



Title	Neuropeptide Y 遺伝子のグル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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37984">https://hdl.handle.net/11094/37984</a>
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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	三 崎 尚 之
博士の専攻分野 の 名 称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 9 9 5 5 号
学位授与年月日	平 成 3 年 11 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科 生理系専攻
学 位 論 文 名	Neuropeptide Y 遺伝子のグルコルチコイドによる発現調節
論文審査委員	(主査) 教 授 三 木 直 正 (副査) 教 授 和 田 博 教 授 鎌 田 武 信

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目 的〕

Neuropeptide Y (NPY) は、36個のアミノ酸からなる神経ペプチドで、哺乳類の神経系に広く、多量に存在しており、かつ、カテコラミンなどの神経伝達物質と共存していることから、神経調節因子としての作用があるものと考えられている。NPY 遺伝子の発現は、多くの因子によって調節されており、その一つとしてグルコルチコイドがある。このことは、NPY 遺伝子上に Glucocorticoid responsive element (GRE) が存在することを示唆している。しかし、現在までに発表された NPY 遺伝子上流域 -670 bp の範囲内には、GRE 共通配列は認められない。そこで本研究では、NG108-15 細胞を用いて、NPY 遺伝子のグルコルチコイドによる発現調節の検討、および NPY 遺伝子上流域を Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 遺伝子に結合することにより GRE を検索した。

### 〔方法ならびに成績〕

#### 1. グルコルチコイドによる NPY mRNA 量の変化

NPY は神経特異的に発現しているので、本実験では神経系のモデル細胞として NG108-15 細胞を用いた。この細胞にデキサメサゾンに作用させたときの mRNA 量を測定し、グルコルチコイドに対する最大反応の条件（濃度、時間）を調べた。その結果、1  $\mu$ M デキサメサゾンに 24 時間以上作用させたときに、最大反応となり、prepro-NPY mRNA 量が 1.7 倍増加した。

#### 2. NPY 遺伝子上流のクローニング及び、NPY-CAT 遺伝子の作成

Charon 4A に組み込まれたラットゲノムライブラリーをラット NPY cDNA の上流部分 138

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  $\mu$ g を、磷酸カルシウム法にて、 $1 \times 10^7$  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  $\mu$ M)は、培養開始後24時間の時点で添加した。細胞抽出液(250  $\mu$ g 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 $^{\circ}$ 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  $\mu$ M デキサメサゾンの存在下、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、デキサメサゾン存在下での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、デキサメサゾンの影響は観察されなかった。この結果から、グル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 neuro peptide 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。