

# GSK3 遺伝子発現の分子メカニズムに関する研究

## *Molecular mechanism of GSK3 gene expression*

村山 洋, 松田基夫, 岩橋和彦, 秋山孝洋

麻布大学大学院環境保健学研究科 分子生物学分野

Ohoshi Murayama, Motoo Matsuda, Kazuhiko Iwahashi, Takahiro Akiyama

Laboratory of Molecular Biology, Graduate School of Environmental Health Sciences  
Azabu University

**Abstract.** Glycogen synthase kinase3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) phosphorylates tau, one of neuronal microtubule associated proteins. In Alzheimer's disease, highly phosphorylated tau that deposition neurons may contribute to neurodegeneration. In some case of schizophrenia patients, mRNA level of GSK3 $\beta$  in brain is lower than control brain (Kozlovskyetal., 2003). These suggest that GSK3 $\beta$  may have an important role in developing these diseases and the regulation of GSK3 $\beta$  gene expression may be associated with them. To understand how the expression of GSK3 $\beta$  gene is regulated in neuron, we used the reporter gene assay system (pGL3vector). DNA fragment containing human GSK3 $\beta$  promoter region was sub cloned into cloning site at upstream of luciferase gene. A set of 5'-deletion mutant of the promoter was generated by PCR based mutagenesis. Each construct was introduced transiently into neuronal cells (SHSY) and nonneuronal cells (COS7 and HEK293). The promoter activity of a deletion mutant (-1540 ~ -436) harboring the SP1 sites, the core promoter region (Lau et al. 1999) and 5'-UTR was the highest among mutants used here. Although Luciferase activity was higher in neural cells than in non-neuronal cells, the mutant (-1540 ~ -436) showed the highest activity in any type of cells. These results indicate existence of the neuron specific trans-acting factor for regulating GSK3 $\beta$  promoter activity. The length of 5'-UTR in human GSK3 $\beta$  gene is unusually long (952bp). To study how the long 5'-UTR contributes to GSK3 $\beta$  expression, we generated deletion mutants lacked a portion of 5'-UTR. Activities of the deletion mutants (+234 ~ +952, +556 ~ +952) were higher than that of wild type. In addition, effect of the region deleted (+234 ~ +952) was studied by comparing 5'-UTR sequences of some other animals. The promoters harboring the 5'-UTR of bovine or swine were more active than of human or rat. Although 5'-UTR may be mainly involved in translation, it is possible that this region regulates GSK3 $\beta$  gene transcription.

## 1. 目 的

$\beta$ アミロイドの増加と蓄積が、アルツハイマー病型痴呆の発症の最も重要な原因であるとする『アミロイド仮説』が多くの研究者に支持されており、これに基づいた治療薬開発が精力的に進められている。一方、臨床的な重症度はA $\beta$ の蓄積によりはむしろ神経原線維変化の頻度とよく相関していることなど

から、神経原線維変化の出現が痴呆症発症に深く関わっていると考えられるようになってきた。微小管結合タンパク質タウの異常な蓄積を特徴とする神経原線維変化にはグリコーゲン合成酵素キナーゼ (GSK3 $\beta$ ) が関与しており、この酵素タンパク質をコードする遺伝子の発現調節に関わる分子メカニズムの解明を目的とし、本研究では、GSK3 $\beta$ 遺伝子の転写活性調節（特に神経細胞特異的な調節）に関わ

