

論文の内容の要旨

論文題目 D_{1A}ドーパミン受容体遺伝子の転写調節の解析

指導教官 金澤 一郎 教授

東京大学大学院 医学系研究科

平成9年4月 入学

医学博士 課程

脳神経医学 専攻

氏名 竹内 壯介

ドーパミンはカテコラミンの一種で哺乳類の中枢神経における代表的な神経伝達物質である。ドーパミンは中枢神経において、運動制御、認知、情動、陽性強化 (positive reinforcement)、食物摂取、神経内分泌調節等に関与している。また、ドーパミン系の伝達異常は精神分裂病、パーキンソン病、トゥレット症候群、遅発性ジスキネジアなどさまざまな精神神経疾患に関与している。

ドーパミン受容体はG蛋白共役型受容体に属し、その薬理学的特徴から D₁ type 及び D₂ type の二つのタイプに分類される。受容体遺伝子のクローニングから、薬理的 D₁ 受容体、D₂ 受容体にそれぞれ複数のサブタイプが存在することが明らかにされた。哺乳類では、D₁ 受容体に属するものに D_{1A}, D_{1B} (D₅) があり、D₂ 受容体に属するものに D_{2A}, D_{2B}, D₃, D₄ がある。

D_{1A}ドーパミン受容体は、ヒト線条体にて発現されている D₁ 受容体の主なサブタイプである。この分子は 446 アミノ酸からなり、7 回膜貫通型の構造を持ち、その C 末端鎖により G_s 蛋白と共役し、リガンドの結合によりアデニル酸サイクラーゼ活性を促進し、セカンドメッセンジャーである cAMP の生成を促進する。

D_{1A} ドーパミン受容体遺伝子は、ゲノム上では第5染色体長腕に存在し、蛋白をコードしていない第一エクソンと翻訳開始メチオニンを含む第二エクソンに分かれる。また、その上流域は、GCに富み、TATA boxを持たない。また、D_{1A} ドーパミン受容体遺伝子は第一エクソンの上流とイントロン内とに二個所のプロモーターを持ち、其々から転写された大小二種の mRNA が確認されている。

遺伝子の発現は、転写の促進と抑制とから調節されていると考えられるが、神経特異的遺伝子においても、近年 REST/NRSF を始めとする抑制性転写因子の報告が増えるにつれて、促進機構のみならず抑制機構が重要視されるようになってきている。

私たちの着目した D_{1A} ドーパミン受容体は中枢神経系において、線条体、海馬など特定の領域の神経細胞に選択的に発現されているが、その転写調節機構、特に抑制機構については明らかにされていない。

本研究において私たちは、D_{1A} ドーパミン受容体の選択的発現における抑制性調節機構を明らかにすることを目的とした。この際、マウス神経芽細胞腫由来の二種の培養細胞株である Neuro2a 細胞と NS20Y 細胞を用いた。Neuro2a 細胞は D_{1A} ドーパミン受容体遺伝子を発現せず、逆に NS20Y 細胞は発現していることが知られている。

はじめに、種々の長さの D_{1A} ドーパミン受容体遺伝子上流域を含む deletion reporter plasmid を作成し、Neuro2a 細胞を用いて CAT assay を行った結果、D_{1A} ドーパミン受容体遺伝子の CAP site の上流-561 塩基あるいはそれより長い 5' 上流域を持つレポータープラスミドでは、転写活性が抑制されていたのに対し、-532 塩基あるいはそれより短い 5' 上流域を持つレポータープラスミドでは転写活性が上昇していた。この結果は-561 塩基と-532 塩基との間の 30 塩基対の領域に Neuro2a 細胞で働く抑制性転写調節領域 (サイレンサー) が存在することを意味しており、このサイレンサーを D1AS1 (D_{1A} silencer 1) と命名した。

motif 解析の結果からはこの領域内に複数の転写調節因子の結合候補配列が存在したが、Gel mobility shift assay を行うと、Neuro2a 細胞核抽出物に対する D1AS1 と AP-2 コンセンサス配列のシフトが同等であることと、D1AS1 と AP-2 コンセンサス配列は相互に結合を阻害することから、D1AS1 内の転写調節因子結合配列の

うち AP-2 コンセンサス類似配列が Neuro2a 細胞核抽出物と結合するとの結論を得た。

更に、RT-PCR で Neuro2a 細胞内の mRNA 発現を調べると AP-2 β のみが発現していること、また抗 AP-2 β 抗体によって Gel mobility shift assay で super shift が見られることから、AP-2 family のうち AP-2 β が Neuro2a 細胞において D1AS1 に結合している因子であると考えた。また、AP-2 β -GST 融合蛋白を用いて、D1AS1 内のプローブとの Gel mobility shift assay を行い、結合を確認した。

