

氏名	み さわ ひ で み 三 澤 日 出 巳
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 485 号
学位授与の日付	平成 5 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	マウスおよびラットのコリンアセチル転移酵素遺伝子の転写調節機構に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 佐 藤 公 道 教 授 市 川 厚 教 授 河 合 明 彦
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

中枢および末梢神経の伝達物質であるアセチルコリンはコリンアセチル転移酵素 (ChAT) による一段階反応で生合成される。ChAT は現在、コリン作動性ニューロンの機能状態を示す最も特異的なマーカーである。特定のコリン作動性ニューロンがどのようにしてアセチルコリンを伝達物質とする表現型を獲得してゆき、正常時や病態時に ChAT 遺伝子の発現がどのように制御されているかを解明するためには、ChAT 遺伝子のクローニングとその遺伝子発現の調節機構の解析は必須の課題である。筆者は、マウスおよびラットの ChAT 遺伝子の転写調節領域を解析し、以下の新知見を得た。

1. コリンアセチル転移酵素 mRNA の 5' 非翻訳領域のオルタナティブスプライシング

石井らは1990年にラットおよびマウス脊髄からそれぞれ1種類の ChAT の cDNA をクローニングし、その構造を決定した。両者は翻訳領域に高い相同性が認められたが、5' 非翻訳領域は大きく異なっていた。5' 非翻訳領域はゲノム上のプロモーター領域を同定するのに重要であり、この相違が動物種の違いによるものか、もしくは ChAT の mRNA には 5' 非翻訳領域の異なる複数の分子種が存在するのかを明らかにするため以下の実験を行った。

ChAT の cDNA の 5' 領域を効率良くクローニングするために翻訳領域の一部に相補的なプライマーを用い、ラットおよびマウス脊髄の cDNA ライブラリーをそれぞれ作製し、翻訳領域の N 末部分をプローブとしてスクリーニングした。多数の陽シグナルが得られたが、このうちラットから29クローン、マウスから21クローンを単離し、構造を決定した。ラットからのクローンは4種類 (R1, R2, M, N1) に、マウスからのクローンは2種類 (R1, M) にそれぞれ分類された。さらに PCR 法により検討を加えたところ、ラットからは上記4種の他に1種の mRNA が検出され、マウスからは上記のほか5種が検出されたので、これらの構造も決定した。合計すると、少なくともラットで5種、マウスで7種の ChAT mRNA が存在することが判明した。それぞれは、翻訳領域および5' 非翻訳領域の -38 塩基までは同一であり、それより上流の構造が異なっていた。このうち R1-type は以前にラットから得られた種類であった。M-type は以前にマウスから得られた種類であり、これが両方の動物種で最も多量に発現していた。さらに、

マウスとラットの ChAT のゲノム DNA をそれぞれクローニングし、エクソン、イントロン構造を解析した。その結果、複数の ChAT mRNA は、3カ所のプロモーター領域からの転写開始とエクソン内における異なるスプライシング部位の組み合わせにより産生されることが判明した。

2. コリンアセチル転移酵素遺伝子のプロモーター領域およびエンハンサー領域の同定

マウス由来のコリン作動性細胞株である NS20Y および NG108-18 で発現している ChAT の mRNA を PCR 法で解析したところ、M-type のみが検出され、他の発現は微弱であった。このため、この2細胞系は M-type の mRNA の発現調節機構を解析するための有用なモデルであると考えた。マウスの ChAT 遺伝子を部分的に欠失させたのち、下流にレポーター遺伝子（クロラムフェニコールアセチル転移酵素）をつなぎ、上記の細胞に導入してその発現を調べた。マウスの ChAT 遺伝子の 5' 領域は強い発現を導き、この発現には M-type エクソン上流の AT に富む領域が必須であった。また、M-type エクソン下流のイントロン領域にエンハンサー活性があり、上述したプロモーターからの転写を増強した。さらに、さまざまな神経細胞（NS20Y, NG108-15, N18TG1）および非神経細胞（L, NIH3T3, Balb3T3）に導入して解析したところ、この M-type mRNA のプロモーターの発現には神経細胞特異性が認められた。

