



Title	Regulation of Brain-Specific Transcription of the Mouse Myelin Basic protein Gene ; Function of the NF I-Binding Site in the Distal Promoter
Author(s)	青山, 淳夫
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37095
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	あお 青	やま 山	あつ 淳	お 夫
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	第	9 0 6 5	号	
学位授与の日付	平 成 2 年 3 月 2 4 日			
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻			
	学位規則第 5 条第 1 項該当			
学位論文題目	Regulation of Brain-Specific Transcription of the Mouse Myelin Basic protein Gene; Function of the NF I-Binding Site in the Distal Promoter (ミエリン塩基性蛋白質遺伝子の組織特異的転写調節領域の 解析)			
論文審査委員	(主査) 教 授	御子柴克彦		
	(副査) 副 査	中田 篤男	教 授	羽倉 明

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

ミエリン塩基性蛋白質 (MBP) は、神経軸索を取り囲むミエリンの主要構成蛋白質の一つである。中枢神経系において、MBPの産生はオリゴデンドロサイトに限られており、その発現は転写レベルで制御されている。このようにMBP遺伝子は脳特異的遺伝子発現の研究に格好の特徴をそなえているにもかかわらず、その転写調節領域を解析する *in vivo* の検出系がトランスジェニックマウスに限られるなどの制約から研究が立ち遅れていた。ところが最近になり、*in vivo* の発現を反映する脳特異的無細胞転写系が確立され、研究の糸口が開かれた。本研究では、この無細胞転写系を用いてMBP遺伝子の脳特異的転写要素を解析するとともに、その要素に結合し転写の調節にはたらく因子についても検討した。

〔方法ならびに成績〕

変異DNAを用いた転写調節領域の解析 従来の研究で組織特異的転写要素が含まれていることが示唆されたマウスMBP遺伝子の-253から+62の塩基配列をもつpBP253を、BAL31消化または *in vitro* mutagenesis により改変し、種々の欠失変異体および点突然変異体を作成した。これらの変異体を鋳型として、マウス脳核抽出液ならびにラット肝核抽出液を用いた無細胞転写をおこなった。-139から-118への欠失は、脳抽出液で著しい転写の低下にはたらし、肝抽出液ではほとんど影響を及ぼさなかった。また、-115に塩基置換をもつ変異体は脳抽出液でのみ有意に転写活性が低く、-109での点突然変異体も脳抽出液のみで僅かな転写活性の減少を示した。これらの結果から、-139から-109付近にMBP遺伝子の組織特異的転写要素が存在することが明らかとなった。

フットプリント法によるDNA結合因子の解析 -139 から-109 の領域を含む5' 一端標識プローブを作成しDNaseIフットプリントを調べた。-130から-81にかけて強いフットプリントが脳抽出液および肝抽出液でみられた。この約50塩基対にわたるフットプリントは競合実験の結果から3つの領域に分けられた。それぞれのフットプリント領域の塩基配列から、-130から-111にかけてはNF I 様因子が結合し、-92から-84にはSp1因子が結合していることが考えられた。-110から-97に結合する因子に関してはM1と命名した。

NF I プローブを用いたゲルシフト法 -127から-110の塩基配列をもつNF I プローブを用いてゲルシフトアッセイをおこなった。脳抽出液、肝抽出液のどちらを用いても広がりのあるバンド群が検出されたが、脳抽出液により生じたバンドは相対的に遅く移動するものが多かった。この違いは、両抽出液中のNF I 様因子構成の違いにより生じたと考えられる。

メチル化干渉法による結合様式の解析 ゲルシフト法に用いたと同じプローブの5' 一端のみを標識後、部分的にメチル化したプローブを作成した。このプローブと脳および肝抽出液を混和し結合に対する影響を調べた。肝抽出液では、coding鎖で3つ、non-coding 鎖でも3つのGが結合に関与していた。脳抽出液では、これらに加え、coding鎖の-116と-112のG、non-coding 鎖の-117のGもNF I 様因子との結合に寄与していた。脳抽出液でのみ有意な結合への関与が認められたGはNF I 結合部位の下流側に集中していた。したがって、脳あるいは肝抽出液中に存在するNF I 様因子とDNAとの結合様式は認識部位の下流側半分で異なることが明らかとなった。

〔総 括〕

マウスMBP遺伝子の5'-上流-127から-110の領域にはNF I 結合部位が存在する。本研究では、脳特異的無細胞転写系を用いた転写実験により、このNF I 結合部位の下流側半分周辺-115から-107にMBP遺伝子の組織特異的転写を促進する塩基配列を見出した。さらに、種々の結合実験からNF I 様因子がこの領域に脳特異的に結合していることを明らかにした。NF I 因子は、従来組織特異性を示さない複製および転写因子と考えられてきたが、近年、同族の因子の中に組織特異性を有するものが肝細胞などから見つかった。本研究は、脳組織においても特異的なNF I 様因子が存在することを明らかにしたものである。また、NF I 因子の対称な結合部位のうち、下流側半分のみが組織特異的発現に関与しているという発見は、NF I 結合配列の上流側と下流側の部位の機能的なちがいを示唆している。

論文の審査結果の要旨

中枢神経系は多様な細胞群が秩序だった相互作用をすることにより成立している巨大なネットワークでそれを構成する個々の細胞は分化段階に応じて特異的な分子を発現することにより自己の特徴付けを行っている。従って、神経系の構築過程を解明するためには、細胞特異的に発現している個々の分子の生成機構

をつぶさに明らかにする必要がある。こうした観点に立ち、本論文では、哺乳類中枢神経系において、ミエリン形成にあずかるオリゴデンドロサイトで特異的に発現するマウスミエリン塩基性蛋白質(MBP)遺伝子の組織特異的転写調節領域の同定と、その領域に結合する転写調節因子の解析を行っている。MBP遺伝子は、その細胞特異的な発現が転写段階で調節されており、組織特異的な転写調節機構の研究に格好の材料であるにもかかわらず、in vivo の検出系がトランスジェニックマウスに限られる等の理由により研究が立ち遅れていた。本論文では、脳特異的な無細胞転写系を確立することにより検出系の問題を解決し、MBP遺伝子の5' -上流域内に存在する nuclear factor I (NFI) 結合部位の下流側のコア付近が組織特異的な転写活性化領域であることを見いだした。さらに、脳核抽出液中には他の組織とは異なるNFI様因子が含まれており、この因子が固有の結合様式でNFI結合部位の下流側のコアと相互作用していることもあきらかにした。本研究の成果は、脳特異的なNFI様因子の存在とNFI結合部位の非対称な機能を初めて明らかにした点において、脳神経系特異的に発現する遺伝子の転写調節機構の解明に格段の進展をもたらすとともに、発生分化に伴う神経系の構築過程の解明に重要な知見を提供している。従って、本論文は医学博士の博士論文として十分価値あるものと認める。