

睡眠覚醒制御神経ペプチドであるオレキシンの特異的転写制御因子の探索とその機能解析

田中進、山崎和行、本多芳子、児玉亨

財団法人東京都医学総合研究所

精神行動医学研究分野

睡眠覚醒制御プロジェクト

睡眠覚醒制御に深く関与する神経ペプチドオレキシンの遺伝子発現は脳内視床下部外側野に局限される。その発現はオレキシンプロモーター領域内に含まれる OE1-II と呼ばれる 57bp の配列により制御される(1)。OE1-II の 5'側より 15bp 程度ずつ区切り、それぞれの配列を順番に欠損させた結果、4 部位全てにおいて外側野でのオレキシン発現が減弱する。この結果はそれぞれの部位特異的な結合因子の存在が示唆されるが、この OE1-II 領域における遺伝子発現制御因子は未同定である。

報告者らは酵母 One-hybrid System (CLONTECH)を応用し Aureobasidin A (AbA) 耐性遺伝子上流に OE1-II 配列(57bp)を組み込み、それをさらに酵母ゲノム中に導入した。これにより OE1-II 配列結合因子存在下では AbA 耐性遺伝子の発現が ON になるシステムを作成した。その酵母株に対してマウス視床下部 cDNA ライブラリーを導入することにより OE1-II 結合因子の同定を試みた。しかしながら 1 次スクリーニングにて陽性と判定されたクローンの全てが 2 次スクリーニング時では偽陽性であった。検討を重ねた結果、OE1-II 全長を用いた際には、欠損培地において視床下部 cDNA 由来の候補結合因子非存在下でも酵母が生育することが分かり、OE1-II 配列自体が酵母の内在性因子に認識されている可能性が考えられた。そこで OE1-II 配列中でも進化的に特に保存されている 3 箇所を同定 (Figure1A、囲まれ

ている配列)し、それにより酵母の内在性因子による認識が起こるか否かを検討した (Figure1B~E)。実際にはそれぞれの部位を OE1-II 配列の時と同様 AbA 耐性遺伝子上流に組み込んだ酵母株を作成したのち、cDNA ライブラリー由来のタンパクが存在しない状態で AbA 培地での生育が可能かどうかを検討した。結果、OE1-II 後半の 10bp の配列 (II-3'、Figure1D)を用いた場合のみ酵母の生育が観察されず、この配列のみが酵母の内在性因子に認識されなかった可能性が考えられた。さらにこの配列へ変異を導入する事により酵母の生育が可能となり、酵母内在性因子による認識を引き起こした (Figure1E)ことが考えられ、この 10bp の配列が哺乳類においてかなり特異性の高い配列であることが考えられた。アライメント解析を行った結果、この配列が哺乳類(ヒト、サル 2 種、ウシ、ブタ、イヌ、ラット、マウス)特異的かつ 100%保存されていることが確認された (Figure1E)。一方、我々は、マウス視床下部でのオレキシン発現が胎生期 11 日から始まっていることを報告している(2)。組織学的検討により、この胎生期 11 日目にはすでに視床下部外側野でのオレキシン発現が観察される。これらのことから胎生期 11 日以前に視床下部外側野でのオレキシン発現を規定する因子が存在していることが示唆された。

この II-3'配列およびマウス胎生期 9~11 日目の脳 cDNA ライブラリーを用いた酵母 One-hybrid System による解析を行い、複数出現かつ独立したスクリーニングにおいてどちらにも出現したクローンをいくつか同定した (Table1)。その中のクローン 111(c111)は我々がすでに同定し、報告していた「後天的にオレキシン神経細胞が脱落するよう改変されたトランスジェニックマウスの視床下部において発現低下する転写因子」のひとつであった(3)。この c111 遺伝子はもともと唾液腺多形腺腫にて発現上昇する別の遺伝子の相同遺伝子として同定されている。タンパクは 496 個のアミノ酸より構成され、6 つの C2H2 型 Zincフィンガーモチーフを持ち C 末側に機能未知のドメインを持つ核内転写制御因子として知られる。ヒトの一過性新生児糖尿病においてこの遺伝子の異常なインプリンティングが報告され、トランスジーンによる過剰発現マウスにおいても同様の症状が発現する。現在では新生児の遺伝子発現にとって重要な、環境に反応して Epigenetic な制御をおこなう因子の一つであることが分かってきている。Homozygous または Heterozygous な null マウスにおいて、新生児致死・体重減少・骨低形成・呼吸困難・3 割でしわしわの皮膚と巻き尾が知られ、胎生期においても重要な因子であると考えられる。また、一過性新生児糖尿病の原因遺伝子として同定されてはいるが、この c111 遺伝子が何をターゲットとし

