Isolation of Novel Genes Showing Aberrant Expression in Blood Vessel of Animal Models for Essential Hypertension

金沢大学十全医学会雑誌 第106巻 第6号 598－605（1997）

本態性高血圧症モデル動物血管で発現異常を示す新しい遺伝子の分離

金沢大学医学部医学科内科学第二講座（主任 馬渕 宏教授）
金沢大学医学部医学科生化学第二講座（主任 山本 博教授）
古 川 健 治

我が国における高血圧患者の約90％は本態性高血圧症に分類されるが，本症の原因は未だ不明であり，その発症や進展に関わる遺伝子の実体もほとんど明らかでない．本研究で筆者は，本態性高血圧の発症及び本症に伴う血管傷害進展に関与する遺伝素因の実体解明を目的として，蛍光ディファレンシャルディスプレイ法により本態性高血圧モデル動物血管で発現異常を示す遺伝子の分離を行った．すなわち高血圧自然発症ラットおよびその重症型である脳卒中易発症性高血圧自然発症ラットとそれらの正常親株であるウィスター京都ラットの大動脈より分離した全RNAを蛍光ディファレンシャルディスプレイ法で分析し，高血圧ラットと正常ラットでシグナル強度が異なるcDNA断片を15種類分離した．当該cDNA断片をクローン化後，それをプローブとして大動脈RNAのノーザンブロット分析を行った結果，分離cDNAのうち少なくとも2種につき高血圧ラットでの発現異常が確認された．このうち高血圧ラットで過剰発現するA230遺伝子は，システインに富む379アミノ酸残基の分泌性蛋白をコードしており，初期応答遺伝子の一種である*cyr61*遺伝子のラットホモローグと推定されたことから，細胞増殖に関係している可能性が考えられた．一方，高血圧ラットで発現低下するG53Wは，がん抑制遺伝子の一種であると考えられるヒト*dlg3*遺伝子と一部相同性を示した．

Key words fluorescent differential display, spontaneously hypertensive rat, *cyr61*, *dlg3*

高血圧は成人病の中で最も多い疾患の一つであり，その90％は原因不明の本態性高血圧に分類される．本症は，血管トーヌスや血流の制御に関係すると考えられる昇圧遺伝子・降圧遺伝子・環境応答性血圧調節遺伝子などの異常により血圧調節のバランスが崩れた状態であると想定されている．従って本態性高血圧の予知や予防，治療のため，関係する遺伝子を一つ一つ同定して行くことが急務となっている．一方高血圧は心血管合併症の危険因子として重要であり，臨床的には高血圧であること自体よりも，高血圧に伴う血管障害による脳症，腎症，心血管障害が生体に直接的に様々な障害を引き起こすことが知られている．血管はそれ自体が単なる血液循環のパイプとしてだけでなく，様々な生理活性物質の合成・分泌を行い循環調節・血管壁再構築などに深く関与していること[1]から，血管細胞での遺伝子発現異常が高血圧の発症や増悪の要因となっている可能性が考えられる．しかしながら高血圧患者或は高血圧モデル動物血管において，発現異常を示す遺伝子を系統的に検索した研究は殆ど行われていない．

そこで今回筆者は，本態性高血圧や本態性高血圧に伴う血管障害の発症と進展の分子機構を明らかにする目的で，種々の刺激や病的状態で発現が増大または低下する遺伝子を発見するのに有用な方法である蛍光ディファレンシャルディスプレイ法(fluorescent differential display，FDD)[2)-4)]を用いて，高血圧及び高血圧性血管障害のモデル動物である高血圧自然発症ラット(spontaneously hypertensive rat，SHR)・脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (stroke-prone SHR，SHRSP) とこれらの正常親株であるウィスター京都ラット (wistar-kyoto rat，WKY) 大動脈での発現量を比較し，高血圧ラットで異常発現している遺伝子の分離を試みた．

材料および方法

Ⅰ．材　料

ラットは，高血圧発症後の二次的な因子を出来るだけ除外するために，高血圧発症前期と考えられる6週齢のWKY・SHR・SHRSP (SHR Research Institute，京都) を用いた．大動脈は，ラットをネンブタール麻酔下に断頭後摘出し，外膜及び脂肪組織を除去後細切し，全RNAを分離した．

Ⅱ．RNAの分離

全RNAはChomczynskiら[5)]の方法に基いて，ラット10匹分より抽出し，DNAの混入を防ぐためRNase不含DNaseで消化した．ポリA^+ RNAはAvivら[6)]の方法に従いクイックプレップ

平成9年11月26日受付，平成9年12月16日受理

Abbreviations：CTGF, connective tissue growth factor; DD, differential display; DHR, discs-large homology region; FDD, fluorescent differential display; RACE, rapid amplification of cDNA ends; SH3, Src homology 3; SHR, spontaneously hypertensive rat; SHRSP, stroke-prone SHR; TGFβ, transforming growth factor β; WKY, Wistar-Kyoto rat mRNA精製キット (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いて分離した.

Ⅲ. FDD法

FDD法はItohら[4]の方法に基づいて, 以下のように行った.

1. 逆転写反応及びPCR

全RNA 2.5μgに, 蛍光色素テキサスレッドでラベルした3'アンカープライマー (GTTTTTTTTTTTTTTN, N=A, G, C) 50pmolを加え10分間70℃の加熱を行った後, 200単位のスーパースクリプトⅡ逆転写酵素 (Gibco BRL, Rockville, USA) を加え, 42℃50分間保持した. 逆転写反応は90℃5分間の加熱により停止させた. この反応液をTris-EDTA (10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA) で5倍希釈したもの2μlに10pmolのアービトラリープライマー (the RNAmap kit, GenHunter Corp., Nashville, USA), 5pmolの3'アンカープライマー, 1nmolのdNTP, 1単位のジーンタックポリメラーゼ (ニッポンジーン, 富山) を加え, さらにPCR反応緩衝液 (ニッポンジーン) が1xとなるように加えて最終的に20μlとした. 反応液を混和後, ウーノサーモブロック (Biometra, Tampa, USA) を用いて94℃3分間の初期変性後, 1サイクルあたり94℃15秒間, 40℃2分間, 72℃1分間の条件で計40サイクルの増幅反応を行った.

2. ゲル電気泳動及びクローニング

増幅したcDNA断片に同量の色素溶液 (98%フォルムアミド, 10mM EDTA, 0.01%メチルヴァイオレット) を加えて90℃で2分間変性後, SQ-5500 DNAシークエンサー (日立, 東京) を用い, 6%ポリアクリルアミド7M尿素ゲル上で泳動し, バンドの蛍光強度を各レーン間で比較した. シグナル強度に差が認められたcDNA断片はフルオロイメージャー (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) を用いてゲルより切り出し, PCRで再増幅後, 得られた断片をpCR2.1ベクター (Invitrogen, San Diego, USA) を用いてクローン化した.

