

Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) 遺伝子 プロモーター活性に関する研究

小澤 裕昭¹, 村山 洋^{1,2}, 大輪田恵利², 上野 瞳¹, 松田 基夫^{1,2}

¹麻布大学院・分子生物学, ²麻布大・遺伝子生物学

1. 序文

アルツハイマー病脳に特徴的な病理所見として老人斑, 神経原線維変化および神経細胞の減少による脳の萎縮が認められ, これらの所見のうち特に神経原線維変化についてはその出現頻度と痴呆の重症度との間には高い相関性が認められている。神経原線維変化には高度にリン酸化されたタンパク質としてタウが認められ, このタウの異常なリン酸化が神経細胞死の原因の一つと考えられている。Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) はタウのリン酸化酵素の1つであり, その発現量は脳内で多く, また加齢に伴い増加することからアルツハイマー病などの痴呆症との関連に興味を持たれている。GSK-3 β 遺伝子の発現調節に関しては1999年にLauらによってGSK-3 β のプロモーター領域がクローニングされ, 転写に必要な基本的調節領域が同定されているが, 組織または細胞種特異的な発現調節に関する詳細な報告はない。そこで, 個人差のある加齢変化や痴呆症発症年齢とGSK-3 β の発現調節との関係を明らかにすることを目的として, プロモーター領域における一塩基多型解析を継続的に行っており, 前回の本研究会にて報告した。また, ヒト以外の哺乳類との比較よりGSK-3 β 遺伝子の5'非翻訳領域において比較的保存性の低い部分を明らかにしている。現在, 遺伝子解析により同定したプロモーター領域の一塩基多型の機能的意義を明らかにするためにGSK-3 β プロモーターの転写活性アッセイ系を構築している。今回は, このアッセイ系の条件検討を進める過程で神経系特異的な発現調節に関係すると思われる結果

を得たので報告する。

2. 材料と方法

インフォームドコンセントを得た日本人健常者44名の血液およびラット, マウス, ブタ, ウシ, イヌの血液よりゲノムDNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型としてGSK-3 β 発現調節領域を増幅するために5つの領域に分けてPCRを行い, それぞれの領域で塩基配列を決定した。また, PCRで増幅した様々な長さのヒトおよび各哺乳動物種のGSK-3 β 発現調節領域をTAクローニングベクターであるpGEM-Tベクター (Promega) へサブクローニング後, ルシフェラーゼ発現ベクターであるpGL3ベクター (Promega) へ入れ換え, 組換え体を作成した。その組換え体をCOS7細胞およびSH-SY5Y細胞に導入し, Western Blotにてルシフェラーゼの発現を検出し, 発現量を定量した。

3. 結果と考察

ヒトGSK-3 β 発現調節領域の遺伝子解析により同定されたデータベースとは異なる塩基配列ならびに他の哺乳動物種で認められた挿入・欠失部位の塩基配列がGSK-3 β の発現量に変化を与える要因となり得るのかどうか検討するためルシフェラーゼを用いたレポータージーンアッセイで転写効率を解析した。ヒトでは長さの異なる6つのGSK-3 β 発現調節領域でルシフェラーゼ組換え体を作成し, 各動物種においてもラット, マウス, ブタおよびウシの5'非翻訳領域 (nt + 234より上流) とヒトGSK-3 β プロモーター領域をつなげた組換え体を作成した。その組換え体をCOS7およびヒト神経系の細胞である

SH-SY5Yへ導入した。Western blot解析の結果、作成した組換え体により細胞内でルシフェラーゼが発現されていることを確認した。コントロールベクターの導入によって発現したルシフェラーゼの発現量を基準に比較したところ、腎臓由来のCOS7細胞と比べて神経芽細胞由来のSH-SY5Y細胞の方がルシフェラーゼの発現レベルが高く、GSK-3 β のプロモーターに対して神経特異的または選択的な活性調節が行われていることが示された。すなわち、GSK-3 β プロモーターの活性を促進するなんらかの

因子が神経組織特異的に発現されていることを示唆している。また今回の結果は、腎臓と比べ脳内においてGSK-3 β mRNAレベルが高いという報告とも一致しており、GSK-3 β の神経特異的発現調節の解析に我々の構築したアッセイ系が有効であることが示された。

4. 参考文献

Lau et al., *Genomics* 1999 Sep 1;60 (2):121-8

Russ et al., *Mol Psychiatry* 2001 May; 6 (3): 320-4