てこの新生児疾患を引き起こしているのは同定されておらず、オレキシン神経細胞のグルコースセンサーとしての役割からも興味深い。

そこで c111 遺伝子の胎生期での発現を *in situ* hybridization により検討した。マウス視床下部 cDNA より 1000bp 程度の c111 配列を PCR により増幅し、それを TA クローニングにより pGEM-T easy vector (Promega) に導入した。シーケンスにより方向性を確認したのち、RNA polymerase により *In vitro* 転写反応を行い、DIG 標識 c111 antisense cRNA プローブを作成した。胎生期 13 日目のオレキシンのシグナルは陥入部と視床原基に挟まれた視床下部領域でのみ発現が観察された (Figure2B)。c111 プローブにて胎生期 13 日目の同一層の矢状断切片を染色した結果、同一とみなされる部位にてシグナルが観察された (Figure2C)。胎生期 13 日目以前の胎児脳を染色した結果、c111 のシグナルは ventral hypothalamic sulcus と呼ばれる視床と視床下部の間溝に沿うように観察された (Figure2E-H)。胎生期 9 日目における脳室近傍のシグナル (Figure2D) がどのように移動していくのか、またいつの時期、どこの部位へ移動した後からオレキシンが発現し始めるのかを今後検討していく必要がある。

実際に今回同定した c111 遺伝子が 5'-3'ならびに OE1-II 配列に結合するのかを Protein-DNA binding assay (TAKARA Bio) を用いて検討した。pProLabel-C vector に c111 coding 配列を導入し pPro-c111 vector を作成した。これを培養細胞 NIH3T3 に強制発現させ全タンパクを抽出した。このタンパク中で c111 にのみ ProLabel タグが融合していることになる。これとビオチン化した OE1-II 配列、c111 コンセンサス配列 (既知の c111 が結合するのが分かっている配列、Positive control)、p53 コンセンサス配列 (Negative control)、トリプレット 5'-3' 配列とを反応させた。ストレプトアビジンにてビオチン化遺伝子配列をトラップすることにより、それぞれに結合しているタンパクもトラップされる。もし c111 タンパクがトラップされているのであれば ProLabel の基質を加えることにより活性が得られ、それがすなわち遺伝子配列とタンパクとの結合の指標となる。Vector 導入なしの NIH3T3 細胞由来全タンパクや空 Vector である pProLabel-C 導入 NIH3T3 細胞由来全タンパクを用いた検討では用いたすべての遺伝子配列で活性は観察されなかった (Figure3)。pPro-c111 vector を用いた検討において OE1-II 配列、c111 コンセンサス配列、5'-3' 配列すべてで結合活性が観察された。Negative control として用いた p53 結合コンセンサス配

列との結合活性に対して優位に活性の上昇が観察された。アッセイの Positive control として pPro-p53 導入 NIH3T3 細胞由来全タンパクを用いた結果、p53 コンセンサス配列への結合のみが観察され、アッセイ自体は信頼できることが考えられた。