Ⅳ. ノーザンブロット解析

全RNA 20μgを変性後1.5%アガロースゲル上で電気泳動し, ナイロンフィルターに転写の後, 紫外線にて固定した. ついでフィルターをハイブリダイゼーション液 [50%ホルムアミド, 5x食塩－リン酸ソーダーエチレンジアミン四酢酸液, 5xデンハルト液 (0.1%ポリビニールピロリドン, 0.1%ウシアルブミン, 0.1%フィコール), 1%SDS, 500μg/ml変性サケ精子DNA (Sigma, St.Louis, USA)] 中で42℃, 6時間プレハイブリダイズした後, 上記ハイブリダイゼーション液に^{32}P標識オリゴヌクレオチドプローブを加えた溶液中で42℃, 16時間ハイブリダイズした. プローブはクローン化した候補cDNAを*Eco*RIを用いて切断し, プライムイッツランダムラベリングキット (Stratagene, LaJolla, USA) と[α-^{32}P] dCTP (NEN Research Products, Wilmington, USA) を用いて^{32}P標識した. ハイブリダイゼーション後, フィルターを2xSSC, 0.1%SDSにて37℃で20分間, ついで0.5xSSC, 0.1%SDSにて37℃で20分間洗浄し, －80℃でオートラジオグラフィーを行った. さらにバイオイメージアナライザーFUJIX BAS1000 (富士フィルム, 浜松) により放射活性の測定を行った.

Ⅴ. DNA塩基配列決定

クローン化cDNAを鋳型としてサーモシーケネースプレミックストサイクルシークエンシングキット (Amersham, Buckinghamshire, UK) を用いたジデオキシ法[7]によるサイクルシークエンシングを行い, SQ-5500 DNAシークエンサー (日立) にて電気泳動と配列ラダーの読み取りを行った.

Ⅵ. cDNA末端迅速増幅法 (rapid amplification of cDNA ends, RACE)

RACEは, FDDで分離したcDNA断片の塩基配列を基にプライマーを作製し, 大動脈ポリA^{+} RNAを用いて, マラソンcDNAアンプリフィケーションキット (CLONTECH, Palo Alto, USA) にて行った.

成　　績

Ⅰ. 高血圧モデル動物血管で発現異常を示す遺伝子のFDD法による検出

6週齢のSHR・SHRSP及その正常親株WKYの大動脈からRNAを分離し, アンカープライマー3種とアービトラリープライマー20種を用いた計60通りのプライマーの組み合わせでFDD法により解析したところ, 表1に示すように200から600塩基対までの長さの15の候補フラグメントが得られた. 図1に, ノーザン解析で発現異常が確認され以後解析を行ったA230とG53Wを同定したFDDパターンを示す.

Ⅱ. FDD法で得られた候補cDNA断片のノーザンブロット法による確認

FDD法で認められた遺伝子の発現を確かめるため, クローン化した候補cDNA断片をベクターより*Eco*RIで切り出し, これをプローブとしてノーザンブロット分析を行った. その結果表1に示すように, ノーザンブロッティングを行った5つの候補cDNA断片のうち3つの候補cDNA断片 (A230, A231, G53W) において, FDD法で認められたと同様の遺伝子発現変化を確認できた. A230をプローブとしてラット大動脈RNAを分析したところ, 鎖長約2-3kbのmRNAが検出された. 当該

Table 1. Analysis of cDNA fragments identified by fluorescent differential display

Fragment name	Size of PCR product (bp)	Expression in hypertensive rats	Northern analysis
A230	296	Up	Confirmed
A231	290	Up	Confirmed
G53W	262	Down	Confirmed
G441	About 400	Up	Not confirmed
G55	About 500	Up	Not confirmed
A22W	About 200	Down	Not performed
A21W	About 200	Down	Not performed
G45W	About 600	Down	Not performed
G43	About 300	Up	Not performed
G42	About 200	Up	Not performed
G55W	About 500	Down	Not performed
G440	About 400	Up	Not performed
A35W	About 500	Down	Not performed
A52	About 200	Up	Not performed
A54	About 400	Up	Not performed

mRNAはWKYに比してSHRでは約2.5倍，SHRSPでは約5.5倍の発現上昇が認められ（図2A），図1Aに示したFDDパターンと一致した．G53Wをプローブとしたラット大動脈RNA分析では，鎖長約2-3kbのmRNAが検出された（図2B）．当該mRNAはWKYに比してSHRでは約20％，SHRSPでは約40％の発現しか認めず，図1Bに示したFDDパターンと一致した．

Ⅲ．候補cDNAの一次構造

上記の3つのcDNA断片の塩基配列を決定した結果，A231はA230の一部であることが判明した．従って，A230，G53Wの2つの遺伝子に対してRACE法を行い，より鎖長の長いcDNAを得た．

5'RACE法により，A230cDNAでは，ポリAを除き1823塩基の配列が決定された（図3）．この配列はコード域の全長を含み，379個のアミノ酸からなる分子量約45キロダルトンの蛋白をコードすると推定された．本cDNAにコードされる蛋白はシステインに富み，N末端にシグナル配列と推定される配列を有していることから分泌蛋白と考えられた．DNAデータベース検索の結果，A230はマウス*cyr61* [8]に高い相同性を示し，ヌクレオチドでは87.8％，アミノ酸では97.9％の配列の一致が認められた（図4）．このことからA230遺伝子は*cyr61*のラットホモローグであると考えられた．

又，G53Wはアービタリープライマーとに富む内部領域との間で増幅されたものと考えられたため，5'-及3'-RACE法を行い，750塩基のcDNA塩基配列を決定した（図5）．得られたcDNAはデータベースとのホモロジー検索を行った結果ヒト*dlg3* [9]と相同性を示し，同遺伝子のディスクスラージ相同領域

