

Title	Neuropeptide Y 遺伝子のグルココルチコイドによる発現調節
Author(s)	三崎, 尚之
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37984
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

bd をプローベとしてスクリーニングした結果、2つの陽性プラークを得た。制限酵素による切断のパターンから、これらは同一のクローンであることが示された。そこでその1つから、NPY 遺伝子上流域-3.3 kb を含むフラグメントを切り出し、pUC18 ベクターにサブクローニングした。このDNAの制限酵素地図を作成した後、種々の制限酵素で切断することで上流-3.3 kb ~ -0.1 kb の範囲を含む6種類のNPY 遺伝子の5'-deletion mutants を作成し、これらをCAT ベクターに挿入した。また、クローニングしたDNAの下流域の塩基配列を決定したところ、以前に報告されたNPY 遺伝子の配列 (exon1を含む) と完全に一致した。

3. CAT活性の測定

上記のNPY-CAT 遺伝子20 µg を、磷酸カルシウム法にて、 1×10^7 cells / 10 cm dish のNG 108-15 細胞に導入し、48時間培養した。デキサメゾン (1 µM) は、培養開始後24時間の時点で添加した。細胞抽出液 (250 µg 蛋白) を0.2 M Tris-HCl (pH 7.5), 80 mM アセチルCoA, 3.7 kBq [14 C]-クロラムフェニコールから成る反応液中で、37°C, 30分間インキュベートした後、薄層クロマトグラムにて、反応産物と基質を分離した。オートラジオグラム後、デンストメーターにてアセチル化率を定量した。その結果、CATベクターのみを導入した場合、CAT活性は、1 µM デキサメゾンの存在下、非存在下ともほとんど認められなかったが、NPY 上流3.3 kb を含む、pNPY 3.3 CAT を導入した場合は、デキサメゾン存在下でのCAT活性は、非存在下に比べ、約4倍上昇した。ほぼ同様の活性上昇 (3.8倍) がpNPY 2.9 CAT でも認められたが、pNPY 2.1 CAT では有意な上昇はみられず、さらに短いフラグメントをもつプラスミドについても、デキサメゾンの影響は観察されなかった。この結果から、グルココルチコイドに反応してNPY 遺伝子の発現を調節するエレメントが、転写開始点より-2.9 kb から -2.1 kb の範囲に存在することが示された。

4. DNA 塩基配列の決定

上記の約0.8 kb の領域の塩基配列をpBSII-SK+ ベクターを用い、ジデオキシ法により決定した結果、3つのGRE共通配列 5'-(T/A)GT (T/C)CT-3' が-2.5 kb, -2.2 kb および -2.1 kb の位置に認められた。これらのエレメントを介して、グルココルチコイドはNPY 遺伝子の転写活性に影響を及ぼしていることが示唆された。

[総括]

NPY 遺伝子の mRNA 量がグルココルチコイドにより増加することから、NPY 遺伝子上流にGREが存在することが示唆された。このエレメントを検索するため、ラットNPY 遺伝子上流域3.3 kb をクローニングし、その各種deletion mutants をCAT 遺伝子上流に結合したものをNG108-15 細胞に導入し、その一過性発現を調べた結果、-2.9 kb から -2.1 kb の範囲にGREが存在することが示された。この領域の塩基配列を決定したところ、-2.5 kb, -2.2 kb, -2.1 kb の位置にGRE 共通配列が認められた。このことから、NPY 遺伝子は、比較的遠い上流域に存在するcis-エレメントを介して、グルココルチコイドの調節作用を受けていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ラット neuropeptide Y (NPY) 遺伝子上に存在する Glucocorticoid responsive element (GRE) を検索したものである。NG108-15 細胞において prepro-NPY mRNA 量がデキサメサゾン の添加によって上昇することから、その DNA 上に GRE の存在が予想されたが、従来発表された塩基配列上には GRE 共通配列は認められなかった。本研究では、ラットゲノムライブラリーから NPY 上流 3.3 kb をクローニングし、その deletion mutants と CAT ベクターの結合プラスミドを NG108-15 細胞に導入し、CAT アッセイを行なった。その結果、-2.9 kb から -2.1 kb の間に GRE が存在することが示唆された。この領域の塩基配列を決定した結果、転写開始点から比較的上流の -2.5 kb, -2.2 kb, -2.1 kb の位置に 3 つの GRE 共通配列が認められた。以上の結果は、これら比較的遠位に存在する GRE によってグルココルチコイドの NPY 遺伝子に対する発現調節が行なわれている可能性を明らかにした。本研究は、神経ペプチドの構造と機能の解明に寄与する労作で、学位に値するものと考えられる。