Protein-DNA binding assay により結合が確認されたため、実際に c111 がオレキシン上流の転写活性の制御に関与するか否かをレポーターアッセイにて検討した。pGL4 vector (Promega)のルシフェラーゼ上流にマウスオレキシン遺伝子上流 473bp 配列を組み込み細胞に導入したのち、pProLabel-C, pPro-c111, pPro-family 存在下でのルシフェラーゼ活性を検討した。pPro-family vector には c111 遺伝子の相同遺伝子配列を組み込んである。今回導入したオレキシン上流配列 473bp は NIH3T3 細胞内での転写活性を有することが確認された (Figure4A)。さらに c111 への反応性ならびに相同遺伝子への反応性も有していることが確認された。このオレキシン上流配列より 100bp ずつを欠損させた Vector を作成し (Figure4C) 検討した。結果、反応性の消失は確認されなかった。しかしながら、この結果はこのとき使用した pGL4 自体が c111 ファミリータンパクへの反応性を有していたため得られた結果であることが判明したため、バックボーンとなる Vector として pTAL-Luc vector より in house にて HSV-TK を取り除いた p-Luc vector を作成し、それに対しオレキシン上流配列を組み込み検討した。その結果、作成した p-Luc vector は c111 ファミリータンパクへの反応性が消失した (Figure4B)。そのうえで、マウスオレキシン遺伝子上流 473bp 配列、各種欠損変異配列を導入し反応性を検討した。C111 への反応性が del5 変異体でのみ観察された。オレキシン上流配列はファミリータンパクへの反応性を有していなかったが、del2 変異体では反応性が観察された。このことからオレキシン上流配列自体が del2 領域を含む配列にて転写活性を抑制することにより、見かけ上の反応性の消失が観察されたものと考えられる。さらにその抑制を del2 変異体にて除去することによりファミリータンパクへの反応性を見ることが可能であると考えられた。ただし、欠損変異体では他の重要な部位まで欠損してしまうことにより実際の反応とは違うものを観察している可能性が高いため、今後 OE-1-II に変異を入れ、配列の長さを変えない条件において検討する必要があると考えられる。

最後に、今回酵母 One-hybrid System により新規のオレキシン転写制御因子の候補を同定し、共存お

よび in vitro での転写制御への関与を示した。しかしながら、実際に生体内で働くかどうかは示しておらず、今回同定した候補遺伝子を胎児期の脳に強制発現させオレキシン神経細胞の発現が誘導されるか否かを検討していく必要がある。また、オレキシン近傍でのシグナルを確認したのみで留まっており、
2 重染色による共存の証明が必要となってくる。さらには候補遺伝子のノックアウトマウスや過剰発現マウスにおけるオレキシンの発現パターンの検討が必要である。

1. T. Moriguchi, T. Sakurai, S. Takahashi, K. Goto, M. Yamamoto, The human prepro-orexin gene regulatory region that activates gene expression in the lateral region and represses it in the medial regions of the hypothalamus. *J Biol Chem* **277**, 16985 (May 10, 2002).
2. S. Tanaka, Transcriptional regulation of hypocretin/orexin gene. *Vitam Horm* **89**, (in press).
3. M. Honda *et al.*, IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin (orexin). *PLoS One* **4**, e4254 (2009).

A

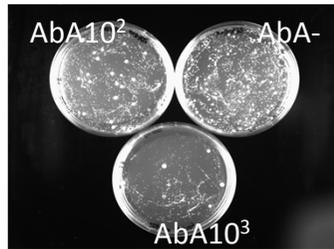
OE-II配列

CGCCTCTTTTGTGCTCCCAGATTCTGGGTGCAAGGTGGCCTCATTAGT
 GGCCTCTTTTGTGAACTTAGATTCTGGGTGCAAGGTAACTCATTAGT

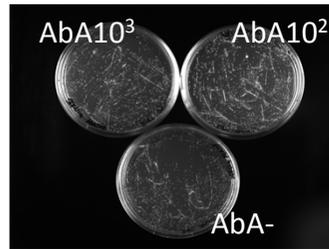
Human
 Mouse

B

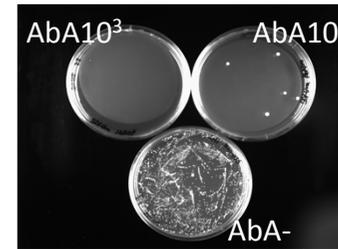
II-1'

**C**

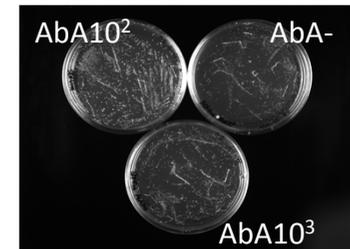
II-2'

**D**

II-3'

