

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791587

研究課題名（和文）

咬合を司る中枢神経系における抑制性シナプス情報伝達蛋白質の遺伝子発現制御機構

研究課題名（英文）

Studies on gene expression mechanism of inhibitory neurotransmitter in central nervous system that rules dental occlusion

研究代表者

村上 絢子（MURAKAMI AYAKO）

九州大学・歯学研究院・研究員

研究者番号：10432923

研究成果の概要：

脳での発現が顕著な、ヒト PRIP-1 の主な転写開始点を決定した。また転写活性化に必須、あるいは脳特異的な発現を促す領域を特定し、転写因子 MAZ の結合を確認した。この転写因子が PRIP-1 遺伝子の脳特異的な発現制御に関わることが示唆された。

PRIP-1 は、GABA_A 受容体を介した抑制性情報伝達機構の制御に関与しており、顎運動制御に関わる三叉神経中脳路核神経における GABA_A 受容体の機能と PRIP の関わりを、咬合を通して検討した。咬合不全マウスでは、自発運動量の低下、新奇物体への興味の減少、不安感増強などの変化が認められた。咬合不全が GABA_A 受容体機能の変化を介して高次脳機能に影響しうること、そこに PRIP も関与していることが実験的に示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007年度	1800000	0	1800000
2008年度	1500000	450000	1950000
年度			
年度			
年度			
総 計	3300000	450000	3750000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学／矯正・小児科系歯学

キーワード：抑制性情報伝達、遺伝子発現調節、咬合、PRIP

1. 研究開始当初の背景

当研究室では、細胞内情報伝達経路の一つであるイノシトールリン脂質情報伝達系において、新規の Ins(1,4,5)P₃ 結合蛋白質を見いだした。本分子は、phospholipase C-d (PLC-d) と類似のドメイン構造を持ちながら PLC の酵素活性は示さない。また後に、タイプ 2 ともいえる類似の分子が発見され、我々はこ

れらを PRIP (PLC-Related Catalytically Inactive Protein, PRIP-1 と PRIP-2) と名付けた。比較的普遍的な発現様式を示す PRIP-2 に対し、PRIP-1 は比較的脳特異的に発現していた。我々は、PRIP-1 が、抑制性シナプス情報伝達に重要な GABA_A 受容体に結合し受容体の細胞内輸送やクラスターリングを促進するといわれる GABARAP (GABA_A Receptor Associated Protein) に

結合することや、GABARAP の GABA_A 受容体 α -サブユニットへの結合において競合することなどを明らかにした。さらに PRIP-1 のノックアウトマウスを作製し、その解析の過程で、PRIP-1 ノックアウトマウスでベンゾジアゼピン系薬剤（ターゲットは GABA_A 受容体の α , γ サブユニット）の感受性に異常が生じていることなどを明らかにした。これらのことから、PRIP-1 は脳における抑制性シナプス情報伝達機構に重要な役割を担っている事が示唆される。PRIP-1 の組織特異的な遺伝子発現の制御機構の解明するということは、PRIP-1 の機能解明につながるだけでなく、抑制性シナプス構築の分子メカニズムの解明の一端も担うと考えられる。

咬合のもたらす機能は「食を味わう」「美味しく味わう」ひいては「生き甲斐」に至るまで様々な局面での人生の質（Quality of Life, QOL）の維持のためには重要である。さらに、咬合は精神構造を持つ「人の心」の健康にも重要であると言われているが、必ずしも科学的に実証されている訳ではない。細胞内情報伝達経路の一つであるイノシトールリン脂質情報伝達系において見いだされた PRIP-1（PLC-Related Catalytically Inactive Protein-1）は、脳に顕著に発現しており、GABA を介する抑制性シナプス情報伝達機構の制御に関わることが示唆されている。この情報伝達機構は、不眠、不安、緊張、けいれん、てんかん、記憶などの複雑な脳・精神機能を形成する分子基盤の重要な一角をなし、「人の心」の健康の維持に重要な働きをしている。この機構に欠かせない GABA_A 受容体は、顎運動の key ニューロンである三叉神経中脳路核ニューロンにおいても機能していることが報告されている。よって、本解析は、PRIP-1 の機能解明につながるだけでなく、記憶や行動といったメカニズム、「人の心の健康」への咬合の関与の解明にも寄与するものである。

