

GSK-3 β の発現調節領域に関する遺伝子解析

小澤 裕昭, 村山 洋, 石黒 香代, 今井 一絵,
藤田 和代, 木下 弥代美, 太田 悦朗, 松田 基夫

麻布大学環境保健学部遺伝子生物学研究室

1. 序 文

高齢化社会に伴い老人性痴呆の急速な増加が大きな社会問題となっている。老人性痴呆の中で約半数以上を占めるアルツハイマー病は今後も増え続けると予想されている。アルツハイマー病にはAPP, PS1, PS2 の単一遺伝子変異が原因で発症する家族性アルツハイマー病があるが, 多くは弧発性アルツハイマー病でその治療法, 予防法などの研究・開発が急務となっている。

アルツハイマー病脳に特徴的な病理所見として老人斑, 神経原繊維変化, 神経細胞の減少による脳の萎縮が見られ, 神経原繊維変化の出現頻度とアルツハイマー病の発症には相関が認められる。神経原繊維変化は硬度にリン酸化されたタウタンパクが認められる。タウは細胞の中で微小管と結合し, その重合能の安定化に寄与している。タウが高度にリン酸化されるとタウは微小管から離れタウタンパク同士で結合し, らせん繊維の形成物 PHF (paired helical filaments) を生じて細胞死を起こすものと考えられている。タウのリン酸化酵素としてはGSK-3 β , CDK5, cdc2, MAP キナーゼが等がある。これらリン酸化酵素のうち GSK-3 β のタンパク発現量は特に脳内で多

く発現され¹⁾, 加齢変化に伴い増加する事が報告されている²⁾。弧発性アルツハイマー病の発症率が加齢と共に増加する事を考えると GSK-3 β の発現量と加齢変化というのはアルツハイマー病研究に興味深い。しかしこれまでに GSK-3 β 発現調節の加齢変化に関する詳細な報告は出されていない。

ヒト GSK-3 β の発現調節に関しては Law らによりクローニングされたプロモーター領域の解析から, レポータージーンアッセイによりコアプロモーターが同定され, その上流の塩基配列にはAP1, AP2, Sp1, CCAAT ボックス, CP2 など転写因子の結合部位が認められている。一方, TATAボックスや転写開始を制御するイニシエーターの配列が認められないという特徴がある³⁾ (Fig. 1)。

そこで我々は加齢変化と関連した GSK-3 β の量的発現調節について検討し, 弧発性アルツハイマー病の発症機序に GSK-3 β がどのように関わっているのかを解明する目的で, 転写効率にかかわるプロモーター領域と, 翻訳効率にかかわる翻訳調節領域について遺伝子解析を行った。さらに, 発現調節領域に含まれる転写因子結合部位などの機能的部位を詳細に検討する目的で, 他の動物種との比較を行った。

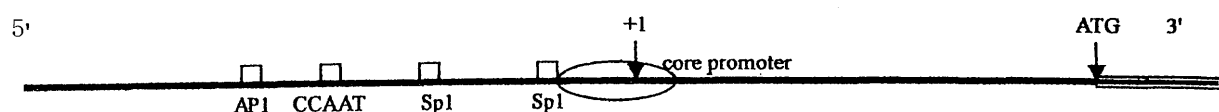
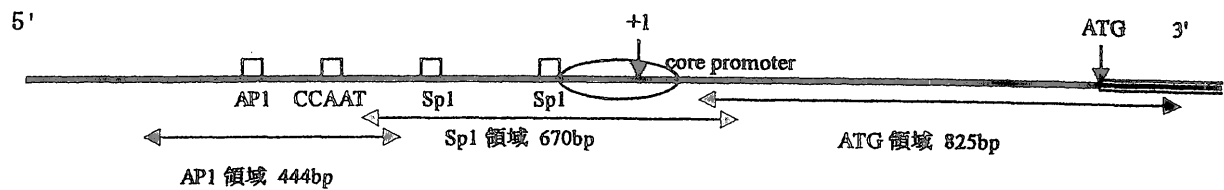


Fig. 1.

(参考文献 3) Law et al.)



プライマーの設計には Law らの文献³⁾ と Russ C らの文献⁴⁾ を参考にして構築した。

AP1 領域 : 5'-AAGGCCAATCACACTGCAG-3' と 5'-AATTCGCCTTGTTCGGTG-3'

Sp1 領域 : 5'-GCCATTGTCAAATGTCTCC-3' と 5'-AGCGGCTCCTCGACTGTT-3'

ATG 領域 : 5'-AGGCTGCTGCACCGGCTTGCAGCT-3' と 5'-CCGGGTTCCCATGTCCCCGGCGAAT-3'