**E**

II-3' mutant



Recognition assay by endogenous yeast proteins

F

Homo sapiens
Pan troglodytes
Macaca mulatta
Sus scrofa
Bos taurus
Canis lupus familiaris
Rattus norvegicus
Mus musculus
Gallus gallus
Danio rerio (reverse & intronic)

CCTCATTAGT
 CCTCATTAGT
 CCTCATTAGT
 CCTCATTAGT
 CCTCATTAGT
 CCTCATTAGT
 CCTCATTAGT
 CCTCATTAGT
 CCTCATTAGT
 CTTCATTAGT
 ATTCATTAGT

Figure1

Positive Clone ID	Number of positive clones		total	Ref.
	1 st (1.7x 10 ⁷)	2 nd (2.8x10 ⁷)		
C24	3	5	8	Outside of ORF
C31	2	1	3	Proto-oncogene
C34	1	2	3	
C111	2	2	4	Downregulated in ATX3/Orx
c203	0	1	1	Interaction with c111
C42	2	2	4	rep
c218	0	2	2	Turner syndrome
c212	0	2	2	GATA-3 partner
others	22	34	56	
Total	33	51	84	

Table1

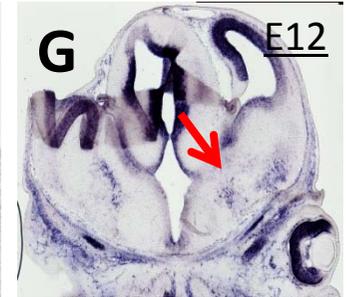
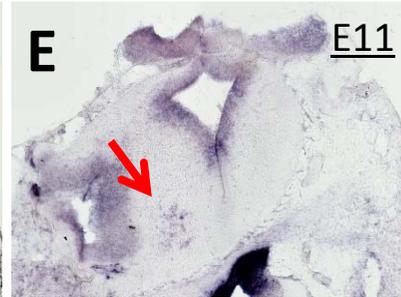
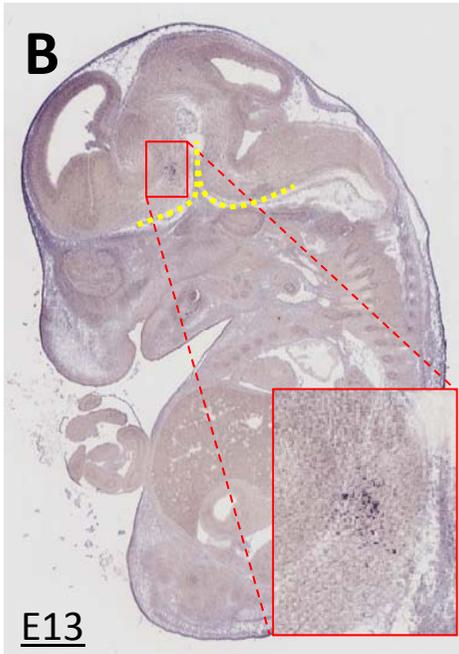
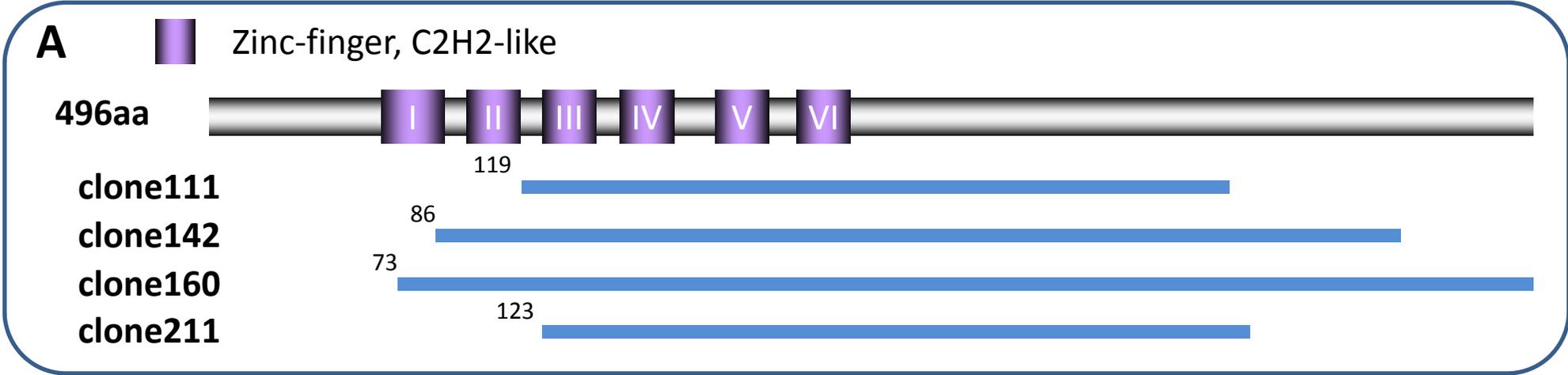