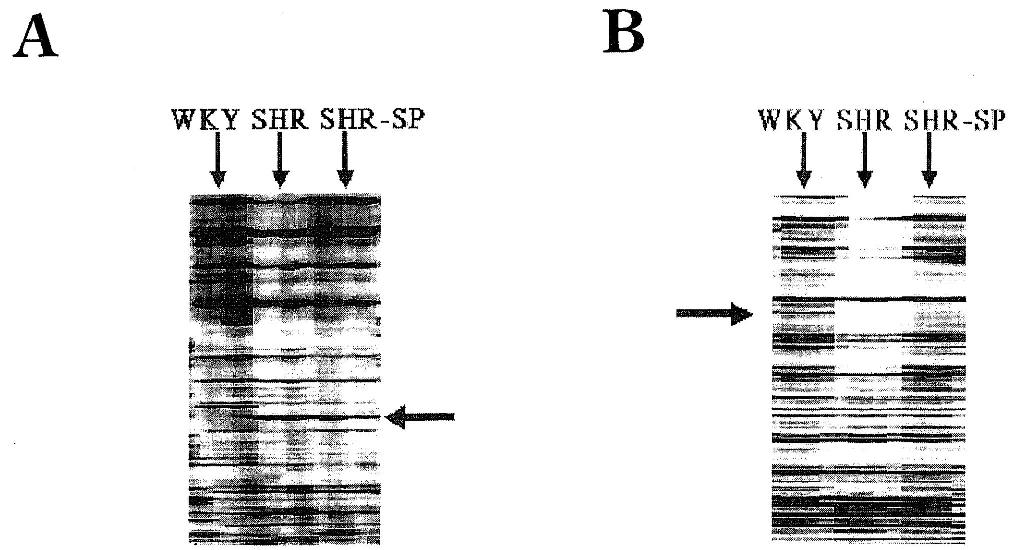

Fig. 1. Representative band patterns on fluorescent differential display analysis showing A230 (A) and G53W (B) in the aorta of hypertensive rats. Total RNA was extracted from aortae of 6-week-old WKY, SHR, and SHRSP and subjected to fluorescent differential display analysis. The image was taken with HTACHI SQ5500 DNA sequencer. Primer combination used are as follows: A, $GT_{15}A$ and GACCGCTTGT; B, $GT_{15}G$ and GTTGCGATCC.

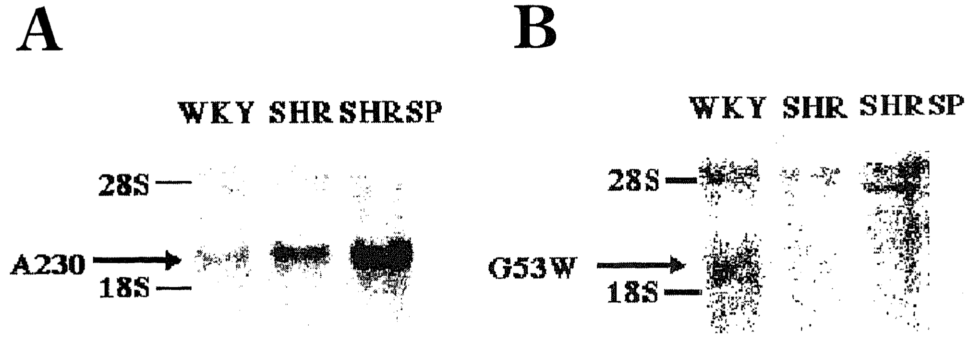

Fig. 2. Northern blot analysis confirming up-/ down-regulated bands of fluorescent differential display. Total RNA (20μg per lane) obtained from rat aorta was subjected to northern blot analysis using ^{32}P-labeled probe. (A) Rat aorta RNA was hybridized with A230 probe. An arrow indicates A230 mRNA. A230 mRNA of SHR was 2.5-fold higher than WKY. A230 mRNA of SHRSP was 5.5-fold higher than WKY. (B) Rat aorta RNA was hybridized with G53W probe. An arrow indicates G53W mRNA. G53W mRNA of WKY was 5-fold higher than SHRSP and 2.5-fold higher than SHRSP.

```
   1  CCGGCTCCTCCTGCGCGCCACAATGAGCTCCAGCACCATCAAGACGCTCGCTGTCGCCGT
                            M  S  S  S  T  I  K  T  L  A  V  A  V   13
  61  CCCCCTTCTCCACTTGACCAGGCTGGCACTCTCCACCTGCCCTGCCTCCTGCCACTGCCC
       P  L  L  H  L  T  R  L  A  L  S /T  C  P  A  S  C  H  C  P   33
 121  TCTGGAGGCGCCCAAGTGCGCCCCGGGAGTCGGCTTGGTCCGGGACGGCTGCGGCTGCTG
       L  E  A  P  K  C  A  P  G  V  G  L  V  R  D  G  C  G  C  C   53
 181  TAAGGTCTGCGCGAAGCAACTCAACGAGGACTGCAGCAAAACGCAACCCTGCGACCACAC
       K  V  C  A  K  Q  L  N  E  D  C  S  K  T  Q  P  C  D  H  T   73
 241  CAAGGGGCTGGAATGCAATTTCGGCGCCAGTTCCACCGCTCTGAAAGGGATCTGCAGAGC
       K  G  L  E  C  N  F  G  A  S  S  T  A  L  K  G  I  C  R  A   93
 301  TCAGTCAGAAGGCAGACCTTGTGAATATAACTCCAGGATCTACCAGAACGGGGAGAGCTT
       Q  S  E  G  R  P  C  E  Y  N  S  R  I  Y  Q  N  G  E  S  F  113
 361  CCAACCCAACTGTAAACATCAGTGCACATGTATTGACGGTGCTGTGGGCTGCATTCCTCT
       Q  P  N  C  K  H  Q  C  T  C  I  D  G  A  V  G  C  I  P  L  133
 421  GTGTCCCCAAGAACTGTCTCTCCCCAATCTGGGCTGTCCCAACCCCCGGCTGGTGAAAGT
       C  P  Q  E  L  S  L  P  N  L  G  C  P  N  P  R  L  V  K  V  153
 481  CAGCGGGCAGTGCTGTGAGGAATGGGTCTGTGATGAAGACAGCATTAAGGACTCCCTGGA
       S  G  Q  C  C  E  E  W  V  C  D  E  D  S  I  K  D  S  L  D  173
 541  CGACCAGGACGACCTCCTTGGATTCGATGCCTCGGAGGTGGAGTTAACAAGAAACAATGA
       D  Q  D  D  L  L  G  F  D  A  S  E  V  E  L  T  R  N  N  E  193
 601  GTTAATCGCAACTGGCAAAGGCAGCTCACTGAAGAGGCTTCCTGTCTTTGGCACGGAACC
       L  I  A  T  G  K  G  S  S  L  K  R  L  P  V  F  G  T  E  P  213
 661  TCGAGTCCTTTACAACCCCCTGCATGCCCATGGCCAGAAATGCATCGTTCAGACTACGTC
       R  V  L  Y  N  P  L  H  A  H  G  Q  K  C  I  V  Q  T  T  S  233
 721  CTGGTCCCAGTGCTCCAAGAGCTGCGGAACTGGCATCTCCACACGAGTTACCAATGACAA
       W  S  Q  C  S  K  S  C  G  T  G  I  S  T  R  V  T  N  D  N  253
 781  CCCGGAGTGCCGCCTGGTGAAAGAGACCCGGATCTGTGAAGTGCGTCCTTGTGGACAACC
       P  E  C  R  L  V  K  E  T  R  I  C  E  V  R  P  C  G  Q  P  273
 841  AGTGTACAGCAGCCTAAAAAAGGGCAAGAAATGCAGCAAGACCAAGAAATCCCCAGAACC
       V  Y  S  S  L  K  K  G  K  K  C  S  K  T  K  K  S  P  E  P  293
 901  AGTCCGATTTACTTATGCAGGATGCTCCAGTGTGAAGAAATACCGGCCCAAATACTGCGG
       V  R  F  T  Y  A  G  C  S  S  V  K  K  Y  R  P  K  Y  C  G  313
 963  CTCCTGCGTGGACGGTCGGTGCTGCACACCTCTGCAGACCAGGACCGTGAAGATGCGGTT
       S  C  V  D  G  R  C  C  T  P  L  Q  T  R  T  V  K  M  R  F  333
1021  CCGGTGCGAAGATGGCGAGATGTTCTCCAAGAACGTCATGATGATTCAGTCCTGCAAGTG
       R  C  E  D  G  E  M  F  S  K  N  V  M  M  I  Q  S  C  K  C  353
1081  TAACTACAACTGCCTGCATCCCAACGAGGCGTCGTTTCGCCTCTACAGTCTGTTCAACGA
       N  Y  N  C  L  H  P  N  E  A  S  F  R  L  Y  S  L  F  N  D  373
1141  TATCCACAAGTTCAGGGACTAAAGGTCTCCTGGGTTTCTAGTGTGGGTCGGACAGAGGTG
       I  H  K  F  R  D  *                                          379
1201  TTGAGCATCGTGGAGACGTGGGCAGACGGTGGGCGAACAGTGCCTTGCTCATCATCAAGT
1261  AGGATTAAGGTGTTTCAAAACTGCCGTAGGGCTGCTGCTATGGATGGACAGTAACGCATC
1321  GCAGTTGGAGAATACTTCGCTTCATAGTACTGGAGCCCGGGTTACGTACGCTTCATATTG
1381  GAGCATGTTTATAGATGATGTTCTGTTTTCTGTTTGTAAATTATTTTGCTAAGTGTTTTT
1441  TTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTGCTCCATTTCTCCCCCTCCCCCCTTGGTTCTACAA
1501  TTGTAATAGAGATAAAATAAGACTAGTTGGGTCAAGTGAAAGGACCGCTTGTCCTTTGAC
1561  AGAAGTAAAATGAAAGGCCTCTCCTGCCTTCCCCAGTGGAGGCAGGGGACACTCTGTGAG
1621  TGCCCTTGAGGCTACTACCTGCACTCTAAACTGCAAACAGAAACCAGGTGTTCTAAGATT
1681  GAATGTTTTATTTATCAAAATGTAGCTTTCGGGGAGGGATGGGGAAATGTAATACTGGA
1741  ATAATTTGTAAATGATTTTAATTTTATATCAGTGAAGAGAATTTATTTATAAAATTAATC
1801  ATTTAATAAAGAAATATTTACCT(A)n
```

