳しい検討を行った。各臓器からRNAを調製し、感度が良いRNaseプロテクションassayを行った。ヒトレンインmRNAは、腎臓で最も多く発現されていて、その他にも胸腺、脾臓、肺、心臓、精巣、胃、膵臓で発現していた。しかし顎下腺と肝臓においては、その発現は認められなかった。また、RNaseプロテクションassayに使用したプローブは転写開始点を含むものなので遺伝子導入マウスとヒト腎臓のRNAから得られたRNaseプロテクションassayの結果が同一であることは、転写開始が正確に行われていることを示唆している。タンパク質としてのレンインを測定するため、hRN 8-12の腎臓抽出液を調製して、マウスレンインとは交差せずヒトレンイン活性部位を特異的に認識するモノクローナル抗体を使い直接免疫法で検証した。その結果、遺伝子導入マウス腎臓におけるヒトレンイン量は、ヒト腎臓のレンインよりも約7.5倍高いことが明らかになっ

た。以上のことから、ヒトレニン遺伝子は遺伝子導入マウスの腎臓で最も強く発現し、活性型ヒトレニンも存在することが分かった。

〔II〕腎外組織でのレニン遺伝子発現とプロモーターの活性化

ヒトレニンmRNAの個体内での発現に関する基礎dataを得るため、ヒトレニン遺伝子導入マウスの作製の時と同じマウス株 (C57BL/6) について、マウス本来のレニンmRNAの組織特異的な発現を調べた。以前MillerらはマウスのレニンmRNAが腎、脳、顎下腺、精巣や心臓に分布していることを報告した。そこでRNaseプロテクションassayを用いてマウスにおけるマウスレニンmRNAの発現分布を調べた所、今まで知られていなかった腸での発現を見いだした。この事実をもとに、ヒトレニン遺伝子導入マウスの腸におけるヒトレニンmRNAの発現を調べ、強く発現していることを明らかにした。以前Saitoらは、ヒト小腸の異所性レニン産生腫瘍をNorthern法で解析し、腫瘍部で大量のレニンmRNAの蓄積を報告した。しかし、この時正常部でのレニンmRNAの発現は確認出来なかった。そこで、これらのRNAサンプルをNorthern法より感度が良いRNaseプロテクションassayで解析することにした。解析の結果、正常の小腸組織でもレニンmRNAの発現が認められた。一方、腫瘍部と正常部でのレニンmRNAの発現を比較して見ると、腫瘍部の方で非常に強く発現していることが分かり、二つの仮説を立てた。一つは、本来レニンを発現している細胞が癌化しその細胞が異常増殖した可能性、もう一つは転写に関係するあるfactorあるいはウィルスが感染しウィルス由来のタンパクが作られ、その遺伝子産物が*trans-activating factor*としてヒトレニン遺伝子の転写を強く活性化したのではないかというものである。そこで、二つ目の仮説を詳しく検討するため、腎外組織由来の細胞株であるHeLa細胞でヒトレニン遺伝子が活性化されるかどうかをcAMPとE1A 13Sを用いて調べた。アデノウィルス初期遺伝子産物であるE1Aとスプライシングの差によって四つのタンパクを作るが、その中でも13Sタンパクは細胞本来の遺伝子とウィルス由来の遺伝子の転写を活性化することが知られていたため、今回の実験で使用された。またDuncanらはヒト胎盤由来の細胞で、cAMPによってヒトレニン遺伝子のプロモーターが活性化されるということを報告しているので、cAMPも使用した。ヒトレニン遺伝子の 3kb を上流3kbを大腸菌由来のChloramphenicol acetyltransferaseの構造遺伝子の 3kb の上流につなぎCAT assayを行った。その結果、cAMPの存在下ではプロモーターの活性化が測定出来なかったが、E1A 13Sとco-transfectionした時はプロモーターの活性が8倍も高くなっていることが分かった。さらに3kbのプロモーター部位を欠失させた種々のDNAをCAT遺伝子につなぎ同様のCAT assayを行った所、 30bp から 140bp までの領域がプロモーターの活性化に重要な役目をしていることが明らかになった。

ヒトレニン遺伝子の発現調節の分子機構を理解するためには、発生特異的あるいは組織特異的転写調節因子の詳しい解析をしなければならない。しかし、それより先にすべきことは、ヒトレニン遺伝子の組織特異的あるいは細胞特異的な発現に関する基礎研究である。その点で、今回の研究は、解析しやすくそして将来発展性のあるモデル系を提示したのではないかと思われる。

審 査 の 要 旨

本論文は、血圧調節などの生理作用に重要な働きをしているヒトレニン遺伝子の遺伝子導入マウスを作製し、導入したヒトレニン遺伝子が組織特異的に制御され、発現していることを明らかにした。さらに、ヒトレニン遺伝子のプロモーターについて、培養細胞を用いた解析を行った所、アデノウィルス初期遺伝子産物であるE1A 13Sタンパク質により、その活性化が起こることを明らかにした。

このように得られた多くの新しい知見は、ヒト高血圧症の研究の発展に意味あることであり、特にヒトレニン遺伝子導入マウスの作製はヒト高血圧症のモデル動物作製の第一歩として特筆に値する成果であると思われる。

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。