Figure2

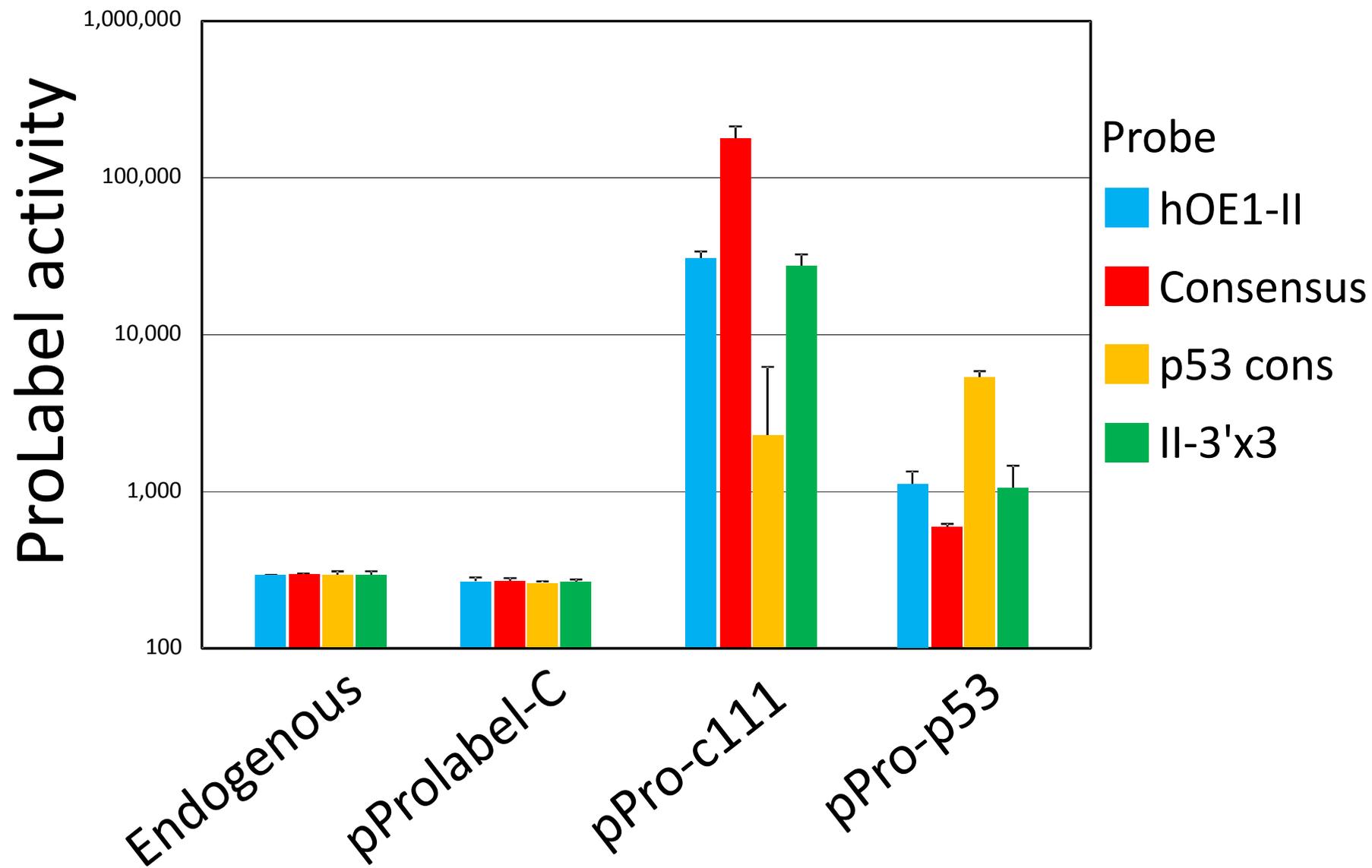