るシス因子の同定を試みた。

## 2. 方 法

- (1) ゲノム DNA の調整と PCR : Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Tokyo, Japan) を用い、血液よりゲノム DNA を調製した。血液は、健常なヒト、ホルスタイン、ブタ、ラットから得た。抽出したゲノム DNA を鋳型として、GSK3 $\beta$ 遺伝子のプロモーター領域を含む上流領域を PCR で増幅した。PCR に用いたプライマーは、Lau ら (Lau et al., 1999) および Russ (Russ et al., 2001) らの報告及び DNA データベース (GenBank) に公開されているヒト GSK3 $\beta$  遺伝子の塩基配列を参考に設計した。各増幅断片は QIAEX II Gel Extraction kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) を用いて精製した。
- (2) サブクローニングと塩基配列決定 : 精製した PCR 増幅断片を pGEM-T Vector Systems (Promega) を用いてサブクローニングした。挿入断片を制限酵素 *Sph* I 及び *Sal* I による切断後、1% アガロースゲルで電気泳動で確認した。挿入断片の塩基配列は、Big Dye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready reaction kit (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) によるサイクルシーケンシング反応の後、ABI 310 Genetic analyzer (Applied Bio Systems) 自動シーケンサーで確認した。
- (3) 塩基配列の解析 : 決定した塩基配列は、software GENETYX-MAC ver.9 を使用して解析した。
- (4) ルシフェラーゼ発現ベクターの構築 : サブクローニングにより得た上記プラスミド (GSK3 $\beta$  遺伝子のプロモーター領域を含む上流領域) を制限酵素 *Sac* I 及び *Nco* I で切断 (完全消化又は部分消化) して、種々の欠失変異体断片を得た。各断片は QIAEX II Gel extraction kit (QIAGEN) にて精製した。精製した各断片をルシフェラーゼアッセイ用ベクター (pGL3-basic vector) の *Sac* I -*Nco* I 部位に Ligation kit Ver.2 (TaKaRa) を用いて挿入した。挿入断片の塩基配列は、上述と同様に確認した。
- (5) 5'UTR 置換変異体の構築 : 2ステップ PCR 法を用いて、ヒト 5'-UTR の一部 (nt + 188 ~ nt +

1012) を他の哺乳動物の 5'-UTR と置換した断片を得、pGL3-basic vector に挿入した。挿入断片の塩基配列を、上述と同様に確認した。

- (6) 培養細胞 : GSK-3 $\beta$  プロモーターとルシフェラーゼの組換え体を神経系株化培養細胞 SH-SY5Y (ヒト由来) 及び 2 種類の非神経系株化培養細胞 COS-7 (サル腎由来) 及び HEK293 (ヒト腎由来) 細胞を用い、レポーター遺伝子アッセイを行った。
- (7) レポーター遺伝子アッセイ : GSK-3 $\beta$  プロモーター及びその変異体 (欠失変異体、置換変異体) をルシフェラーゼ遺伝子 (pGL3-basic vector) の上流に挿入したプラスミドを上記培養細胞に Lipofectamin2000 (Promega) を用いて導入し、一過性に過剰発現実験を行った。Dual-Glo Luciferase Assay system (Promega) で細胞を溶解すると同時にルシフェラーゼに対する発光基質を加え、ルミネッセンサー JNR AB-2100 (Atto) によりルシフェラーゼ活性を測定した。発光量の測定には Co. Ltd, Tokyo, Japan) を使用した。プラスミドの導入効率の差を補正するため、CMV プロモーターで発現するホタルルシフェラーゼ (pGL3-control vector) を同時に細胞に導入し、その活性を測定した。

## 3. 結果と考察

ヒト GSK-3 $\beta$  の発現調節における分子メカニズムを明らかにする目的で、ルシフェラーゼ (ホタル発光タンパク質) を利用したレポーター遺伝子アッセイを行った。GSK-3 $\beta$  発現調節領域の 5' 側を欠失させて作成した 6 種類の欠失変異体を SH-SY5Y, COS-7 および HEK293 の各株化培養細胞に野生型及び欠失変異体を一過性に導入した実験系を用いた。プロモーターを持たない pGL-3 basic vector を陰性対照として測定した結果、いずれの細胞株においてもプロモーター活性が認められた。各細胞を比較すると神経系の細胞である SH-SY5Y におけるプロモーター活性がもっとも高く、GSK-3 $\beta$  遺伝子の転写活性の効率が神経細胞において非常に高いことが示された。一方、欠失変異によるプロモーター活性への影響のパターンは各細胞間で顕著な差は認められず、神経細胞と非神経細胞の転写効率の違いに関わるシス