3. サイクリック AMP (cAMP) によるコリンアセチル転移酵素遺伝子の転写調節

マウスの ChAT 遺伝子の配列に cAMP 反応性エレメント (CRE) に類似の配列が認められたので、この CRE が実際に機能しているのか否かを検討した。NG108-15 細胞で cAMP 誘導体 (dibutyryl cAMP) は ChAT の mRNA と酵素活性とともに2倍に増大させた。この mRNA を PCR 法で解析したところ、cAMP 誘導体添加後も M-type mRNA が最も強く発現していた。ChAT 遺伝子の下流にレポーター遺伝子をつなぎ、NG108-15 と L 細胞に導入して cAMP 反応性を検討した。両細胞とも、cAMP 誘導体の添加によりレポーター遺伝子の発現は顕著に増大した。次に、cAMP による転写誘導に必須のゲノム領域を検討したところ、M-type エクソンの下流のイントロンが必須であり、この領域には前述した CRE が存在していた。さらに、NG108-15 細胞でステイブルな細胞株を樹立して検討したところ、cAMP 誘導体は外から組み込んだレポーター遺伝子の発現と内在性の ChAT 遺伝子の発現をほぼ同程度に増強した。これらの結果は ChAT 遺伝子の M-type のプロモーターの下流に位置するイントロン領域にこの遺伝子の cAMP 反応性を規定するエレメントが存在することを示している。

以上より、ChAT には3カ所のプロモーターからの転写開始とエクソンのオルタナティブスプライシングにより産生される複数の mRNA が存在することを明らかにした。また培養細胞系で、主要なプロモーター領域とエンハンサー領域を同定した。さらに、ChAT 遺伝子の cAMP による転写調節機構の存在を証明した。これらの知見は ChAT 遺伝子の発現調節の基礎的機構を明らかにするとともに、コリン作動性ニューロンの発生、分化の機構を研究する上での基礎を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

コリンアセチル転移酵素 (ChAT) はアセチル CoA とコリンからアセチルコリン (ACh) を一段階反応で生合成する酵素である。ChAT は現在のところ ACh を伝達物質とする神経 (コリン作動性ニューロ

ン)の機能状態を示すもっとも特異的なマーカーであるが、その短期的及び長期的活性調節機構についての知見は未だきわめて乏しい。これを解明するために不可欠な ChAT 遺伝子のクローニングとその遺伝子発現の調節機構を解析したのが本論文の内容である。

1. コリンアセチル転移酵素 mRNA の 5' 非翻訳領域のオルタナティブスプライシング

1990年に石井らによってラット及びマウス脊髄からクローニングされた ChAT の DNA の翻訳領域の一部に相補的なプライマーを用いて作製したラット及びマウス脊髄の cDNA ライブラリーから、ラットで5種類、マウスで7種類の ChAT mRNA を見だし、それぞれは、翻訳領域及び5'非翻訳領域の-38塩基までは同一であるが、それより上流の構造が異なっていた。この内 R1-type は以前にラットから得られていた種類であり、M-type は以前にマウスから得られていた種類であった。また後者が両動物種で最も多量に発現していた。更にマウスとラットの ChAT のゲノム DNA をそれぞれクローニングしてエクソン・イントロン構造を解析し、複数の ChAT mRNA は、3カ所のプロモーター領域からの転写開始とエクソン内での異なるスプライシング部位の組合せにより産生されることを明らかにした。

2. コリンアセチル転移酵素遺伝子のプロモーター領域及びエンハンサー領域の決定

M-type の ChAT mRNA のみを発現するコリン作動性細胞株 (NS20Y 及び NG108-15) を用いて検討した結果、マウスの ChAT 遺伝子の 5' 領域は強い ChAT 遺伝子の発現を導き、この発現には M-type エクソン上流の AT に富む領域が必須であること、M-type エクソン下流のイントロン領域にエンハンサー活性があることが明らかにされた。また、この M-type mRNA のプロモーターの発現は神経細胞特異性のあることが推定された。

3. サイクリック AMP (cAMP) によるコリンアセチル転移酵素遺伝子の転写調節

NG108-15 細胞において、cAMP 誘導体は ChAT の mRNA (主として M-type) 及び酵素活性を2倍に増大させるが、cAMP による転写誘導に必須のゲノム領域は、M-type エクソンの下流のイントロンであり、ここには cAMP 反応性エレメントが存在することを示した。

以上の知見は、ChAT 遺伝子の発現調節の基礎的機構を明らかにしたものであり、コリン作動性神経の発生、分化の機構を研究する上での基礎を提供するものである。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。更に、平成5年6月7日に論文内容とそれに関連した事項につき試問を行った結果、優秀と認定した。