Figure3

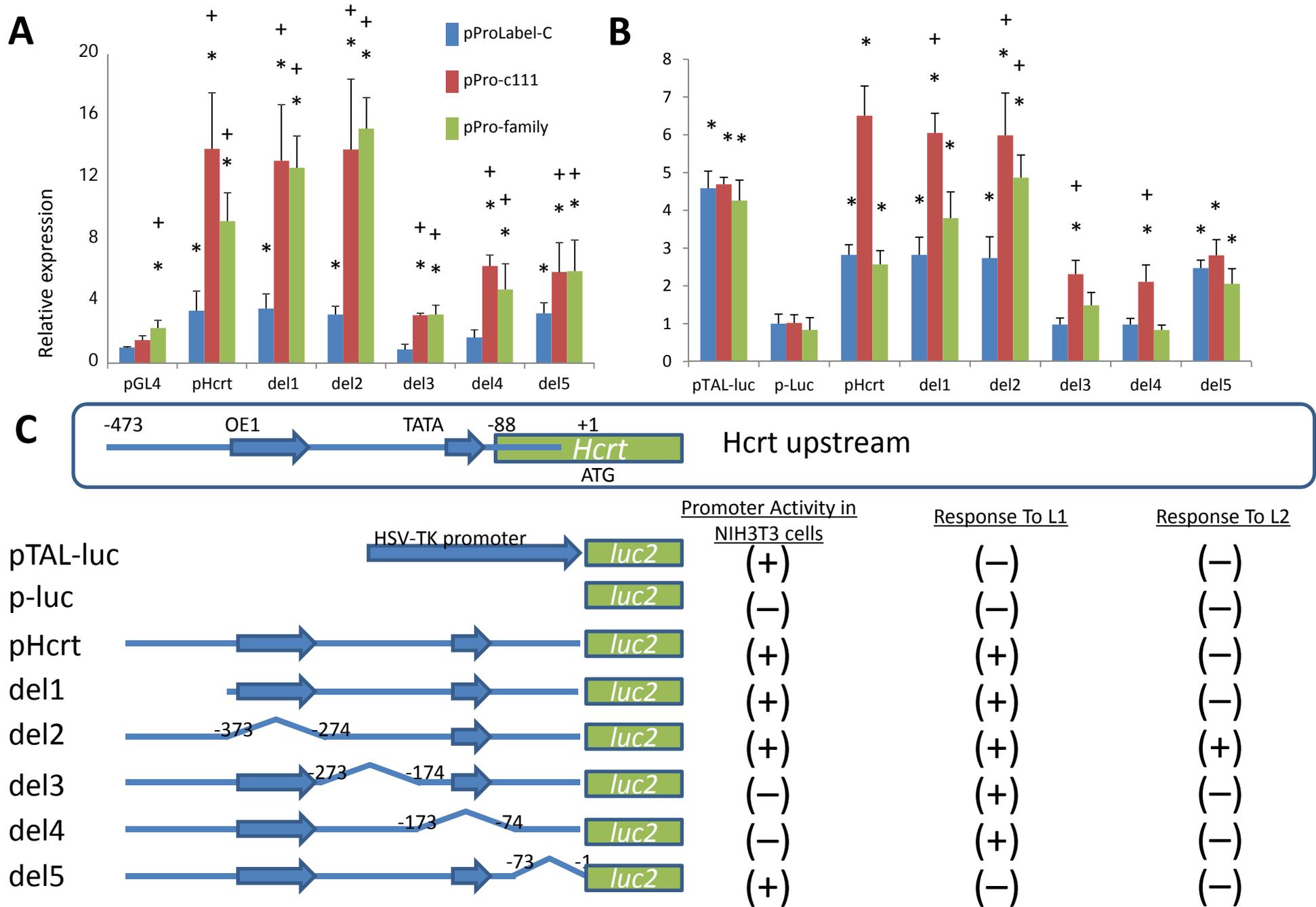


Figure4