以上の結果を確認するために、AP-2 β 発現ベクターと D1AS1 を含むレポータープラスミドを co-transfection し、Neuro2a 細胞において AP-2 β が D1AS1 依存性に転写を抑制することを観察した。Neuro2a 細胞の D_{1A} ドーパミン受容体遺伝子発現抑制における D1AS1 の重要性を調べるため、D1AS1 に相当する decoy deoxyoligonucleotide の Neuro2a 細胞への co-transfection を行ったところ、転写抑制が解除されることが確認出来た。

上記の結果に対し、D_{1A} ドーパミン受容体遺伝子発現培養細胞株である NS20Y 細胞を用いると、Gel mobility shift assay では核抽出物と D1AS1 との結合は観察されず、CAT suppression assay では AP-2 β による転写活性の抑制は観察出来なかった。

上記の実験結果から、Neuro2a 細胞における D_{1A} ドーパミン受容体遺伝子の転写抑制の際には、上流域の D1AS1 に AP-2 β が抑制的に働くことが重要であると考えた。一方、NS20Y 細胞では、D1AS1 との核内蛋白の結合が見られなかったが、更に AP-2 β 導入にても CAT プラスミドの転写抑制が見られなかったことから、AP-2 β の作用に必要な細胞特異的因子 (cofactor) も欠如しているのではと推測している。

本研究は、ヒト D_{1A} ドーパミン受容体遺伝子の転写調節解析において、サイレンサーと同部に結合するリプレッサーを同定した初めての報告である。また、AP-2 β による転写抑制を示した初めての報告である。

本研究および過去のヒト D_{1A} ドーパミン受容体遺伝子の転写調節解析の報告とをまとめると、ヒト D_{1A} ドーパミン受容体遺伝子上流域には、上流から順に、(1)

D1A S1 (D_{1A} silencer 1) , (2) estrogen responsive element, (3) AR1 (activator region 1), (4) cAMP responsive element 1, (5) cAMP responsive element 2, (6) POU responsive element 1, (7) POU responsive element 2の少なくとも7つの転写調節領域が存在することになる。このうち(6)、(7)は申請者の属する研究グループが先に明らかにした(Okazawa et al. 1996, Imafuku et al. 1996)。

これらのうち、(2)、(4)、(5)、(6)、(7)はいずれも促進性転写調節領域(エンハンサー)として働き、(2)には estrogen receptor の結合が推定されるが、Gel mobility shift assay にての確認は成功していない(Lee et al. 1999)、また、(4)、(5)に結合する因子は報告されていない(Minowa et al. 1996)。(6)、(7)には POU 因子のうち Brn-4 が結合することを認めている。

(3)の領域は線条体核抽出物と結合し、神経系由来培養細胞株で働き、D_{1A}ドーパミン受容体遺伝子の二つのプロモーターのうち上流のプロモーターを活性化する促進性転写調節領域であると報告されている。腎組織核抽出物や腎由来培養細胞株核抽出物では(3)との結合は観察されず、上流のプロモーターによる転写産物が認められない。脳以外の組織では下流のプロモーターからの転写が優位であると推定される(Minowa et al. 1993, Lee et al. 1996, 1997, 1999)。本研究のあとに Yang らにより、(3)に Sp1 が結合して転写を活性化することと、Sp1 の結合に対して ZIC2 および Sp3 が抑制的に作用することが報告された(Yang et al. 2000)。

1995年に Severynse らは、D_{1A}ドーパミン受容体遺伝子上流域 6.4kb に *Lac Z* を結合し、トランスジェニックマウスに導入して発現分布を観察するという手法を用いた転写解析を行い、中枢神経への限定的発現パターンを認めたとの報告を行っている。前述の一過性発現による解析にて得られた知見をトランスジェニックマウスでの解析に応用し、確認してゆくことも有用であると考えられる。

以上、本研究においては、ヒト D_{1A}ドーパミン受容体遺伝子転写調節のうちの抑制性調節機構を解析し、過去の転写調節解析と併せて総括した。今後異なる細胞株や組織を用いた知見が蓄積されることにより、組織特異的あるいは細胞特異的な発現調節の機構が明らかにされていくと考える。これらの知見を将来、固体レベルの発現調節に繋げていきたいと考える。