

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

那 和 雪 乃

専攻分野：脳情報制御医学

コース：

指導教授：松井 宏晃

主論文の題目：

Functional Characterization of the Neuron-Restrictive Silencer Element in the Human Tryptophan Hydroxylase 2 Gene Expression.

(ヒトトリプトファン水酸化酵素 2 遺伝子発現における神経特異的抑制配列の機能解析)

共著者：

Hanae Kaneko, Masayuki Oda, Masaaki Tsubonoya, Tomoko Hiroi, Maria Teresa Gentile, Luca Colucci-D'Amato, Ryoya Takahashi, Hiroaki Matsui

緒言

セロトニン(5-HT)の生合成を担うトリプトファン水酸化酵素 (TPH) には 2 種類のアイソフォーム TPH1 および TPH2 が存在し、前者は末梢組織および松果体、後者は中枢神経系に特異的に発現する。中枢 5-HT 神経系の機能障害が関わる様々な精神・神経疾患の病因・病態を明らかにする上で、ヒト TPH2 遺伝子発現制御機構の解明は重要である。

神経特異的抑制因子 (NRSF) は、標的遺伝子の神経特異的抑制配列 (NRSE) に結合し、補因子を介してヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) と共役し転写を抑制する。また、NRSF の機能は、ユビキチン-プロテアソーム系の制御を受ける。

ヒト TPH2 遺伝子は、5' 非翻訳領域に NRSE を有するが、その機能は明らかにされていない。本研究は、NRSF-NRSE 系を介するヒト TPH2 遺伝子発現調節機構の解明を目的として行った。

方法・対象

中枢 5-HT 神経細胞のモデルとして、ラット縫線核由来 RN46A 細胞を使用した。分裂 (33°C) および分化 (39°C) の両培養条件下で RN46A 細胞における 5-HT 神経マーカー遺伝子および *Nrsf* 遺伝子の発現レベルをリアルタイム PCR にて測定した。

ヒト、ラット、マウス TPH2 遺伝子および TPH1 遺伝子プロモーター領域を pGL4-Basic のルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポーターベクターを構築した。各レポーターを RN46A 細胞に導入し、48 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。

RN46A 細胞から抽出した核タンパク質および ^{32}P で標識したヒト TPH2-NRSE オリゴヌクレオチドプローブを用いてゲルシフトアッセイ (EMSA) を行った。

更に、NRSF ノックダウン、ドミナントネガティブ (dn) NRSF および転写活性化ドメイン (VP64) 融合型 NRSF の過剰発現、HDAC 阻害薬および脱ユビキチン化酵素阻害薬添加の条件下におけるヒト TPH2 プロモーター活性の変化を調べた。

統計解析は Student の *t* 検定を用い、必要に応じて Bonferroni 補正をした。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

分裂および分化の両培養条件下で RN46A 細胞は、5-HT 神経細胞特異的マーカー遺伝子 (*Mash1*、*Nkx2.2*、*Gata2*、*Gata3*、*Lmx1b*、*Pet-1*、*5-Htt*、*Vmat2*) に加え、*Nrsf* 遺伝子を発現した。主たる TPH アイソフォームは *Tph1* mRNA であり、*Tph2* mRNA 発現は低レベルだった。この結果を踏ま

え、以後の実験は分裂条件下で実施した。

NRSE を有するヒト、ラット、マウス TPH2 遺伝子プロモーター活性は低値であったが、NRSE を変異させると活性が増大した。一方、TPH1 遺伝子のプロモーター活性はいずれも高値であった。

EMSA により、NRSF がヒト TPH2-NRSE に結合することが示された。

NRSF ノックダウン、dnNRSF および VP64-NRSF 過剰発現により、プロモーター活性は有意に増加した（いずれも $p < 0.001$ ）。

HDAC 阻害薬 MS275 (クラス I 特異的) は MC1568 (クラス II 特異的) と比較して、プロモーター活性を増加させる効果が有意に高かった ($p < 0.001$)。

NRSF 脱ユビキチン化酵素 USP7 の阻害薬 P22077 および HBX41108 は、いずれもプロモーター活性を有意に増加させた（いずれも $p < 0.001$ ）。

考察

本研究は、RN46A 細胞において、ヒト TPH2 プロモーター活性が NRSF-NRSE 系を介して抑制されることを明らかにした。これらの結果は、脳内における TPH2 遺伝子発現が NRSF 活性に依存して抑制される可能性を示唆する。うつ病の女性では、対照群よりも背側縫線核における *NRSF* mRNA 発現量が有意に高いとの報告があり、NRSF 発現量増加による TPH2 遺伝子発現抑制が、5-HT 神経伝達の低下と関連する可能性が示唆される。

気分障害の病態に HDAC 発現変化が関与し、HDAC 阻害薬がマウスのうつ病様行動を改善したと報告された。NRSF によるヒト TPH2 プロモーター抑制には、主にクラス I HDAC が関与するという本研究結果と併せて考えると、HDAC 阻害薬が新規抗うつ薬となり得る可能性が示唆される。

USP7 の阻害により、ヒト TPH2 プロモーター活性が増加することを見出した。この結果は、NRSF の速やかな脱ユビキチン化により NRSF 高発現が維持され、ヒト TPH2 プロモーター活性が抑制されたことを示唆す

る。

脳内 5-HT 神経系の機能障害が推定される自閉症において、原因遺伝子の 1 つとして USP7 が同定されたことから、ユビキチン-プロテアソーム系を介する NRSF の安定性に依存して、ヒト TPH2 遺伝子発現が制御される可能性が考えられる。

結論

ヒト TPH2 遺伝子の発現調節機構において、NRSE を介した NRSF によるプロモーター活性の抑制は、クラス I HDAC 依存性であり、USP7 を介する NRSF の脱ユビキチン化により調節される。