

氏名(本籍)	小 ^お 澤 ^{ざわ} ふじ子 ^こ (東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1,421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	医学研究科
学位論文題目	アストロサイトの分化にともなうET _B 発現調節機構
主査	筑波大学教授 医学博士 濱口秀夫
副査	理化学研究所 ライフサイエンス筑波研究センター主任研究員 (筑波大学客員教授) 理学博士 石井俊輔
副査	筑波大学教授 医学博士 岡戸信男
副査	筑波大学教授 医学博士 能勢忠男
副査	筑波大学助教授 理学博士 入江勇治

論文の要旨

〈目的〉

エンドセリンは、血管収縮作用のみならず、広範な生物作用を有することが明らかにされてきている。エンドセリンの作用発現に必要なエンドセリン受容体は2種類存在し、そのうちB型受容体(ET_B)は中枢神経系で顕著に発現している。これまでの *in vivo* 及び *in vitro* の研究結果から、アストロサイトの分化と相関してET_BのmRNA(ET_BmRNA)の発現が上昇することが観察されている。本研究はアストロサイトの分化に伴うET_BmRNAの発現上昇の調節機構を明らかにすることを目的として行われた。

〈材料と方法〉

初代培養アストロサイトは、Wistar系ラットの胎仔あるいは新生仔の脳から、また、脳抽出液は7週齢Wistar系ラットの脳皮質から調製した。ノーザンブロット解析はラットET_BcDNAをプローブとして用いて行い、デンシトメーターによって定量した。ET_B遺伝子の転写量の測定は核ランオンアッセイによって行った。ヒトET_B遺伝子の5'上流域を含むDNA断片のクローニングは、マウスET_Bゲノミッククローンのプロモーターと第1エキソンを含むDNA断片をプローブに用いて行った。ヒトET_B遺伝子の翻訳開始点から5'上流2Kbを含むDNA断片をpCATBasicベクターに組み込んでサブクローニングを行った後、初代培養アストロサイトに導入してCAT(chloramphenicol acetyl transferase)アッセイを行い、転写活性や転写調節領域の分析を行った。

〈結果〉

初代培養アストロサイトを1mM Dibutyryl cyclic AMP (DBcAMP) 存在下で培養したところ、ET_BmRNA は12時間後に5倍以上に増加した。核ランオンアッセイでは、DBcAMPの存在下で3～4倍のET_B遺伝子の転写活性の増加が見られた。しかしノーザンブロット解析の結果ではDBcAMPの存在下でET_BmRNAの半減期は6時間以上から約2時間に短縮していた。これらの結果からDBcAMPによるET_BmRNAレベルの増加は転写の促進によることが示唆された。

初代培養アストロサイトのET_BmRNAレベルの上昇は、この細胞の形態的分化成熟を誘導する脳抽出液の存在下でも観察された。さらに、脳抽出液存在下では細胞内グルタミン合成酵素活性の上昇が観察されたが、cAMPの上昇は見られなかった。これらの実験データから、脳抽出液は生化学的にもアストロサイトの分化を誘導し、この際のET_BmRNAの上昇はcAMP依存性でないことが示唆された。

ヒトET_B遺伝子5'上流約2Kbを含むDNA断片を組み込んだpCATBasicベクターを初代培養アストロサイトに導入して転写活性を分析したところ、1mM DBcAMP存在下では牛胎仔血清存在下に比べてCAT活性が約3倍に上昇した。この2KbDNA断片を様々な領域で欠かさずpCATBasicベクターに接続しアストロサイトに導入し分析したところ、翻訳開始点上流-343/-245の99bpが存在するとき、DBcAMP存在下でCAT活性が約3倍に上昇した。この現象は、CAT活性の上昇が2倍程度であったが、脳抽出液の存在下でも観察された。しかしアストロサイトに形態変化をもたらすが生化学的分化を誘導しないLyso Phosphatidyl Serineの存在下ではCAT活性は上昇しなかった。また、-343/-245のDNA断片をラットアストロサイトーマ細胞株、牛肺静脈血管内皮細胞株、ラットオステオサルコマ細胞株に導入して1mM DBcAMP存在下で培養しても、CAT活性の上昇がみられなかった。-343/-245のDNA領域には、Sp-1配列、Ets結合配列、E boxが存在するが、cAMPに応答するCREなどのエレメントは存在しなかった。これらの実験データから、-343/-245領域内にアストロサイトの分化に相関して転写を促進する新しいエレメントが存在する可能性が考えられた。なお、ゲルシフトアッセイの結果から-311/-245のDNA領域に結合する蛋白質が存在する可能性も示唆された。

審 査 の 要 旨

小澤氏は本研究で、アストロサイトの分化に伴うエンドセリンB型受容体mRNAの上昇は、アストロサイトの分化に相関したエンドセリンB型受容体遺伝子の転写活性の増加が原因で起こる可能性を示した。また、この遺伝子の5'上流の特定の領域のエレメントがこの転写活性の増加に関与している可能性を示唆した。最終的な結論を得るにはなお詳細なデータを揃える必要があるが、本研究により得られた実験データは、アストロサイトの分化に伴うエンドセリンB型受容体mRNAの発現上昇の分子機構を解明するうえで有用である。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。