

氏名	牛木 亜季		
学位の種類	博 士（ 農学 ）		
学位記番号	博 甲 第 8151 号		
学位授与年月日	平成 29年 3月 24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	高血圧環境におけるレニン遺伝子転写制御機構の解明		
主査	筑波大学教授	博士（農学）	谷本啓司
副査	筑波大学教授	農学博士	深水昭吉
副査	筑波大学講師	博士（農学）	石田純治
副査	筑波大学教授	博士（獣医学）	杉山文博

論 文 の 要 旨

レニン-アンジオテンシン系は、生体の血圧恒常性維持に必須の昇圧システムの一つである。酵素レニンによる、基質アンジオテンシノーゲンのタンパク質分解反応は同カスケード系における律速反応であり、その触媒反応は最終的に血圧上昇を引き起こす。このため、レニン遺伝子の発現は血圧恒常性維持のための適切なフィードバック制御を受けており、高血圧時にはその転写が抑制される。しかしながら、同制御に関与する転写因子や、*cis* 制御配列などの分子メカニズムについては、これまでほとんど明らかとなっていなかった。この理由として、「血圧」というファクターが動物にのみ存在することから、遺伝子転写制御研究の常法である動物培養細胞を用いた解析が困難であったことが挙げられる。著者は、この問題を解決するために、マウス個体に対するゲノム編集を駆使することで、血圧応答性転写制御 *cis* 配列の同定をおこなった。

審査対象論文の前半で、著者は、15-kb のヒト・レニンと 14-kb のヒト・アンジオテンシノーゲン導入遺伝子を持つことで、高血圧を呈するマウス（つくば高血圧マウス）を実験系に用い、15-kb ヒト・レニン導入遺伝子が、異常な発現応答を示すことを見出した。つまり本来、高血圧時に抑制されるはずのレニン遺伝子発現が、逆に活性化していた。この結果から、著者は「レニン遺伝子の高血圧応答性転写制御領域は、そのタンパク質コード領域の遠位に存在する」という仮説を立てた。そこで次に、156-kb 及び 13-kb のマウス・レニン導入遺伝子を用いて、その転写応答性を検証した結果、マウス・レニン遺伝子座においても、高血圧環境に応答して転写を抑制する *cis* DNA 配列が遠位に存在することを明らかにした。また、既知の制御領域であるマウス遠位エンハンサー配列を欠損する 156-kb のマウス・レニン導入マウスを解析し、同配列は高血圧応答性レニン遺伝子制御に必須でないことを明らかにした。

上述の結果から、著者は、マウス・レニン遺伝子の高血圧応答性転写制御領域が、13-kb 導入遺伝子の外側、かつ 156-kb 導入遺伝子の内側に存在すると考えた。そこで審査対象論文の後半では、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いることで、まず同領域の位置を大まかに同定することとした。その結

果、高血圧応答性領域は、マウス・レニン遺伝子上流約 17-kb の範囲に存在することが明らかとなり、また、同 17-kb 領域が正常血圧状態においてエンハンサー活性を持つことを見いだした。そこで、同エンハンサー活性を指標とし、レニン産生細胞を用いたレポーター・アッセイにより、同活性のコア領域を転写開始点上流 3-kb 付近の領域に絞り込んだ。最後に、同領域のみをマウス内在レニン遺伝子座から CRISPR/Cas9 ゲノム編集法により欠失させた。同マウスの解析の結果、同領域が *in vivo* においてもエンハンサー活性を有し、また、高血圧応答性制御に重要な役割を果たすことが明らかとなった。以上の結果は、マウス個体が高血圧の時に、レニン遺伝子の転写抑制を介して、血圧恒常性を維持する分子メカニズムの一端を明らかにしたものであり、動物のホメオスタシスに関わる基礎的なメカニズムの理解につながるだけでなく、将来、高血圧治療のターゲットとなる可能性も期待される。

審 査 の 要 旨

本論文は、動物に特有の体内環境である血圧に着目し、環境応答性遺伝子発現制御メカニズムの解明を目指した研究の成果である。哺乳動物における血圧異常発症メカニズムの理解のために、生化学、分子生物学、発生工学的手法を用いて、レニン-アンジオテンシン系に関する多くの研究がおこなわれてきた。その成果として、同系の酵素阻害剤や受容体拮抗薬が高血圧の治療薬として広く使用されている。しかしながら、これらの多くは対症療法であり、高血圧の根本原因は分かっていないことが多い。特に、レニン-アンジオテンシン系遺伝子の発現制御研究については、生体内でレニンを産生する細胞が腎臓傍糸球体細胞というごく限られた細胞であることや、遺伝子活性を修飾する因子が血圧という物理的要因であることなどから、遅々として進まなかった。著者は、その実験期間が長期に渡ることも厭わずにマウス遺伝学手法を採用し、近年、急速に進歩したゲノム編集技術を用いて時間短縮をはかることで、*in vivo*における転写制御研究に新たな局面を切り開いた。同研究の延長線上には、高血圧発症に関わる遺伝子発現メカニズムの基盤的理解が期待され、非常に価値が高いと考えられる。

平成29年1月17日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。