



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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

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 则 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に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、今までに発表された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を作用させたときのmRNA量を測定し、グルコ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、1μMデキサメゾンを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 2.0 μ gを、磷酸カルシウム法にて、 1×10^7 cells / 10 cm dish のNG108-15細胞に導入し、48時間培養した。デキサメゾン(1 μ M)は、培養開始後24時間の時点で添加した。細胞抽出液(250 μ 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°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、デンシ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 μ M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つたが、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つた。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、ジデオキシン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遺伝子の上流域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。