

Title	Transcriptional Regulation of the Mouse Presenilin-1 Gene
Author(s)	満田, 憲昭
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41146
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	満 田 憲 昭
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 0 5 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 5 月 29 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Transcriptional Regulation of the Mouse Presenilin-1 Gene. (マウスプレセニリン1遺伝子の転写調節機構)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 萩 原 俊 男 (副査) 教 授 武 田 雅 俊 教 授 三 木 直 正

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

プレセニリン-1は家族性早期発症型アルツハイマー病のもっとも大きな原因遺伝子であるとされているが、それがアルツハイマー病を引き起こす機構については未知のままである。ヒトでのプレセニリン-1の発現は全身の臓器に渡ると報告されている反面、この遺伝子の異常により痴呆症状以外の異常が出現したとの報告はない。また疾患の治療法の確立にはモデル動物が必須と考えられるが、アルツハイマー病に関しては、未だ適当なものは報告されていない。

本研究では、アルツハイマー病が痴呆症状を引き起こす機構の解明、診断法、治療法の確立、アルツハイマー病のモデルマウス作製に役立てるため、マウスのプレセニリン-1遺伝子の全塩基配列を決定し、その転写調節機構について解析した。

【方法ならびに成績】

1. マウスプレセニリン-1遺伝子の単離

マウスプレセニリン-1 cDNA のエクソン 2, 3, 4 部分を PCR にて増幅し、それをプローブとして Lambda FixII マウスジェノミックライブラリーをスクリーニングした。陽性であった 4 種のクローンはプロモーター領域を含んでいなかったため、その 5' 端の塩基配列から PCR primer を作成し、P1ファージマウスジェノミックライブラリーを再スクリーニングした。得られた P1ファージのうち 1 本が遺伝子の全長を含んでいることを、PCR にて確認した。

2. 全塩基配列の決定

得られた P1ファージを EcoRI もしくは HindIII で完全切断し、それぞれプラスミドベクター pBluescript II KS (+) にサブクローニングした。各インサート両端の塩基配列より約 20 Bp のオリゴヌクレオチドを合成し、それらをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションにてコンティグマップを作成した。それぞれのプラスミドをシーケンシングすることによりプロモーター領域からポリアデニレーションシグナルまでの全塩基配列を決定した。この配列とマウスプレセニリン-1 cDNA の塩基配列を比べることにより、エクソン/イントロン構造を決定した。

3. 転写開始位置の決定

マウス脳 cDNA ライブラリーと Exon 2 上のプライマー、リンカープライマーを用いて5'RACEにて転写開始位置を調べた結果、マウスのプレセニリン1遺伝子は2つの異なる転写開始位置(+1, +411)と3種類の第一エクソンを持つことが分かった。

4. プロモータ構造の解析

PCRにてプロモーター領域の特定部分を増幅し、プロモーターを持たないルシフェラーゼ発現ベクター(pGL3)の上流に挿入した。得られたプラスミドをリポフェクション法でマウス神経芽細胞腫細胞 Neuro2A に感染させ、24時間培養後にルシフェラーゼ活性を測定することにより、挿入部分のプロモーター活性を調べた。その結果、転写開始位置の一つを含む533 Bpの領域が最大のプロモーター活性(100%と定義)を持つことが分かった(-327~+206, 最大活性プロモーター)。ヒトのプレセニリン-1プロモーターと相同的な25 Bpの領域は、それ自体14%の活性を持ち、その領域を除くとプロモーター活性が失われることより、プロモーターの核であると考えられた(-9~+16, 核プロモーター)。もう一つの転写開始位置(+411)を含む領域は有意なプロモーター活性を持たず、両転写開始位置からの転写は同一のプロモーターにより制御されていることが示唆された。

5. 細胞種別プロモータ活性の測定

マウス Embryonic Carcinoma 細胞 P19を0.5 μ M All-trans Retinoic Acid で神経細胞様に分化させた(P19N)。同様に、1% DMSOを用いて筋細胞様に分化させた(P19M)。これらに加えて、Neuro2A, マウス線維芽細胞 NIH3T3の5種類を用いて、核プロモーターと最大活性プロモーターの活性を測定した。その結果、核プロモーター自体、神経細胞に類似の細胞ほど高い活性を示すことが示された(Neuro2A>P19N>P19>P19M>NIH3T3)。その傾向は最大活性プロモーターにおいてさらに強く、遠位の神経性活性化因子の存在を示唆した。

【総括】

1. マウスのプレセニリン-1遺伝子を単離し、そのプロモーター領域からポリアデニレーションシグナルまでの全塩基配列を決定した。
2. マウスのプレセニリン-1遺伝子は2つの異なる転写開始位置と3種類の第一エクソンを持つことが分かった。
3. 両転写開始位置からの転写は、同一のプロモーターにより制御されていることが示唆された。
4. このプロモーターは神経系の細胞で強い活性を示す。

論文審査の結果の要旨

プレセニリン-1は家族性アルツハイマー病の最も大きな原因遺伝子であり、今後アルツハイマー病一般の診断、治療を研究していく上でのモデルともなりうる。しかしそれがアルツハイマー病を引き起こす機構については、未だ解明されていない。ヒトでのプレセニリン-1の発現は全身の臓器に渡るとされている反面、この遺伝子の異常により痴呆症状以外の異常が出現したとの報告はない。また疾患の治療法の確立にはモデル動物が必須と考えられるが、アルツハイマー病に関しては未だ適当なものは報告されていない。

本研究ではマウスのプレセニリン-1遺伝子を単離し、その全塩基配列を決定した。またそれが2つの異なる転写開始位置と3つの異なる第一エクソンを持つこと、両転写開始位置からの転写は同一のプロモーターにより制御されていること、そしてそのプロモーターは神経性の細胞で強い活性を示すことを示した。

この研究成果はアルツハイマー病が痴呆症状を引き起こす機構の解明、診断法、治療法の確立、アルツハイマー病のモデルマウス作製のために極めて重要なものである。よって学位の授与に値すると考えられる。