2. 研究の目的

本研究は、組織特異的な発現様式を持つ PRIP-1（PLC-Related Catalytically Inactive Protein-1）遺伝子の、発現調節機構の解明を目的とする。

PRIP は、phospholipase C-d (PLC-d) と類似のドメイン構造を持ちながら PLC の酵素活性は示さない。比較的普遍的な発現様式を示す PRIP-2 に対し、PRIP-1 は比較的脳特異的に発現していた。PRIP-1 は、脳において GABA_A 受容体を介した情報伝達系の調節に関与していると考えられており、脳における抑制性情報伝達経路の調節に関わるという機能からも、この発現調節は重要であ

る。そこで PRIP-1 の組織特異的な遺伝子発現の制御機構の解明を目的として研究を行う。このことは PRIP-1 の機能解明につながるだけでなく、抑制性シナプス構築の分子メカニズムの解明の一端も担うと考えられる。PRIP 遺伝子については未解明な点が多いので、まず遺伝子構造や転写開始点等を明らかにした上で、制御機構について、特定の制御領域や転写因子の関与等、様々な要素を検討しつつ解析を進めていく。この脳特異的な発現機構を明らかにすることにより、咬合と脳機能の関連の解明へ展開することが可能である。咬合機能にストレスを与えた動物を用いて、行動解析を行うとともに咀嚼情報を司る三叉神経中脳路核における GABA_A 受容体や PRIP の発現量等を検討し、これらが関わる情報伝達機構と咬合との関連について検討する。

3. 研究の方法

（1）PRIP-1 および 2 遺伝子の転写開始点の決定

脳の mRNA を鋳型とし、5'RACE 法や primer extension 法で、ヒト或いはマウスの PRIP-1 及び PRIP-2 遺伝子の転写開始点を決定する。

（2）転写産物の検討

PRIP-1 を発現している組織或いは培養細胞の RNA を用いて、逆転写反応により cDNA を作製し、クローニングを行い、その全塩基配列を決定する。特に、ヒト PRIP-1 および 2 タンパク質の分子量は、マウス、ラットのそれとは異なると言われているので、選択的スプライシング等による複数の転写産物が存在する可能性などを検討する。

（3）プロモーター領域の決定

同定した転写開始点付近より上流の様々な長さの領域を、レポーター（ルシフェラーゼ）遺伝子上流に組み込んだコンストラクトを作製する。これらのコンストラクトを、PRIP-1 を発現している神経系の培養細胞（NB69、GH3、HEK293 など）及び発現が見られない培養細胞（HeLa、COS など）に形質導入してルシフェラーゼアッセイを行い、転写活性を比較する。転写活性化に必須、あるいは脳特異的な発現を促す領域を決定する。また、比較的ユビキタスに発現している PRIP-2 に関しても同様の実験を行い、両者の相違を比較することで脳特異的な領域の同定を行う。

(4) 種間で高度に保存されているゲノム DNA 領域の検討
エクソン以外の配列で相同性の高い領域は、エンハンサーやサイレンサーなど、発現調節に関わっている可能性が高いと考えられる。そこで、データベースや我々の行った塩基配列決定の結果から、ヒトとマウス、或いはラットの PRIP-1 および 2 の遺伝子配列を比較し、相同性の高い領域を見つける（遺伝子の上流、下流及びイントロン領域）。また、PRIP-1 遺伝子に特有な塩基配列は、神経特異的な発現制御に関わっている可能性があるため、プロモーター等の領域について PRIP-1 及び PRIP-2 遺伝子間で配列を比較する。

(5) 脳・神経系に特異的な発現制御領域の決定
プロモーターについては、すでにその領域を決定しているが、その他のエンハンサー等の調節領域については、得られた結果をもとに、組織特異的な発現に関わっていると思われる DNA 領域について、その転写調節に必要な領域を限定するために部分的な断片や欠失体を得る。それらをプロモーターとともにルシフェラーゼ遺伝子に連結したコンストラクトを作製し、神経系、及び非神経系培養細胞に形質導入してルシフェラーゼアッセイを行い、転写活性を比較検討する。

(6) 特異的な発現制御に関わる転写因子の検討
得られた制御領域及びプロモーター領域について、その塩基配列をもとに結合する転写因子をデータベース上に検索する。既知の転写因子が結合する場合には、細胞の核抽出物や転写因子の抗体を用いたゲルシフトアッセイ (EMSA) で、その領域への結合を確認する。未知の因子の可能性については、DNA binding assay によって結合因子を分離・抽出し、質量分析等を行い、新規の転写因子の同定に迫る。