エレメントが、転写開始点上流には存在しない可能性が示唆された。

転写開始点下流の 5'-UTR は、翻訳調節 (mRNA の安定性、細胞内移動、リボソーム結合能及び RNase 抵抗性) に関与していることが考えられる。一方、5'-UTR が転写調節に対して抑制的なシスエレメントとして機能しているとの報告もある。5'-UTR の長さは、一般的に 200 ~ 300 bp と考えられているが、ヒト GSK-3 $\beta$  遺伝子の 5'-UTR は約 1 kb と比較的長い領域である。他の哺乳動物との比較から、この領域の長さはおおむね保存されていると予想される。従って、GSK-3 $\beta$  遺伝子の 5'-UTR が、一般的に考えられている機能の他に特徴的な働きを持っている可能性がある。そこで GSK-3 $\beta$  遺伝子の 5'-UTR が、どのように発現調節に関わっているのかを明らかにする目的で、5'-UTR 欠失変異体及び置換変異体を作製し、ルシフェラーゼアッセイにより検討した。神経細胞 (SH-SY5Y) において、欠失変異体  $\Delta$  nt + 234/nt + 1012 及び  $\Delta$  nt + 556/nt + 1012 のプロモーター活性がそれぞれ野生型の 2.04 倍、2.60 倍であった。非神経系細胞においても欠失による転写の活性化が認められたが、神経細胞と比べると活性化の程度が低かった。一方、他の哺乳動物 (ホルスタイン、ブタ、ラット) 由来の nt + 234 ~ nt + 1012 に相当する領域をヒトのそれと置換した置換変異体を用いた実験から、転写活性に対するこの領域 (nt + 234 ~ nt + 1012) の役割が、塩基配列に依存していることが示唆された。以上の結果は、ヒト GSK-3 $\beta$  遺伝子の細胞特異的な転写調節メカニズムに 5'-UTR (特に下流の後半領域) が重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### 4. 要 約

アルツハイマー病の主要な病理所見の一つである神経原線維変化の出現頻度は、痴呆の重症度と強く相関している。Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (以下 GSK-3 $\beta$ ) によるタウのリン酸化は神経原線維変化に

おいて観察されるらせん状の繊維状構造物 (PHF) 形成の原因と考えられている。GSK-3 $\beta$  は特に脳内で多く発現されており、加齢あるいはアルツハイマー病発症に伴って発現量が増加することが報告されている。また、統合失調症患者の前頭野における GSK-3 $\beta$  mRNA のレベルが健常者と比べて約 40 % 減少しているとする報告もある。このように脳の高次機能に重要な役割を果たしていると考えられる GSK-3 $\beta$  の活性調節については、リン酸化を介した翻訳後修飾を中心に詳細に研究されている。一方、発現調節に関する研究は少ない。そこでアルツハイマー病や統合失調症と GSK-3 $\beta$  の発現調節との関係を明らかにすることを視野に入れ、GSK-3 $\beta$  遺伝子のプロモーター活性の分子メカニズムに関する研究を行った。転写開始点より上流を欠失させた 5'欠失変異体、5'UTR 欠失変異体及び 5'UTR 置換変異体をルシフェラーゼ遺伝子発現ベクター (pGL3) に挿入したプラスミドを用いたレポータージーンアッセイを行った。その結果、GSK-3 $\beta$  遺伝子の basal level の基本転写に関わるシスエレメントが転写開始点より上流にあり、5'UTR に細胞特異的な転写活性に関わるシスエレメントが存在することが示唆された。以上の結果より、本研究において、GSK-3 $\beta$  遺伝子の発現調節機序を解明する上で重要な知見が得られたと考えている。

#### 文 献

- Lau, K.F., Miller, C.C., Anderton, B.H. and Shaw, P.C. (1999a) Molecular cloning and characterization of the human glycogen synthase kinase-3 beta promoter. *Genomics*. 60: 121-128.
- Lau, K.F., Miller, C.C., Anderton, B.H. and Shaw, P.C. (1999b) Expression analysis of glycogen synthase kinase-3 in human tissues. *J. Peptide. Res.* 54: 85-91.
- Russ, C., Lovestone, S. and Powell, J.F. (2001) Identification of sequence variants and analysis of the role of the glycogen synthase kinase 3 beta gene and promoter in late onset Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry*. 6: 320-4, 2001.