Fig. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequence of A230. The amino acid sequence is shown by the single letter code under the nucleotide sequence of A230. The *asterisk* indicates the stop codon. A consensus polyadenylation signal in the 3' non-coding region is boxed. AU-rich elements are underlined. The potential site of signal peptide cleavage is marked by the slash.

```
  1'  MSSSTIKTLAVAVPLLHLTRLALSTCPASCHCPLEAPKCAPGVGLVRDGCGCCKVCAKQL
      *****..******.**************.*******************************
  1"  MSSSTFRTLAVAVTLLHLTRLALSTCPAACHCPLEAPKCAPGVGLVRDGCGCCKVCAKQL

 61'  NEDCSKTQPCDHTKGLECNFGASSTALKGICRAQSEGRPCEYNSRIYQNGESFQPNCKHQ
      ************************************************************
 61"  NEDCSKTQPCDHTKGLECNFGASSTALKGICRAQSEGRPCEYNSRIYQNGESFQPNCKHQ

121'  CTCIDGAVGCIPLCPQELSLPNLGCPNPRLVKVSGQCCEEWVCDEDSIKDSLDDQDDLLG
      ************************************************************
121"  CTCIDGAVGCIPLCPQELSLPNLGCPNPRLVKVSGQCCEEWVCDEDSIKDSLDDQDDLLG

181'  FDASEVELTRNNELIATGKGSSLKRLPVFGTEPRVLYNPLHAHGQKCIVQTTSWSQCSKS
      .**************.******************.*************************
181"  LDASEVELTRNNELIAIGKGSSLKRLPVFGTEPRVLFNPLHAHGQKCIVQTTSWSQCSKS

241'  CGTGISTRVTNDNPECRLVKETRICEVRPCGQPVYSSLKKGKKCSKTKKSPEPVRFTYAG
      ************************************************************
241"  CGTGISTRVTNDNPECRLVKETRICEVRPCGQPVYSSLKKGKKCSKTKKSPEPVRFTYAG

301'  CSSVKKYRPKYCGSCVDGRCCTPLQTRTVKMRFRCEDGEMFSKNVMMIQSCKCNYNCLHP
      ********************************************************* **
301"  CSSVKKYRPKYCGSCVDGRCCTPLQTRTVKMRFRCEDGEMFSKNVMMIQSCKCNYNCPHP

361'  NEASFRLYSLFNDIHKFRD
      *******************
361"  NEASFRLYSLFNDIHKFRD
```

Fig. 4. Alignment of amino acid sequences of A230 (upper sequence) and mouse *cyr61* gene product (lower sequence). Asterisks and dots indicate identity and similarity, respectively.

```
  1  GAAGATGAGAAACTTCACTACTATGAGAAGCAGAGTCCAGTGCCCATTCTCCATGGCGCG
     E  D  E  K  L  H  Y  Y  E  K  Q  S  P  V  P  I  L  H  G  A   20

 61  GCAGCTTTGGCTGATGACCTGGCTGACGAGCTCCAGAACAAGCCACCAAACAGTGAGATC
     A  A  L  A  D  D  L  A  D  E  L  Q  N  K  P  P  N  S  E  I   40

121  AGAGAGCTGTTGAAACTGCTGTCCAAACCCAATGTGAAGGCTTTGCTGTCAGTGCATGAT
     R  E  L  L  K  L  L  S  K  P  N  V  K  A  L  L  S  V  H  D   60

181  ACTGTGGCTCAAAAGAGTTACGATCCTGTATTGCCTCCCATGCCTGACGATATTGATGAC
     T  V  A  Q  K  S  Y  D  P  V  L  P  P  M  P  D  D  I  D  D   80

241  GAGGAAGACTCTGTGAAAATCATCCGCCTGGTTAAGAACAGAGAGCCTCTGGGTGCTACT
     E  E  D  S  V  K  I  I  R  L  V  K  N  R  E  P  L  G  A  T  100

301  ATTAAAAAAGATGAACAGACCGGAGCGATCACCGTGGCCCGAATCATGCGGGGAGGAGCT
     I  K  K  D  E  Q  T  G  A  I  T  V  A  R  I  M  R  G  G  A  120

361  GCAGATAGAAGTGGTCTTATTCATGTGGGCGATGAGCTAAGGGAAGTGAATGGGATCCCA
     A  D  R  S  G  L  I  H  V  G  D  E  L  R  E  V  N  G  I  P  140

421  GTGGAAGATAAGAGGCCCGAGGAAATAATACAGATTTTGAGTCAGTCCCAGGGAGCAATT
     V  E  D  K  R  P  E  E  I  I  Q  I  L  S  Q  S  Q  G  A  I  160

481  ACATTTAAGATAATACCCAGCACCAAAGAGGAGATACCTTCTAAAGAGGGCAAGATATTT
     T  F  K  I  I  P  S  T  K  E  E  I  P  S  K  E  G  K  I  F  180

541  ATCAAAGCCCTCTTTGACTATGATCCTAAGGAGGGCAAGGCGATCCCATGTAAAGAGGCA
     I  K  A  L  F  D  Y  D  P  K  E  G  K  A  I  P  C  K  E  A  200

601  GGCCTGTCTTTCAGGAAGGGTGACATTCTTCAGATTATGAGCCAAGATGATGCGACATGG
     G  L  S  F  R  K  G  D  I  L  Q  I  M  S  Q  D  D  A  T  W  220

661  TGGCAGGCTAAGCATGAAGGTGACACCAACCCCAGAGCGGGCCTGATTCCCTCGAAGCAC
     W  Q  A  K  H  E  G  D  T  N  P  R  A  G  L  I  P  S  K  H  240

721  TTCCAGGAACGGAGACTGGCTCTGAGACGA
     F  Q  E  R  R  L  A  L  R  R  250
```

