



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

## Characterization of the Promoter Region of the Bovine Prion Protein Gene

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 井上, 真吾 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2091">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2091</a>

氏名(本籍)	井上真吾(広島県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第37号
学位授与年月日	平成9年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学位論文題目	Characterization of the Promoter Region of the Bovine Prion Protein Gene
審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 品川 森 一 副査 岐阜大学 教授 平井 克 哉 副査 東京農工大学 教授 本多 英 一 副査 岩手大学 教授 品川 邦 汎 副査 帯広畜産大学 教授 白幡 敏 一

### 論文の内容の要旨

近年、プリオン病と呼ばれるようになった伝達性海綿状脳症(TSE)の病原体、プリオンは宿主の膜糖蛋白であるプリオン蛋白( $\text{PrP}^{\text{C}}$ )の構造異性体である $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ を主成分としてゐる。両者には構造上、 $\text{PrP}^{\text{C}}$ は $\alpha$ ヘリックス含量が高く、 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ は $\beta$ シート含量が高いという違いがみられるが、検出できるような修飾やアミノ酸配列の違いなどはない。 $\text{PrP}^{\text{C}}$ は動物種間でよく保存され、調べられたかぎりでは何れと比較しても80%以上のアミノ酸の相同性がある。 $\text{PrP}^{\text{C}}$ の機能として小脳のプルキンエ細胞の維持に関係するという報告があるが、その機能は十分明らかにされていない。 $\text{PrP}$ mRNA及び $\text{PrP}$ の量は組織によって違いがあり、中枢神経系組織には高いが、筋肉や心筋あるいは腎臓などでは量が低く、肝臓ではほとんど検出できない。プリオンの蓄積及び病変の出現は量の多い中枢神経系組織に限局している。TSEを理解するために、まずこのような組織による $\text{PrP}$ mRNA及び $\text{PrP}$ の量の違いを解明する必要がある。 $\text{PrP}$ mRNA量の違いを知るためには、 $\text{PrP}$ 遺伝子の構造と $\text{PrP}$ 遺伝子の転写段階での発現調節機構についての解析が必要である。このため、本研究では、牛海綿状脳症の宿主である牛の $\text{PrP}$ 遺伝子を対象として、 $\text{PrP}$ 遺伝子とそのプロモーター領域を含む染色体DNAのクローニングとその塩基配列の決定ならびにプロモーター領域についての解析を行った。

#### 1. ウシゲノム $\text{PrP}$ 遺伝子の構造解析と5'側非コード領域の塩基配列の決定

ウシ白血球の染色体DNAを用いて作製したゲノムライブラリーからウシ $\text{PrP}$ 遺伝子の5'

側非コード領域のエクソンを含むクローン (BPrP10.25) とコード領域のエクソンを含むクローン (BPrP7.14) を得て、それらの塩基配列を決定した。既に報告されているウシPrPcDNAの塩基配列との比較から、ウシPrP遺伝子の5'側非コード領域は3つのエクソンと2つのイントロンから構成され、マウス、ラットおよびヒツジのPrP遺伝子と同じ構成であったが、2つのエクソンから構成されている人及びハムスターと異なっていた。主な転写開始部位は前述のcDNAの5'端に一致していた。エクソン1の5'側隣接領域には通常のプロモーターにみられるTATA配列はなかったが、GC%の高い領域が存在し、この遺伝子がハウスキーピング遺伝子であることを示していた。ヒツジとは高いホモロジー (89%) を示したが、マウス、ラット、ハムスターおよびヒトの相同領域とは比較的に低いホモロジー (46-62%) しか示さなかった。

## 2. ウシPrP遺伝子のプロモーター領域の検索

プロモーター活性を調べるため、さまざまな長さのPrP遺伝子エクソン1の5'側隣接領域をクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子上流に配置した13種類のプラスミドを作出した。プロモーター活性を測定するために、これらプラスミドを牛株化細胞であるCKT-1と*B. turbinata*にトランスフェクションし、それらの抽出液を用いてCATアッセイを行った。その結果、転写開始部位の上流-91から-30までの領域内にプロモーター活性が認められた。また、この領域がプロモーター活性を示すためにはイントロン1の存在が必要であった。

