

氏 名（本籍）	たに 谷	やま 山	よし 佳	ひろ 弘
学位の種類	博 士（医 学）			
学位記番号	医 博 第 1 5 9 9 号			
学位授与年月日	平 成 1 2 年 3 月 2 3 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）内科学系専攻			
学位論文題目	Transcriptional Regulation and Chromosomal Localization of Rat Thiazide-Sensitive Na-Cl Cotransporter Gene. （ラットサイアザイド感受性 Na-Cl 共輸送体遺伝 子発現調節機構の研究）			
	（主 査）			
論文審査委員	教授 伊 藤 貞 嘉 教授 岡 本 宏			
	教授 丸 山 芳 夫			

論文内容要旨

サイアザイド感受性 Na-Cl 共輸送体 (TSC) は腎遠位曲尿細管に特異的に発現し、電解質代謝や血圧調節に重要な役割を担っている。これまでに報告されている生理学および薬理学的検討により、デキサメサゾン (Dex), アルドステロン (Ald), 17β -エストラジオール (Est) といったステロイドホルモンにより TSC 発現が亢進することが示され、これらのステロイドホルモンによる塩貯留および体液量増加作用の一部に TSC 発現亢進が関与している可能性が示唆されている。しかしながら、TSC 遺伝子転写調節領域の構造および機能に関しては未だいかなる種においても報告されておらず、TSC 遺伝子の部位特異的あるいはステロイドホルモンによる発現調節機構についても不明である。そこで、今回 TSC の発現調節機構を解明する目的でラット (r) TSC 遺伝子転写調節領域のクローニングおよびその転写機能の解析を行なった。

rTSC 遺伝子の 5'隣接領域 (5' FL/rTSC) をラットゲノムライブラリーを鋳型とし PCR 法によりクローニングした。5' FL/rTSC の塩基配列を決定しシス配列の検索を行なった。転写開始点の同定はプライマー伸長法および 5'-RACE 法で行なった。5' FL/rTSC とルシフェラーゼ cDNA のキメラ発現ベクター (rTSC/Luc) を作成し、さらに既報の方法で deletion mutant も作成した。この rTSC/Luc をヒト腎上皮由来細胞 HEK293 にトランスフェクションし、一過性に発現したルシフェラーゼ (Luc) の活性を測定することにより 5' FL/rTSC の転写活性を評価した。様々な鎖長の 5' FL/rTSC を含むキメラ Luc 発現ベクターを用い、鎖長と Luc 発現との関係を比較検討した。HEK293 およびラット培養血管平滑筋細胞 (VSMC) における内因性 TSC mRNA 発現を RT-PCR 法で検討し、TSC mRNA を発現する HEK293 と発現のない VSMC において組織特異的転写活性を検討した。Dex, Ald, あるいは Est が 5' FL/rTSC の転写活性に及ぼす影響を検討した。次に、遠位曲尿細管に局在し腎特異的転写因子とされる hepatocyte nuclear factor-3/fork head homologue-3 (HFH-3) の cDNA をクローニングし発現ベクターにサブクローニングした。HEK293 にこのコンストラクトを rTSC/Luc と同時にトランスフェクションすることにより、HFH-3 が 5' FL/rTSC 転写活性に与える影響を検討した。

約 2.1kb の 5' FL/rTSC をクローニングし、TATA ボックス、グルココルチコイド反応領域、あるいは HFH-3 の結合配列などと想定される配列を認めた。プライマー伸長法、5'-RACE により、転写開始点は既報の cDNA 5' 端より 8 塩基上流にあると考えられた。rTSC/Luc を HEK293 に導入したところ、対照に比較し有意な Luc 発現の増加 (約 26 倍) が見られた。様々な鎖長の 5' FL/rTSC を含むキメラ Luc 発現ベクターを用い Luc 発現を比較検討したところ、Luc 発現はクローニングした全長の 5' FL/rTSC をもつコンストラクトで最も高く、かつその長さに依存し

ていた。HEK293 における Luc 発現は VSMC に比して有意に高値であった (約 8 倍)。HEK293 細胞において Dex, Ald, および Est はいずれも Luc 発現を約 30% 増加させた。また, ステロイドホルモン依存性遺伝子転写機構をもつ VSMC においても, Dex, Ald, および Est はいずれも Luc 発現を有意に増加させた。HFH-3 発現ベクターの同時トランスフェクションにより Luc 発現は約 2 倍に増加した。さらに, deletion analysis の結果 HFH-3 による転写活性の亢進には, 近位側の HFH-3 結合配列と考えられる部位が重要であることが示唆された。

rTSC 遺伝子の機能的転写調節領域 (2.1kb) をクローニングした。この領域に TSC の腎特異的発現局在を規定する転写調節が存在しており, さらにその発現調節機構に HFH-3 が関与している可能性が示唆された。ステロイドホルモンにより TSC 発現は転写性に調節されていると考えられ, ステロイドホルモンによる塩貯留の機序に TSC 発現誘導の関与が示唆された。

審査結果の要旨

サイアザイド感受性 Na-Cl 共輸送体 (TSC) は電解質代謝や血圧調節に重要な役割を担っている。mRNA レベル及び蛋白レベルで TSC 発現を検討した報告では、TSC は腎ネフロンのうち遠位曲尿細管に特異的に発現しているが、その部位特異的発現調節機構については十分な理解が得られていない。最近、hepatocyte nuclear factor-3 の DNA 結合領域のホモロジーを利用して、hepatocyte nuclear factor-3/forkhead homologue-3 (HFH-3) がクローニングされた。HFH-3 は Winged helix family に属する転写因子で、その mRNA 発現について見ると腎遠位曲尿細管に限局しており、TSC の発現部位と良く一致していた。TSC の部位特異的発現調節機構についても HFH-3 が関わっているものと推定された。一方、これまでの報告でデキサメサゾン、アルドステロン、 17β -エストラジオールといったステロイドホルモンにより TSC の発現レベルが上昇し、これらのステロイドホルモンによる塩貯留及び体液量増大作用に TSC 発現亢進が関与している可能性が示唆されている。TSC 遺伝子の転写調節領域の検討はこれまでいかなる種においても報告されていないため、ラット (r) TSC 遺伝子において転写調節領域のクローニング及びその転写機能の解析を行い、さらに TSC の部位特異的発現調節機構に HFH-3 が関与している可能性について検討を行った。また、デキサメサゾン、アルドステロン、 17β -エストラジオールといったステロイドホルモンが TSC 遺伝子転写に与える影響についても検討した。

本研究により TSC 遺伝子の機能的転写調節領域の構造及び機能についてはじめて明らかとなった。その結果、TSC の部位特異的発現調節及びステロイドによる発現調節に関して、TSC の腎遠位曲尿細管特異的発現を規定する転写調節がクローニングした rTSC 遺伝子 5' 隣接領域の中に存在しており、さらにその発現調節機構に HFH-3 が関与している可能性、またステロイドホルモンにより TSC 発現は転写性に調節されている可能性が示された。

腎ネフロンにおいて部位特異的に発現する分子種の発現調節機構については、これまでほとんど知見がなく、今回の実験結果はその機構の一つのメカニズムを明らかにする可能性がある。このメカニズムが明らかとなれば、外来性に導入した遺伝子を遠位曲尿細管特異的に発現させることが可能となり、腎生理研究あるいは遺伝子治療を行う際に有用であると考えられる。一方、ステロイドホルモンが塩貯留を生じる機序に関して、生理学的には検討の難しい遠位曲尿細管の役割が、TSC の発現亢進を通じて明らかとなる可能性が示唆された。よって、十分学位に値するものと思われる。