Fig. 5. Partial nucleotide and deduced amino acid sequence of G53W. The amino acid sequence is shown by the single letter code under the nucleotide sequence of G53W.

```
  1' EDEKLHYYEKQSPVPILHGAAALADDLADELQNKPPNSEIRELLKLLSKPNVKALLSVHD
     .***.***.***.*.**.*.***.*. .***. . .*. ****.***.*...*.* ***
 49" IHEKLRYYERQSPTPVLHSAVALAEDVMEELQAASVHSDERELLQLLSTPHLRAVLMVHD

 61' TVAQKSYDPVLPPMPDDIDDE--EDSVKIIRLVKNREPLGATIKKDEQTGAITVARIMRG
     *****..******.**.**..  *.****.*****.*******..**..**..*******
109" TVAQKNFDPVLPPLPDNIDEDFDEESVKIVRLVKNKEPLGATIRRDEHSGAVVVARIMRG

119' GAADRSGLIHVGDELREVNGIPVEDKRPEEIIQILSQSQGAITFKIIPSTKEEIPSKEGK
     ********.***********.* .***.** ***.****.**.****.*.** . **.*
169" GAADRSGLVHVGDELREVNGIAVLHKRPDEISQILAQSQGSITLKIIPATQEEDRLKESK

179' IFIKALFDYDPKEGKAIPCKEAGLSFRKGDILQIMSQDDATWWQAKHEGDTNPRAGLIPS
     .*..***.*.*.*..****.****.*.. ..*...****.******. **** *******
229" VFMRALFHYNPREDRAIPCQEAGLPFQRRQVLEVVSQDDPTWWQAKRVGDTNLRAGLIPS

239' KHFQERRLALRR
     * ******. **
289" KGFQERRLSYRR
```

Fig. 6. Alignment of amino acid sequences of G53W (upper sequence) and human *dlg3* gene product (lower sequence). Asterisks and dots indicate identity and similarity, respectively. The DHR domain is underlined. The SH3 domain is double-underlined.

```
A230         MSSSTIKTLA---VAVPLL-H-LTRLALSTCPASC--HCPLE-APKCAPGVGLVRDGCGC
Mouse cyr61  MSSSTFRTLA---VAVTLL-H-LTRLALSTCPAAC--HCPLE-APKCAPGVGLVRDGCGC
Human CTGF   M-TAASMG-PVRVAFVVLLALCSRPAVGQNCSGPC--RCPDEPAPRCPAGVSLVLDGCGC
NOV          METGGGQGLPVLLLLLLLLRPCEVSGREAACPRPCGGRCPAE-PPRCAPGVPAVLDGCGC
             *         **         *   *  *  *  * *  **  * *****

A230         CKVCAKQLNEDCSKTQPCDHTKGLECNFGASSTALKGICRAQSEGRPCEYNSRIYQNGES
Mouse cyr61  CKVCAKQLNEDCSKTQPCDHTKGLECNFGASSTALKGICRAQSEGRPCEYNSRIYQNGES
Human CTGF   CRVCAKQLGELCTERDPCDPHKGLFCDFGSPANRKIGVC-TAKDGAPCIFGGTVYRSGES
NOV          CLVCARQRGESCSPLLPCDESGGLYCDRGPEDGGGAGIC-MVLEGDNCVFDGMIYRNGET
             * *** *  * *   ***   ** * *        * *    *  *      *  **

A230         FQPNCKHQCTCIDGAVGCIPLCPQELSLPNLGCPNPRLVKVSGQCCEEWVCDEDSIKDSL
Mouse cyr61  FQPNCKHQCTCIDGAVGCIPLCPQELSLPNLGCPNPRLVKVSGQCCEEWVCDEDSIKDSL
Human CTGF   FQSSCKYQCTCLDGAVGCMPLCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLPGKCCEEWVCDE-P-KD--
NOV          FQPSCKYQCTCRDGQIGCLPRCNLGLLLPGPDCPFPRKIEVPGECCEKWVCD--P-RD--
             **  ** **** **  ** * *    **   ** **     * *** ****      *

A230         DDQDDLLGFDASEVELTRNNELIATGKGSSLKRLPVFGTEPRVLYNPLHAHGQKCIVQTT
Mouse cyr61  DDQDDLLGLDASEVELTRNNELIAIGKGSSLKRLPVFGTEPRVLFNPLHAHGQKCIVQTT
Human CTGF   QTVVGP-A-LAA---Y-R-LE-------DT------FGPD----PTMIRAN---CLVQTT
NOV          EVLLGGFA-MAA---Y-R-QE-------AT------LGID----VSDSSAN---CIEQTT
                       *    *  *               *           *     * ***

A230         SWSQCSKSCGTGISTRVTNDNPECRLVKETRICEVRPCGQPVYSSLKKGKKCSKTKKSPE
Mouse cyr61  SWSQCSKSCGTGISTRVTNDNPECRLVKETRICEVRPCGQPVYSSLKKGKKCSKTKKSPE
Human CTGF   EWSACSKTCGMGISTRVTNDNASCRLEKQSRLCMVRPCEADLEENIKKGKKCIRTPKISK
NOV          EWSACSKSCGMGFSTRVTNRNQQCEMVKQTRLCMMRPCENE-EPSDKKGKKCIQTKKSMK
              ** *** ** * ****** *  *   *   * *  ***           ******  * *

A230         PVRFTYAGCSSVKKYRPKYCGSCVDGRCCTPLQTRTVKMRFRCEDGEMFSKNVMMIQSCK
Mouse cyr61  PVRFTYAGCSSVKKYRPKYCGSCVDGRCCTPLQTRTVKMRFRCEDGEMFSKNVMMIQSCK
Human CTGF   PIKFELSGCTSMKTYRAKFCGVCTDGRCCTPHRTTTLPVEFKCPDGEVMKKNMMFIKTCA
NOV          AVRFEYKNCTSVQTYKPRYCGLCNDGRCCTPHNTKTIQVEFRCPQGKFLKKPMMLINTCV
               *    * *   *    ** * *******  *  *    * *  *      *  * *  *

A230         CNYNCLHPNEASFRLYSLFNDIHKFRD
Mouse cyr61  CNYNCPHPNEASFRLYSLFNDIHKFRD
Human CTGF   CHYNCP-GDNDIFESLYYRKMYGDMA-
NOV          CHGNCPQSNNAFFQPLDPMSSEAKI--
             *  **      *
```