## 3. ウシPrP遺伝子イントロン1のプロモーター活性調節領域

イントロン1にプロモーター活性を正に調節する領域の存在が判った。この領域を特定するために、新たにイントロン1内に欠失を持つ5種類のプラスミドを作出して調べた。転写開始部位から3'側+122から+888の範囲にこの領域を局限することができた。この領域は通常のエンハンサーと異なり、CAT遺伝子の3'側に存在しては機能しなかった。他の遺伝子でもこのような調節因子の存在が近年報告されている。牛PrP遺伝子もプロモーター以外にイントロン1内の調節因子によって調節され、この調節因子が組織特異的なPrP遺伝子の発現に関与している可能性もある。

以上、著者は、ウシPrP遺伝子の5'側非コード領域を構成するゲノム構造について明らかにした。また、本遺伝子の発現を調節しているプロモーター領域をエクソン1の5'側隣接領域内に特定した。さらにイントロン1内にこのプロモーター活性を正に調節する領域が存在するが、通常のエンハンサーとは異なることを明らかにした。これらの事実は、今後PrPのmRNAの臓器特異的な発現の機構を明らかにするために有用であると考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

伝達性海綿状脳症 (TSE) は別名プリオン病とも呼ばれる。病原体であるプリオンは宿主の膜糖蛋白であるプリオン蛋白 ( $\text{PrP}^c$ ) の構造異性体である  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  を主成分としたア

ミロイド物質である。PrP<sup>c</sup>は動物種間でよく保存された蛋白であるが、その正常な機能は十分明らかにされていない。また、PrPのmRNAは組織により発現量に違いがみられ、中枢神経系組織には高いが、筋肉や心筋あるいは腎臓などでは発現量が低く、肝臓ではノーザン法では検出できない。プリオンの蓄積及び病変の出現は発現量の高い中枢神経系組織に局限している。TSEを理解するために、まずこのような組織によるPrP mRNAの発現の違いを解明する必要があり、PrP遺伝子の転写段階での調節機構を解明するためにはPrP遺伝子構造と発現調節機構についての解析が必要である。

本研究では、まず、牛海綿状脳症の宿主である牛のPrP遺伝子を対象として、PrP遺伝子とそのプロモーター領域を含む染色体DNAのクローニングとその塩基配列を決定し、遺伝子構成を明らかにした。即ち、ウシPrP遺伝子の5'側非コード領域は3つのエクソンと2つのイントロンから構成され、マウス、ラットおよびヒツジのPrP遺伝子と同じ構成であるが、2つのエクソンから構成される人及びハムスターのPrP遺伝子の構成とは異なっていた。主な転写開始部位は以前に報告されている牛PrP cDNAの5'端に一致していた。エクソン1の5'側隣接領域には通常のプロモーターにみられるTATA配列はなかったが、GC%の高い領域が存在し、この遺伝子がハウスキーピング遺伝子であることを示唆した。この領域はヒツジとは高い相同性(89%)を示したが、マウス、ラット、ハムスターおよびヒトの相同領域とは相同性が比較的 low (46-62%)、高い相同性を持ったコード領域と際違った違いを示した。

次いで、PrP遺伝子のの上流部のさまざまな長さのDNA断片を作成して、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子をレポーター遺伝子として、その上流に結合したプラスミドを作成した。これらのプラスミドを2つの牛株化細胞に導入してプロモーター領域についての解析を行った。その結果、mRNAの転写開始部位から上流の-91から-30までの領域内にプロモーター活性を認め、この領域がPrP遺伝子のプロモーターと判定した。しかしこの解析過程で始めて明らかになったことであるが、牛PrP遺伝子のプロモーターはそれ単独では十分活性を示すことができず、プロモーターが活性を示すためにはイントロン1の存在が必要であった。イントロン1内に欠失を持つプラスミドを作成して、イントロン1にプロモーター活性を正に調節する領域を特定したところ、転写開始部位から3'側+122から+888の範囲にこの領域を局限することができた。この領域は通常のエンハンサーと異なり、CAT遺伝子の3'側に存在しては機能しなかった。極く最近、類似した知見が他の遺伝子のプロモーターについて報告され、単に牛PrP遺伝子のプロモーターという点に止まらず、広く、遺伝子調節の研究の上でも興味深い知見であると判断された。

本研究で著者が得た知見は、今後PrPのmRNAの臓器特異的な発現の機構を明らかにし、ひいてはTSEの理解に大いに貢献するものと期待される。

以上、学位論文審査委員会は、提出論文ならびに学位論文の基礎となる学術論文などについて慎重に審議した結果、審査委員全員一致をもって本提出論文が博士の学位論文として十分に価値があるものと判断した。