

氏名(本籍)	もり 森	ぐち 口	たかし 尚	(茨城県)
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第2653号			
学位授与年月日	平成13年3月23日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	医学研究科			
学位論文題目	Identification of elements in the 5'-flanking regions of human prepro-orexin gene that is required for orexin neurons-specific gene regulation (ヒトプレプロオレキシン遺伝子の5'隣接領域に存在するオレキシン神経特異的な転写制御領域の同定)			
主査	筑波大学教授	理学博士	久野節二	
副査	筑波大学教授	博士(医学)	高橋智	
副査	筑波大学教授	博士(医学)	榭正幸	
副査	筑波大学助教授	医学博士	玉岡晃	

論文の内容の要旨

(目的)

オレキシン (Orex) は、EST データベースより見出された G-タンパク質共役型受容体に対するリガンドとして単離された神経ペプチドである。その発現は摂食中枢と考えられる視床下部外側野に局限し、脳室内投与により摂食行動を亢進させることが報告されている。また、この遺伝子のノックアウトマウスが睡眠障害を呈することから、Orex と睡眠覚醒の制御との関連が示唆されている。視床下部には摂食行動に係わる種々の神経ペプチドが局在している。腹内側部の弓状核には、ニューロペプチド Y、プロオピオメラノコルチン (特に α -メラノサイト刺激ホルモン)、アグーチ関連ペプチドなどの存在が知られている。一方、視床下部外側野には、Orex とメラニン顆粒凝集ホルモンが局在する。視床下部外側野に局限して発現する Orex の発現制御機構の解析は、摂食行動と睡眠覚醒の調節機構やほかの神経ペプチドとの視床下部内相互作用を理解するうえで重要な研究課題である。

(対象と方法)

ヒトおよびマウスのプレプロオレキシン (PPO) 遺伝子に関して 5'隣接領域の塩基配列を比較し、この遺伝子発現調節において系統発生的に保存された機能をもつ領域を検索した。ヒト PPO 遺伝子の 5'上流 3.2-kb の DNA 断片について種々の欠失変異体を作り、大腸菌 β ガラクトシダーゼ (β G) をレポーターとしたトランスジェニックマウスを作成した。X-gal 発色と Orex 免疫染色を同時に行い、各 DNA 断片の遺伝子発現制御機能を検討した。さらに、マウス視床下部の核抽出液のゲルシフトアッセイによりヒト PPO 遺伝子の 5'隣接領域に結合する転写因子の存在を検索した。

(結果)

トランスジェニックマウスにおいて、外側野 Orex 神経にのみ β G 活性を認めたことから、5'上流 3.2-kb の DNA 中に Orex 神経での β G 遺伝子発現に十分な発現制御領域が含まれることが解った。ヒトとマウスの PPO 遺伝子の相同性の検索から 2 カ所で塩基配列の保存領域が判明した。そのうち、転写開始点より 287-bp 上流の OE1 (orexin

regulatory element 1) と名付けた 214-bp を欠失させると、Orex 神経の β G 活性が消失し、弓状核に β G 活性が発現した。OE1 内の 57-bp を欠失させると β G 活性は Orex 神経で消失し、弓状核で発現した。57-bp 領域を 4 分割し、それぞれ欠失させるといずれの場合にも β G 活性は Orex 神経で減少し、弓状核で増加した。視床下部のゲルシフトアッセイの結果は、57-bp 領域と結合する複数の転写因子の存在を示した。ヒト PPO 遺伝子 5' 上流 3.2-kb の DNA 断片に、これらの転写因子の結合を阻害する変異を導入したトランスジェニックマウスの解析では、 β G 活性の発現は弓状核にのみ認められた。

(考察)

本研究は PPO 遺伝子において OE1 の 57-bp 領域が視床下部外側野 Orex における β G 遺伝子発現に必須であることを示している。57-bp の欠失により β G の活性が Orex 神経から消失し、弓状核では発現することから、この領域は PPO 遺伝子発現を弓状核で抑制し、外側野では促進させると考えられる。57-bp の部分的欠失では、いずれの変異体においても β G 活性は Orex 神経で激減した。また、本研究はこの 57-bp 領域に結合する視床下部内在の複数の転写因子の存在を明らかにした。以上の所見から、PPO 遺伝子は 57-bp 領域に対する複数の転写因子の協調的な相互作用により外側野では促進的に、弓状核を含む内側部では抑制的に発現が調節されていると思われる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、摂食行動を亢進する神経ペプチドとして発見された Orex について、なぜ視床下部外側野にその発現が限局するののかの問題をヒトおよびマウスの遺伝子解析と遺伝子操作の実験により解明した非常に意欲的な研究である。その成果は、外側野での Orex 発現に必要な遺伝子領域の特定とその作用の証明、そして発現制御に関わる視床下部内在の転写因子の存在を示唆したことに集約され、今後脳における Orex の機能的役割のさらなる解明へ向けて大きな進展が期待される優れた研究で、学位論文として高く評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。