Fig. 7. Alignment of the amino acid sequences of A230, mouse *cyr61*, human CTGF, and NOV gene products. Amino acid sequences identical to those of A230 are boxed. *Asterisks* indicate identical amino acids among the four sequences. The deduced amino acid sequence of A230 is 97.9% identical to mouse cyr61, 46.5% identical to human CTGF, and 45.2% identical to Nov.

A

```
G53W   DHR  GA--ITVAR-------IMRGGAAD--R-SGL-IHVGDELREVNGIPVEDKRPEEIIQILS-QSQG-AITFKII--
dlg3   DHR  GA--VVVAR-------IMRGGAAD--R-SGL-VHVGDELREVNGIAVLHKRPDEISQILA-QSQG-SITLKII--
dlg2   DHR  EL---VIAR-------ILHGGMVA--Q-QGL-LHVGDIIKEVNGQPVGSD-PRALQELLR-NASG-SVILKIL--
p55    DHR  QS--CTVAR-------ILHGGMIH--R-QGS-LHVGDEILEINGTNVTNESVDQLQKAMK-ETKG-MISLKVI--
dlg    DHR  QG--IYVSF-------ILAGGPAD--L-GSE-LKRGDQLLSVNNVNLTHATHEEAAQAL--KTSGGVVTLLAQYR
hdlg   DHR  EG--IFISF-------ILAGGPAD--L-SGE-LRKGDRIISVNSVDLRAASHEQAAAAL--KNAGQAVTIVAQYR
NEdlg  DHR  EG--IFVSF-------ILAGGPAD--L-SGE-LRRGDRILSVNGVNLRNATHEQAAAAL--KRAGQSVTIVAQYR
zo1    DHR  KGDSVGLRLAGGNDVGIFVAGVLEDSPAAKEGLEEGDQILRVNNVDFTNIIREEAVLFLLDLPKGEEVTILAQKK
zo2    DHR  KGDSVGLRLAGGNDVGIFVAGIQEGTSAEQEGLQEGDQILKVNTQDFRGLVREDAVLYLLEIPKGEMVTILAQSR
                            *   *               **     *                  *
```

B

```
G53W   SH3  FIKALFDYDPKEGKAIPCKEAGLSFRKGDILQIMSQDDATWWQAKHE-GDT-NPRAGLIPSKHFQE
dlg3   SH3  FMRALFHYNPREDRAIPCQEAGLPFQRRQVLEVVSQDDPTWWQAKRV-GDT-NLRAGLIPSKGFQE
dlg2   SH3  FVKCHFDYDPARDSLIPCKEAGLRFNAGDLLQIVNQDDANWWQACHVEGG----SAGLIPSQLLEE
p55    SH3  FMRAQFDYDPKKDNLIPCKEAGLKFATGDIIQIINKDDSNWWQG-RVEGSS-KESAGLIPSPELQE
dlg    SH3  YVRALFDYDPNRDDGLPSR--GLPFKHGDILHVTNASDDEWWQARRVLGDNEDEQIGIVPSKRRWE
hdlg   SH3  YVRALFDYDKTKDSGLPSQ--GLNFKFGDILHVINASDDEWWQARQVTPDGESDEVGVIPSKRRVE
NEdlg  SH3  YVRALFDYDRTRDSCLPSQ--GLSFSYGDILHVINASDDEWWQARLVTPHGESEQIGVIPSKKRVE
zo1    SH3  YLRTHFEYEKESPYGLSFNK-GEVFRAVDTL--YNGKLGSWL-AIRIGKNHKEVERGIIPNKNRAE
zo2    SH3  FIRSHFECEKETPQSLAFSR-GEVFRVVDTL--YDGKLGHWL-AVRI-GNE-LEK-GLIPNKSRAE
                 *           *  *                *                *   *   *
```

Fig. 8. Alignment of the amino acid sequences of G53W, *dlg3*, *dlg2*, *p55*, *dlg*, *hdlg*, NE*dlg*, *zo1*, and *zo2* gene products through the DHR domain (A), and the SH3 domain (B). Amino acids identical to those of A230 are boxed. *Asterisks* indicate amino acids identical among the nine sequence.

(discs-large homology region, DHR) 領域，サーク相同領域3 (src homology 3, SH3) 領域に相当する領域を含み，アミノ酸では67.3％ (図6)，ヌクレオチドでも67.0％配列が一致した．

考　察

近年，連鎖分析や罹患同胞対分析により種々の遺伝性疾患の責任遺伝子が同定されてきている．ヒト高血圧症に関してはデキサメサゾン抑制性アルドステロン症[10]やリドル症候群[11]といった単一遺伝子の変異による家族性高血圧症の責任遺伝子が特定された．しかし，多因子病と考えられる本態性高血圧症に関しては，第一染色体上のアンギオテンシノーゲン遺伝子の変異，多型との連鎖が示唆されているのみであり[12)-14)]，なお不明な点が多い．一方本態性高血圧症のモデル動物である高血圧ラットにおいても同様の解析が成されつつあるが，第1染色体上や第10染色体領域との連鎖が示唆されているのみで，それらの実体は依然として不明である[15)-18)]．又，高血圧に伴う血管障害の発生やその増悪に関わる遺伝子については，ほとんどアプローチされていない．

今回筆者は病的な状態において発現異常をきたす遺伝子を検出するのに有用であるディファレンシャルディスプレイ法 (differential display, DD) を高血圧ラットに適用した．この方法を用いることにより，血管そのものでの発現異常を指標に通常の遺伝学的方法では特定することが困難な高血圧原因遺伝子や血管障害に関与する個々の遺伝子の分離が可能となり，これらの遺伝子の実体が直接的に解明できると考えられた．

PCRを応用したDD法は，従来行われていたディファレンシャルハイブリダイゼイションやサブトラクティブハイブリダイゼイションと比較して簡便でRNAの消費量も少ないことから[3]，血管などの微量の試料を用いた解析に最適である．FDD法はItohら[4]によって開発された改良法で，放射性物質を使用せず

