

氏 名 海老原 利 枝

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第700号

学位授与の日付 平成15年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Vesicular GABA transporter and glutamate
decarboxylase genes as targets for differentiation
of GABAergic neuron :genomic organization and
transcriptional regulation

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 森 泰生
教授 小幡 邦彦
教授 池中 一裕
助教授 柳川 右千夫
教授 八木 健 (大阪大学)

論文内容の要旨

小胞型 GABA トランスポーター (VGAT) とグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) は線虫からほ乳類に至る神経系で GABA ニューロンに選択的に発現している。従って、これらの遺伝子発現機構が明らかになれば GABA ニューロンの分化過程が理解できるようになると考えた。VGAT は最近発見された (McIntire et al., 1997; Sagne et al., 1997) ので遺伝子構造や発現調節機構は調べられていない。そこでマウス VGAT 遺伝子の構造および培養細胞中での発現を調べた。VGAT 遺伝子は全長約 4.7 kb で、3 個のエクソンと 2 個のイントロンから構成されていた。また、RT-PCR/southern blotting 法を用いて既に同定されていた配列 (VGATa) と C 末端側のアミノ酸配列が異なるスプライシングアイソフォーム (VGATb) を同定した。主要な転写開始点は翻訳開始点から 209 bp 上流だった。

培養細胞において VGAT 遺伝子は、レチノイン酸 (RA) で分化誘導した P19 胚性腫瘍細胞で高レベル、未分化の P19 細胞では低レベルの発現がみられ、Neuro-2a 神経芽細胞では発現が認められなかった。プロモーター領域には Sp-1, Egr-1, Pitx 等の転写調節領域が認められた。遺伝子上流約 2.0 kb をルシフェラーゼ・レポーター遺伝子に連結し上記培養細胞に導入した結果、いずれの細胞でも同様の活性を示した。更に、遺伝子上流約 2.0 kb から順次欠失させた変異体の解析により転写開始点より -161 から +155 までの領域が、プロモーター活性に最小限必要であることを明らかにした。ゲルシフトアッセイによって -49 から -27 の領域に Sp-1 に似た蛋白が結合することを示した。これらの配列が VGAT 遺伝子の発現調節を行っていると考えられる。

UNC-30 ホメオドメイン蛋白は *C. elegans* で GABA ニューロンの分化に必要な転写因子で、*unc-25* (GAD) と *unc-47* (VGAT) の発現を調節している。このことからほ乳類では UNC-30 のホモログである Pitx 蛋白が GABA ニューロンの分化に関与していると推測した。Pitx2a Pitx2b, Pitx2c 遺伝子の発現は、RA 処理した P19 細胞で同様に誘導された。更に Pitx2a を RA 処理した P19 細胞に一過性に発現すると GAD67 mRNA を発現した細胞と GABA を発現した細胞数が増えた。次に導入した Pitx2a 発現細胞と GABA ニューロンの局在を抗体染色で調べると、発現した細胞は異なっていた。また Pitx2a が VGAT と GAD65 遺伝子のプロモーターを活性化していることをレポーターアッセイで示した。これらの結果から Pitx2a は RA 処理した P19 細胞中で間接的に GABA ニューロンの分化を誘導している事が考えられた。

今回の研究で、マウス VGAT 遺伝子の構造を明らかにした。これによって VGAT ノックアウトマウスを作製し、生体内での VGAT の機能を調べることができる。また、VGAT 遺伝子の転写調節機構を更に検討することにより、ほ乳類での GABA ニューロンの分化過程が明らかになることが予測される。

論文の審査結果の要旨

小胞型 GABA トランスポーター (VGAT) とグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) は線虫からは乳類に至る神経系で GABA 性ニューロンに選択的に発現している。従って、これらの遺伝子発現機構の解明は、GABA ニューロンの分化過程の理解には非常に強力なアプローチとなる。

本研究ではまず、マウス VGAT 遺伝子の構造および培養細胞中での発現を調べた。VGAT 遺伝子は全長約 4.7 kb で、3 個のエクソンと 2 個のイントロンから構成されていた。主要な転写開始点は翻訳開始点から 209 bp 上流だった。Fluoresce in situ hybridization 法によって、VGAT 遺伝子は 2 番染色体上に局在していることを明らかにした。また、RT-PCR/southern blotting 法を用いて既に同定されていた配列 (VGATa) と C 末端側のアミノ酸配列が異なるスプライシングアイソフォーム (VGATb) を同定した。培養細胞において VGAT 遺伝子は、レチノイン酸 (RA) で分化誘導した P19 胚性腫瘍細胞で高レベル、未分化の P19 細胞では低レベルの発現がみられ、Neuro-2a 神経芽細胞では発現が認められなかった。プロモーター領域には Sp-1, Egr-1, Pitx 等の転写調節領域が認められた。遺伝子の 上流約 2.0 kb をルシフェラーゼ・レポーター遺伝子に連結し上記培養細胞に導入した結果、いずれの細胞でも同様の活性を示した。更に、遺伝子の 上流約 2.0 kb から順次欠失させた変異体の解析により転写開始点より -161 から +155 までの領域が、プロモーター活性に最小限必要であることを明らかにした。ゲルシフトアッセイによって -49 から -27 の領域に Sp-1 に似た蛋白が結合することを示した。これらの配列が VGAT 遺伝子の発現調節を行っていると考えられる。

ところで、UNC-30 ホメオドメイン蛋白は *C. elegans* で GABA 性ニューロンの分化に必要な転写因子で、unc-25 (GAD) と unc-47 (VGAT) の発現を調節している。このことから乳類では UNC-30 のホモログである Pitx 蛋白が GABA 性ニューロンの分化に関与していると推測した。Pitx2a Pitx2b, Pitx2c 遺伝子の発現は、RA 処理した P19 細胞で同様に誘導された。更に Pitx2a を RA 処理した P19 細胞に一過性に発現すると GAD67 mRNA を発現した細胞と GABA を発現した細胞数が増えた。また Pitx2a が VGAT と GAD65 遺伝子のプロモーターを活性化していることをレポーターアッセイで示した。これらの結果から Pitx2a は RA 処理した P19 細胞中の GABA 性ニューロンの分化を誘導している事を示した。

今回のマウス VGAT 遺伝子に関する研究は、GABA ニューロンの分化過程の理解に端緒をつけるもので、VGAT 遺伝子があるための強力なツールになることを示したものである。とくに、Pitx2a が GABA ニューロンの分化誘導に関係していることを示すことができ、今後の神経分化の研究に大きく貢献するものである。よって、本研究は博士論文として質、量ともに十分な価値があると判断した。

審査委員会において発表を行い、委員からの質問に適切に答えたことから、周辺分野の専門知識、基礎知識ともに、博士号取得に十分であると判断した。また、英語力も、博士論文、発表論文等から優れたものであると判断した。