

氏名(本籍)	まつもとじゅん 松本潤(広島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第3228号
学位授与年月日	平成15年3月25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	Mechanisms of neuronal gene expression of ascidian synaptotagmin gene (ホヤシナプトタグミン遺伝子のニューロンでの発現機構)
主査	筑波大学教授 医学博士 岡戸信男
副査	筑波大学助教授 医学博士 大根田修
副査	筑波大学助教授 博士(獣医学) 杉山文博
副査	筑波大学講師 医学博士 佐藤英世

論文の内容の要旨

(目的)

ニューロン特異的な遺伝子の発現を調べ、その遺伝子のプロモーター領域を解析する事で、ニューロン特異的な転写メカニズムを理解する。

(対象と方法)

2種類のホヤ(マボヤ *Halocynthia* とユウレイボヤ *Ciona intestinalis*) の幼生期までの胚を用いた。ニューロン特異的な遺伝子としては、シナプスでのエキソサイトシスに関わり、すべてのニューロンで豊富に発現するシナプトタグミン遺伝子を対象とした。マボヤシナプトタグミン遺伝子 (*Hr-syt*) の発現はインサイチューハイブリダイゼーション法で調べた。*Hr-syt* プロモーターの遺伝子発現調節領域はGFPやlacZタンパク質の発現によるレポーターアッセイ法で解析した。ホヤ胚へのコンストラクトDNAの導入には、それぞれマイクロインジェクション法(マボヤ)、およびエレクトロポレーション法(ユウレイボヤ)を用いた。

(結果)

- 1) マボヤシナプトタグミン (*Hr-syt*) 遺伝子は383アミノ酸からなり、脊椎動物のシナプトタグミン I, II および V と高い類似性を示した。
- 2) マボヤ幼生での *Hr-syt* の発現を調べたところ、一時的な表皮での発現と、尾芽胚期以降の付着突起, 脳, 運動神経, 表皮感覚神経などの今までに記載されている全てのニューロンでの発現が観察された。
- 3) レポーターアッセイによって, *Hr-syt* の5'上流約3.4kbゲノム断片が *Hr-syt* の内在的なプロモーター活性を持つことが示された。さらに *Hr-syt* プロモーター上の複数のシス調節領域が *Hr-syt* の発現に関与していることが分かった。
- 4) 表皮に関しては1つ ERR1 (-1747から-1727), ニューロンに関しては3つ NRR (-588から-246), NRR2 (-2900から-2500), NRR3 (+100から+203) の調節領域を同定した。これらのうち, ERR1 と NRR3 は, それぞれ表皮とニューロンでの発現に必須であった。
- 5) 同様のデレションされたコンストラクトを別種のユウレイボヤへ導入して解析したところ, NRR2 と NRR3

の活性は保存されていた。

- 6) 最終的にはNRR2の一部とNRR3を含む約400bpからなる領域だけで、マボヤとユウレイボヤ両種において全てのニューロンでの遺伝子発現活性を示した。
- 7) これらの調節領域において、候補となる転写調節因子結合配列を調べたところ、zinc finger (MyT1), Basic Helix-Loop-Helix (E-box), homeodomain (TAAT-core) の結合配列が高頻度でみられた。特に、NRR3には2つのE-boxと1つのTAAT-coreが2回繰り返している特徴的な配列があった。

(考察)

- 1) *Hr-syt*の発現は、全てのニューロンで観察された。このことは、シナプトタグミンがシナプス伝達に必須であるという機能に関する知見からも予測されることであり、ニューロン特異的な発現を解析する系として適していると考えられた。
- 2) *Hr-syt*の5'上流約3.4kbpの*Hr-syt*のプロモーター領域は、レポーターの発現パターンから*Hr-syt*の発現調節領域エレメントを含んでいると考えられた。デレション解析を包括的に行うことにより、複数の領域が*Hr-syt*のニューロン特異的な発現調節に関与していることが示された。
- 3) NRR2とNRR3は、ユウレイボヤでも働くことから、この領域上では両種間で保存されたニューロン特異的な発現に必須な領域であることが示された。
- 4) 本研究で同定した調節領域には、zinc finger, Basic Helix-Loop-helix, homeodomainの結合配列が高頻度でみられたことから、転写因子が*Hr-syt*プロモーター上で発現調節を協調的に行っていることが予想された。特にNRR3には、特徴的な配列が存在しており、今後の結合因子の同定が期待される。

(結論)

*Hr-syt*は全てのニューロンで発現し、*Hr-syt*プロモーター上には複数のニューロン特異的な発現制御領域を見いだした。それらの領域にはzinc finger, Basic Helix-Loop-helix, homeodomain 転写因子結合配列が高頻度でみつかった。NRR2とNRR3はユウレイボヤでも働きが保存され、全てのニューロンで発現活性を持つ領域を、NRR3およびその周辺部からなる400bpまでに限定することに成功した。現在のホヤゲノムプロジェクトの進展を背景に、今後、この領域に注目して*in vivo*で解析することにより、ニューロン特異的転写活性化機構を詳細に調べることが可能となった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

デレション解析を包括的に行うことにより、複数の領域がマボヤシナプトタグミン (*Hr-syt*) 遺伝子のニューロン特異的な発現調節に関与していることが示し、最終的には約400bpからなる領域だけで、マボヤとユウレイボヤ両種において全てのニューロンでの遺伝子発現活性を示す領域を同定した。今後、この領域において、ニューロン特異的転写活性化機構に関与する結合因子を同定することが大いに期待でき、高く評価される論文である。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。