DNAシークエンサーを使って自動解析できるため，より簡便で且つ迅速な高感度DD法である．DD法は，生体試料を用いた場合個体差の影響を受けやすいなど偽陽性が出現する可能性が考えられるが，今回筆者は，個体差の影響を抑えるため10匹分のラットから取り出したRNAを用い，さらに同じRNAを用いて最低二回ずつDD法で分析を行った．

本研究で筆者は，SHR・SHRSP及その正常親株WKYの大動脈より分離したRNAを用いたFDD法により，高血圧ラットの大動脈で過剰発現している遺伝子(A230)，正常血圧ラットの大動脈で過剰発現している遺伝子(G53W)を同定した．A230は，マウス*cyr61*のラットホモローグと考えられたが，*cyr61*は，血小板由来成長因子(platelet-derived growth factor, PDGF)，形質変換成長因子(transforming growth factor β，TGFβ)などによって誘導される初期応答遺伝子と呼ばれる遺伝子群に属している[8][19][20]．*cyr61*は軟骨細胞に分化する胎生期の間葉系の細胞や循環系の血管壁で発現が高く[21]，そのコードする蛋白はシステインに富む分泌型のヘパリン結合蛋白[8]で，細胞表面や細胞外基質に存在する[22]．又，CCNファミリーという成長制御因子のファミリーに属しており[23]，ヒトの結合組織成長因子(connective tissue growth factor, CTGF)[24]，トリの*Nov*[25]などと高い相同性を示す．図7に示すごとくアミノ酸配列でA230はヒトCTGFとは46.5％，トリNovとは45.2％の相同性を示した．CTGFは創傷治癒過程においてTGFβにより誘導されると考えられ，TGFβの下流の効果因子である可能性が示唆されている[26]．一方，WKYとSHR，SHRSPではTGFβによる血管反応性の違いがあることが報告されており[27]~[30]，今回同定されたラットの*cyr61*がこの血管反応性の違いを引き起こしている原因の一つである可能性が考えられた．又*cyr61*は培養細胞では細胞の増殖や移動そして接着に関係していることが知られており[31]，CTGFはヒト動脈硬化巣に特異的に発現している[32]．従って今回発見されたラットの*cyr61*が，高血圧ラットの高血圧発症前期の血管細胞において，高血圧性血管障害即ち動脈硬化の進展に関わっている可能性が示唆される．

一方，G53W遺伝子はヒト*dlg3*との相同性(アミノ酸で67.3％)を有していた．*dlg3*はヒト胎児脳cDNAライブラリーからクローン化された遺伝子で，ディスクラージファミリーという遺伝子ファミリーに属し[9]，*dlg2*[33]，*p55*[34]，*dlg*[35]，*hdlg*[36]，*NEdlg*[37]，*ZO1*[38]，*ZO2*[39]などと相同性を示す．G53Wはアミノ酸配列で，dlg2と60.1％，p55と56.3％，dlgと39.1％，hdlg 39.1％と，NEdlgと40.6％，ZO1と20.3％，そしてZO2と21.9％の相同性を示した．そしてこのファミリーが共通して含むことが知られているDHR領域，SH3領域では特に高い相同性を示した(図8)．これらの遺伝子の機能は未だよく判っていないが，*dlg*はショウジョウバエのセプテイトジャンクション(脊椎動物のタイトジャンクションに相当する)上の上皮細胞の細胞膜に存在し，上皮の異常増殖を抑制する腫瘍抑制遺伝子であるとされている[36]．又*dlg*のヒトホモローグである*hdlg*の蛋白質DLGは，家族性ポリポーシスや大腸癌で変異が見つかっている遺伝子*APC*の蛋白質APCと結合して細胞周期の進展を抑制することが示唆されている[40]．又*ZO1*蛋白ZO1，*ZO2*蛋白ZO2は血管内皮細胞のタイトジャンクション上に存在している[39]．従ってG53Wの発現異常が，血管細胞間の接着性や細胞増殖制御の異常を引き起こしている可能性が考えられる．

今回分離した2種の遺伝子と遺伝学的に解析が進められている高血圧発症原因遺伝子との関連は現在のところ不明である．今後染色体座位の決定等によりその異同を明らかにして行く必要があると考えられる．しかしながら，A230とG53Wの異常は上述の如く血管の構築や機能に影響を与えることが予想されることから，これら遺伝子の機能を解析することにより，高血圧の進展や本症に伴う血管障害の発生・進展の機構が明らかになるものと期待される．

結　論

本態性高血圧症や高血圧に伴う血管障害の発症と進展の分子機構を明らかにするために，FDD法を用いて本態性高血圧症に酷似した病型を示す自然発症高血圧ラットの大動脈において発現異常をきたす遺伝子の検索を行い，以下の新知見を得た．

1．SHR，SHRSP及その正常親株WKYの大動脈より分離したRNAを用いたFDD法により，高血圧ラットと正常血圧ラットでシグナル強度が異なる15の候補フラグメントが得られた．このうち5つの候補フラグメントにつきノーザン解析を行い，2種の遺伝子(A230，G53W)の発現異常を確認した．

2．高血圧ラットの大動脈において過剰発現するA230という遺伝子を同定した．本遺伝子は，分泌性の379アミノ酸からなる蛋白をコードしており，マウス*cyr61*のラットホモローグであると考えられた．

3．高血圧ラットの大動脈において発現低下するG53Wという新規遺伝子を同定した．G53Wのコードする蛋白はがん抑制遺伝子に分類されているヒト*dlg3*と相同性を有し，特にそのDHR領域，SH3領域で高い相同性が認められた．

謝　辞

稿を終えるに臨み，御指導と御校閲を賜りました恩師馬渕宏教授に深甚なる謝意を表します．また，終始直接の御指導を賜りました金沢大学医学部生化学第二講座の山本　博教授，米倉秀人助教授に心から感謝いたします．さらに御支援と御協力を頂きました金沢大学医学部内科学第二講座ならびに生化学第二講座の皆様に感謝致します．なお本論文の要旨の一部は第70回日本生化学会大会(1997，金沢)，第5回日本血管細胞生物学研究会(1997，熊本)において発表した．

文　献

1) Dzau VJ, Gibbons GH, Cooke JP, Omoigui N. Vascular biology and medicine in the 1990s: scope, concepts, potentials, and perspectives. Circulation 97: 705-719, 1993

2) Liang P. and Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257: 967-971, 1992

3) Wang XK. Ruffolo RR, Feuerstein GZ. mRNA differential display: Application in the discovery of novel pharmacological targets. Trends Pharmacol Sci 17: 276-279, 1996

4) Itoh T and Sakaki Y. Fluorescent differential display : arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer FEBS Letter 351: 231-236, 1994

5) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-159, 1987

6) Aviv H, Leder P. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-

cellulose. Proc Natl Acad Sci USA 69: 1408-1412, 1972

7) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467, 1977

8) O'Brien TP, Yang GP, Sanders L, Lau LF. Expression of cyr61, a growth factor-inducible immediate-early gene. Mol Cell Biol 10: 3569-77, 1990