Fig. 2

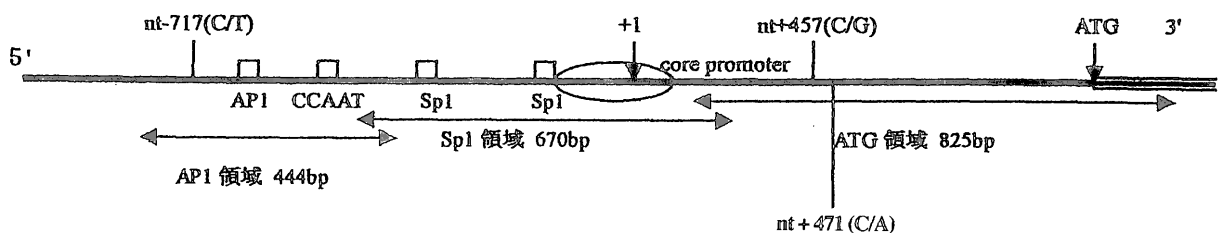


Fig. 3

2. 材料と方法

成人 44 名の血液から Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いてゲノム DNA を抽出した。同様にラット、マウス、ブタ、ウシ、イヌの血液からゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型とし、AP1 結合部位を含む領域 (以下 AP1 領域)、Sp1 結合部位を含む領域 (以下 Sp1 領域)、開始コドン ATG を含む領域 (以下 ATG 領域) をそれぞれ増幅するために設計したプライマーを使用して PCR を行った。PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動後、増幅されたことを確認してダイレクトシーケンス (ABI310) を行った (Fig. 2)。

3. 結果と考察

1) ヒト GSK-3 β の発現調節領域の遺伝子解析: PCR を行った結果、44 検体についていずれも AP1, SP1, ATG 領域ともに一本の増幅断片が得られ、いずれも予想されたサイズ (444 bp, 670 bp, 825 bp) だった。この増幅断片を鋳型として塩基配列を決定した。Law らが報告した配列 (GenBank/AF074333/ 文献 2)) と比較したところ、AP1 領域内の nt-717 の T が 44 検体全てにおいて C となっていた。nt-717 の塩基について

44 検体全てで Lae らの報告と異なっていたことから、日本人に特徴的な配列であることが示唆された。また、ATG 領域における変異 (nt+457 (C \rightarrow G) と nt+471 (C \rightarrow A)) が 44 検体中 2 検体で認められた。この変異が GSK-3 β プロモーター領域の多型であるかどうか検体数を増やして検討する必要がある。一方、プロモーターの活性を制御し転写効率の決定に関わる転写因子 AP1 結合部位や CCAAT ボックスの配列は同じだった (Fig. 3)。

2) ヒト GSK-3 β と他動物種 GSK-3 β との比較: ヒト以外では GSK-3 β プロモーター領域についての情報がデータベースに登録されていないため、ヒト用に設計したプライマーを用いてラットやマウス、ブタ等の動物種でも AP1, SP1, ATG 領域で PCR を行った。動物種の PCR 産物の増幅断片はヒト増幅断片とほぼ同じサイズの増幅断片が得られ、一部の動物種については増幅断片が得られなかった。PCR で増幅した AP1 領域を全長にわたって比較したところヒトとラットで 73.2% の相同性が認められた。ヒトとほぼ同じ部位にラットにおいても転写因子 AP1 や AP2, CCAAT ボックスなどの結合部位が認められた。結合部位以外の塩基配列は nt-746 から nt-735, nt-653 から nt-641 までのそれぞれ 12 塩基で、nt-622 から nt-603

までの 20 塩基で全く同じだった。ATG 領域では上流から約 500 bp までを比較した結果、ヒトとラットで 82.6%，ブタで 88.5% の高い相同性が認められた。ラットでは nt+267 と nt+268 の間に 6 塩基の挿入配列があり，3 塩基欠失と 4 塩基欠失が 1 つずつ，そして nt+472 から nt+485 までの間で 14 塩基の欠失が認められた。ブタにおいても nt+265 と nt+266 の間に 6 塩基の挿入配列があり，6 塩基欠失と 4 塩基欠失が 1 つずつ認められた。また API 領域よりも ATG 領域の方が相同性が高いことから開始コドンにより近い方が保存性が高いということが考えられる。

以上の結果をまとめると，ヒト GSK-3 β のプロモーター領域や翻訳調節領域を塩基配列レベルで解析したところ Law らの報告とは異なる配列を同定した。これまで解析されていなかった動物種についても調

べ，部分的に塩基配列を決定した。ヒトとこれらの動物種との相同性を調べたところ API 領域ではヒトとラットで 73.2% の相同性が認められた。ATG 領域ではヒトとラットで 82.6%，ブタで 88.5% の高い相同性が認められた。また，ヒトと同じ部位に転写因子の結合配列を持つことからヒトとこれら動物種では同様の GSK-3 β 発現調節機構を持つことが示唆される。

参考文献

- 1) Law et al. 1999. J Pept Res. 54: 85-91.
- 2) Takashima et al. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 9637-9641.
- 3) Law et al. 1999. Genomics 60: 121-128.
- 4) Russ et al. 2001 Mol Psychiatry 6: 320-324.