(7) 咬合ストレスによる行動解析
マウスまたはラットに、長期に亘って咬合を必要としない粉のエサを与えたり、歯間に異物を挿入するなどして咬合ストレスを与え、咬合不全を引き起こした動物の行動学的解析（尾懸垂テスト、強制水泳テスト、運動量など）を行う。
咬合ストレスを受けたマウスにおける PRIP-1 等の発現

咬合ストレスを受けたマウスの脳より

RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて、PRIP-1 の発現量の変化を測定する。また、抑制性情報伝達機構に重要な GABA_A レセプターの各サブユニットの発現量についても同様に調べ、咬合と、抑制性情報伝達機構を含む脳機能との関連について検討する。

4. 研究成果

(1) 脳の mRNA を鋳型とし、5' RACE 法や primer extension 法を用いて、ヒトの PRIP-1 の主な転写開始点は、エクソン 1 の 3' 末端より 673 塩基上流の G 塩基であることを決定した。

(2) 5'RACE 法により、ヒト PRIP-1 遺伝子の 3 つの複数の転写産物の存在が見いだされた。RT-PCR 解析により、これらのうち、エクソン 2・3 を欠いた転写産物が主に発現していることを確認した。

(3) 同定した転写開始点付近より上流の様々な長さの領域を、PRIP-1 を発現している神経系の培養細胞 (NB69、GH3、HEK293 など) 及び発現が見られない培養細胞 (HeLa、COS など) に形質導入してルシフェラーゼアッセイを行い、転写活性を比較し、プロモーター領域を決定した。

(4) ヒトとマウスの PRIP-1 プロモーターの配列を比較したところ、78 % の相同性が認められた。マウスとラットのプロモーターでは、92% の相同性が認められた。

(5) 得られた PRIP-1 遺伝子の転写調節領域の中で、脳組織特異的な発現調節に必須の領域を限定するため、5' 上流領域の様々な長さのコンストラクトを作製し、神経系及び非神経系培養細胞に形質導入してルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、ヒト神経系培養細胞において -237 ~ -108 塩基対の欠失により転写活性が大きく減少した。

(6) -237 ~ -108 塩基対の領域における転写因子の結合を検討するために神経系培養細胞の核抽出物を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、転写因子 MAZ の結合配列を含んだプローブで結合が見られたので、更にコンペティションアッセイを行い、MAZ の結合を確認した。MAZ は、神経細胞の分化や再生に関与すると言われており、少なくともこの転写因子が PRIP-1 遺伝子の脳特異的な発現制御に関わることが示唆された。

(7) 脳での発現が顕著な PRIP-1 は、

GABA_A 受容体を介した抑制性情報伝達機構の制御に関与しており、顎運動制御に関わる三叉神経中脳路核神経における GABA_A 受容体の機能と PRIP の関わりを、咬合を通して検討した。咬合を必要としない粉末食餌のみを与えたマウスでは通常の食餌を与えたマウスに比べて、自発運動量の低下、新奇物体への興味の減少、不安感増強などの変化が認められた。また、高架式十字迷路試験において通常食餌群では顕著に抗不安効果の得られた量 (1 mg/kg) のジアゼパム (ベンゾジアゼピン系薬剤) を投与しても粉末食餌群では抗不安効果が得られなかった。すなわち長期の粉末食餌群における GABA_A 受容体機能の低下が示唆された。そこで、行動解析後のマウス的大脑皮質及び海馬から抽出した RNA を用いて定量的 RT-PCR を行ったところ、粉末食餌群において GABA_A 受容体の b1 及び b3 サブユニットで発現量に有意な増加を認めた。しかし、同条件で飼育した PRIP ノックアウトマウスでは、それらのサブユニットの発現量に食餌の違いによる差はなかった。また、PRIP1、2 の発現量においても、野生型マウスにおいて食餌の違いによる差は見られなかった。これらの結果から、咬合不全が GABA_A 受容体機能の変化を介して高次脳機能に影響しうることを、そこに PRIP も関与していることが実験的に示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

村上 絢子、梶山 啓次郎 反対咬合症例における乳歯列期と混合歯列期の顎顔面成長の比較検討 九州矯正学会誌 4 巻 83-90(2008)

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 絢子 (MURAKAMI AYAKO)

九州大学・歯学研究院・研究員

研究者番号：10432923

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：