9) Smith SA, Holik P, Stevens J, Mazoyer S, Melis R, Williams B, White R, Albertsen H. Isolation of a gene (DLG3) encoding a second member of the discs-large family on chromosome 17q12-q21. Genomics 31: 145-50, 1996

10) Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S; Ulick S, Lalouel- M. A chimeric 11-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. Nature 355: 262-265, 1992

11) Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Williams CN, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR Jr; Ulick S, Milora RV, Findling JW. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the subunit of the epithelial sodium channel. Cell 79: 407-414, 1994

12) Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM, Corvol P. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. Cell 71: 169-180, 1992

13) Hata A, Namikawa C, Sasaki M, Sato K, Nakamura T, Tamura K. Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. J Clin Invest 93: 1285-1287, 1994

14) Caulfield M, Lavendor P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P, Clark AJL. Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. N Engl J Med 330: 1629-1633, 1994

15) Hilbert P, Lindpaintner K, Beckmann JS, Serikawa T, Soubrier F, Dubay C, Cartwright P, DeGouyon B, Julier C, Takahasi S, Corvol P. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. Nature 353: 521-529, 1991

16) Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, Kusumi K, Bunker RK, Mao YP, Ganten D, Dzau VJ, Lander ES. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Cell 67: 213-224, 1991

17) Lindpaintner K, Hilbert P, Ganten D, Ginard NB, Inagami T, Iwai N. Molecular genetics of the Sa-gene : cosegregation with hypertension and mapping to rat chromosome 1. J Hypertens 11: 19-23, 1993

18) Deng AY, Dene H, Rapp JP. Mapping of quantitative trait locus for blood pressure on rat chromosome. J Clin Invest 94: 431, 1994

19) Lau LF, and Nathans D. Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. EMBO J 4: 3145-3151, 1985

20) Brunner A, Chinn J, Neubauer M, Purchio AF. Identification of a gene family regulated by transforming growth factor-beta. DNA Cell Biol 10: 293-300, 1991

21) O'Brien TP and Lau LF. Expression of the growth factor-inducible immediate early gene cyr61 correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development. Cell Growth Differ 3: 645-654, 1992

22) Yang GP and Lau LF. Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. Cell Growth Differ 2: 351-357, 1991

23) Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. FEBS Lett 327: 125-130, 1993

24) Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is relatef to the SRC-induced immediate early gene product CEF10. J Cell Biol 114: 1285-1294, 1991

25) Joliot V, Martinerie C, Dambrine G, Plassiart G, Brisac M, Crochet J, Perbal B. Proviral rearrangements and overexpression of a mew cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas. Mol Cell Biol 12: 10-21, 1992

26) Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. Mol Cell Biol 4: 637-645, 1993

27) Hamada MI, Nishio, Baba A, Fukuda K, Takeda J, Ura M, Hano T, Kuchii M, Masuyama Y. Enhanced DNA synthesis of cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. Difference of response to growth factor, intracellular free calcium concentration and DNA synthesizing cell cycle. Atherosclerosis 81: 191-198, 1990

28) Hamet P, Hadrava V, Kruppa U, Tremblay J. Transforming growth factor beta 1 expression and effect in aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. Hypertension 17: 896-901, 1991

29) Agrotis A, Saltis J, Bobik A. Transforming growth factor-beta 1 gene activation and growth of smooth muscle from hypertensive rats. Hypertension 23: 593-599, 1994

30) Agrotis A, Saltis J, Dilley R, Bray P, Bobik A. Transforming growth factor-beta 1 and the development of vascular hypertrophy in hypertension. Blood Press Suppl 2: 43-48, 1995

31) Kireeva ML, Mo FE, Yang GP, Lau LF. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. Mol Cell Biol 16: 1326-1334, 1996

32) Oemar BS, Werner A, Garnier JM, Do DD, Godoy N, Nauck M, März W, Rupp J, Pech M, Lüscher TF. Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. Circulation 95: 831-839, 1997

33) Mazoyer S, Gayther SA, Nagai MA, Smith SA, Dunning A, van Rensburg EJ, Albertsen H, White R, Ponder BA. A gene (DLG2) located at 17q12-q21 encodes a new homologue of the Drosophila tumor suppressor dIg-A. Genomics 28: 25-31, 1995

34) Goebl MG. Is the erythrocyte protein p55 a membrane-bound guanylate kinase?" . Trends Biochem Sci 17: 99, 1992

35) Woods DF and Bryant PJ. The discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase

homolog localized at septate junctions. Cell 66: 451-464, 1991
36) Lue RA, Marfatia SM, Branton D, Chishti AH. Cloning and characterization of hdlg: the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to protein 4.1. Proc Natl Acad Sci USA 91: 9818-9822, 1994
37) Makino K, Kuwahara H, Masuko N, Nishiyama Y, Morisaki T, Sasaki J, Nakao M, Kuwano A, Nakata M, Ushio Y, Saya H. Cloning and characterization of NE-dlg: A novel human homolog of the Drosophila discs large (dlg) tumor suppressor protein interacts with the APC protein. Oncogene 14: 2425-2433, 1997
38) Willott E, Balda MS, Fanning AS, Jameson B, Van Itallie C, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 7834-7838, 1993
39) Jesaitis LA and Goodenough DA Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. J Cell Biol 124: 949-961, 1994
40) Matsumine A, Ogai A, Senda T, Okumura N, Satoh K, Baeg GH, Kawahara T, Kobayashi S, Okada M, Toyoshima K, Akiyama T. Binding of APC to the human homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. Science 272: 1020-3, 1996

Isolation of Novel Genes Showing Aberrant Expression in Blood Vessel of Animal Models for Essential Hypertension Kenji Furukawa, Second Department of Internal Medicine and Second Department of Biochemistry, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 − J. Juzen Med Soc., **106,** 598 − 605 (1997)

Keywords fluorescent differential display, spontaneously hypertensive rat, *cyr61*, *dlg3*

Abstract

In order to isolate the genes involved in the development of hypertension and hypertensive vascular injury, a fluorescent differential display method was adapted for aorta RNA from spontaneously hypertensive rats (SHR), and stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP), which are regarded as an animal model for hypertension and hypertensive vascular injury. Fifteen cDNAs showing aberrant expression in SHR and SHRSP in comparison with the parental Wistar-Kyoto rat (WKY) were detected. Northern blot analysis probed with these cDNA fragments confirmed that A230 was selectively up-regelated and G53W was down-regelated in the aortae of hypertensive rats. Sequence analysis and data base search demonstrated that these two genes were novel rat genes, which had not so far been related to hypertension and hypertensive vascular injury. A full-length cDNA of A230 was obtained by using rapid amplification of the cDNA ends protocol. It encoded a secretory cystein-rich protein of 379 amino acids and had high sequence identity to mouse *cyr61*, a growth factor-inducible immediate early gene. Partial sequenced G53W exhibited a high degree of homology with human *dlg3*, which had been presumed to belong to tumor suppressor genes.