

Title	Cloning and Characterization of the rat Neurotensin Receptor Gene Promoter
Author(s)	前野, 浩巳
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39890
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

氏名	前野浩巳
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第12350号
学位授与年月日	平成8年3月25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	Cloning and Characterization of the rat Neurotensin Receptor Gene Promoter (ラット neurotensin receptor 遺伝子プロモーターの単離および解析)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌 (副査) 教授 三木 直正 教授 矢内原千鶴子

論文内容の要旨

[目的]

ニューロテンシン (NT) は13個のアミノ酸からなるペプチドで、神経系や消化管に広く分布しており、抗痛覚作用・低体温誘導等の生理作用が知られている。また最近黒質ドーパミンニューロンの栄養因子である可能性が示唆されている。一方、その受容体であるニューロテンシン受容体 (NTR) は、binding assay により高親和性受容体および低親和受容体の2種類の存在が知られている。近年ラットの高親和性受容体 cDNA がクローニングされ、その塩基配列より予想されるアミノ酸配列から、NTR は7回膜を貫通するGタンパク共役型であることが明らかになった。NT および NTR は成熟ラットの一部のニューロンに強く発現しているほか、個体発生の一時期には他の多くの領域で極めて豊富な発現が認められる。このことは、NTR が脳内の領域ごとに固有の時間的転写調節を受けていることを示唆している。しかしながら、その転写調節の分子機構は不明である。NTR 遺伝子の発現調節機構を理解するためには、まずそのプロモーターの解析が重要であると考えられる。そこで、本研究ではラット NTR 遺伝子プロモーターの単離及び解析を行った。

[方法ならびに成績]

(1)ラット NTR cDNA 全長をプローブとしてラット genomic library をスクリーニングし、14kb および12kb の2個の陽性クローンを得た。Southern 解析の結果より、NTR のコーディング領域の一部と5'上流領域を含む5.7kb の EcoR I 断片を pBluescript (KS) II +ベクターにサブクローニングし、その塩基配列を決定した。陽性クローンは NTR cDNA 5'端のノンコーディングならびにコーディング領域約1kb を含んでいることがわかった。

(2)NTR をコードする遺伝子数を確認するために Genomic Southern 解析を行った結果、陽性クローンの制限酵素地図から予想される band と同じ位置に陽性シグナルを得た。このことより、NTR 遺伝子はラット半数体 genome に1コピー存在することがわかった。

(3)NTR 遺伝子の転写開始点を決定する目的で、NTR の発現がもっとも高い生後6日目のラット脳より mRNA を調整し Primer 伸長法を行った。その結果転写開始点は翻訳開始点 (+1) の上流 -374, -319, -237, -236 にあることがわかった。それぞれの5'上流領域のプロモーター領域には TATA, CAAT box を欠いていたが、転写調節因子 Sp1 の結合が予想される配列が認められた。さらに、プロモーター領域の塩基組成を調べた結果 G+C に富んだ領域であることがわかった。

(4)プロモーター領域の転写活性を検討する目的で luciferase assay を行った。3'端として+1を固定し、NTRの5'上流領域を順次欠損させたDNAフラグメントを作成し、各々をプロモーターおよびエンハンサーを欠きかつ firefly の luciferase 遺伝子をレポーターとして有するPGV-Bベクターに組み込み、ニューロblast-マの NG108-15細胞にトランスフェクションを行い、発現する luciferase の蛍光強度を計測することにより、ラット NTR 遺伝子プロモーターの転写活性を検討した。その結果+1より上流-347までのフラグメントを含む construct においては luciferase 活性は認められなかったが、+1より-470までのフラグメントを含むものから活性が認められるようになり、順次上流領域を伸ばしたフラグメントを含むものでは活性は上昇し、+1から-662までのフラグメントよりさらに上流を含むものでは活性はほぼ平衡に達した。

[総括]

ラットNTR遺伝子の5'上流調節領域をクローニングおよび解析を行った。プロモーター領域にはTATAやCAAT boxは存在しなかったが、Sp1の結合が予想される配列が見いだされた。またLuciferase assayの結果、cDNAより予想される翻訳開始点より5'上流-470から-662にNTRの転写を誘導するcoreの領域を認めることができた。

論文審査の結果の要旨

本研究はラットニューロテンシン受容体(NTR)遺伝子プロモーターの単離ならびにそのプロモーター解析を行ったものである。本研究から、NTRの特徴として以下の点が初めて明らかにされた。(1)TATA box および CAAT box を欠くこと。(2)Sp1, CREB, AP2, の結合モチーフが認められた。(3)Synapsin II, type II Na⁺ channel 遺伝子等の神経特異的遺伝子の promoter 領域に認められる CCAGGAG の core motif が4コピー認められた。これらの知見は脳内において時間的、空間的に異なるNTR発現の分子調節機構を理解する上で重要であり、学位に価するものと考えられる。