

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700458

研究課題名(和文) 視床下部オレキシン転写制御因子の探索

研究課題名(英文) Identification of the transcription factors for hypothalamic orexin

研究代表者

田中 進 (TANAKA, Susumu)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主席研究員

研究者番号：30399472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：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制御因子を視床下部より同定しようと試みた。

オレキシン発現制御領域(OE1-113)への結合因子を複数同定し、発生期視床下部に発現するクローン111(c111)が得られた。OE1-113とc111との結合を確認した。in vitroでc111がオレキシンプロモーター活性を変化させた。成獣マウスにおけるc111がオレキシン神経細胞に共存していた。GWASによるナルコレプシーとの強い相関は得られていない。今後、c111ノックアウトを作成し、実際にオレキシン細胞数または転写量が変化していることを確認する必要がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to identify the transcription factors for hypothalamic orexin transcription.

By using One-hybrid system, we found some transcription factors binds to 113 sequence in orexin regulatory element 1. We found that one of positive clones, clone 111, expresses in embryonic lateral hypothalamus as well as orexin. Clone 111 moderates the activity of orexin upstream region in reporter assay. Clone 111 co-expresses in orexin neurons of adult hypothalamus. Clone 111 has no strong association with narcolepsy in genome wide association study.

Further studies using clone 111 knock-out mouse are needed to show the involvement of clone 111 against orexin transcription.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：オレキシン 睡眠 覚醒 転写

1. 研究開始当初の背景

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限局される。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。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。

2. 研究の目的

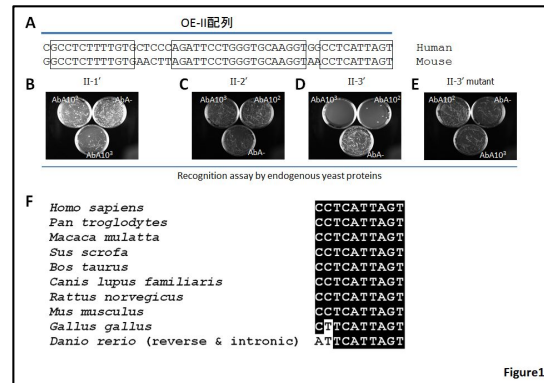
本研究では酵母 One-hybrid System を応用し、オレキシン OE1-II 領域へ結合する転写制御因子の同定を目指す。

3 & 4. 研究の方法と研究成果

< One-hybrid System による同定 >

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因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因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因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、酵母内因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。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)

Positive Clone ID	Number of positive clones		total	Ref.
	1 st (1.7x10 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/Osx
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

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。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。

< *in situ* hybridization >

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。シークエ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。

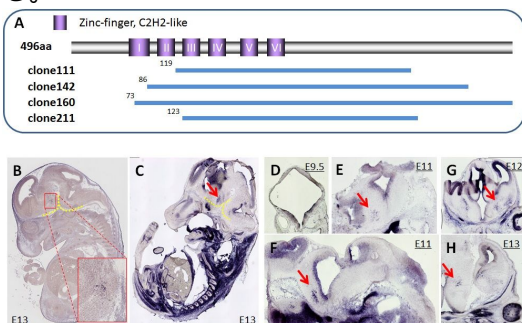


Figure2

< Protein-DNA binding assay >

実際に今回同定した c111 遺伝子が II-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 II-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、II-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。

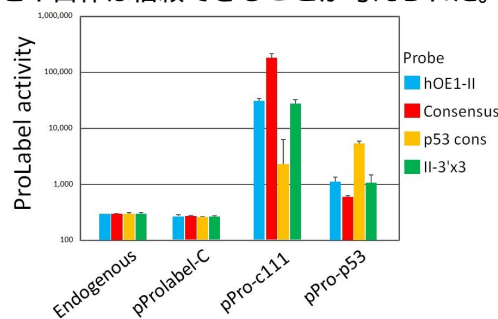


Figure3

< レポーターアッセイ >

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ある。

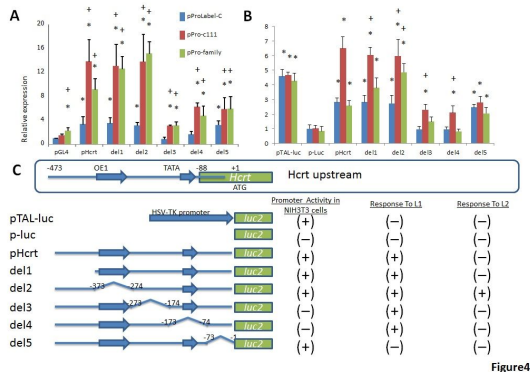


Figure4

そこで c111 結合部位特異的に変異を導入し検討した。結果、9bp の c111 コンセンサス配列のうち 4 番目から 6 番目の配列を別の塩基に置換することにより転写活性の変化が観察された (Figure5)。

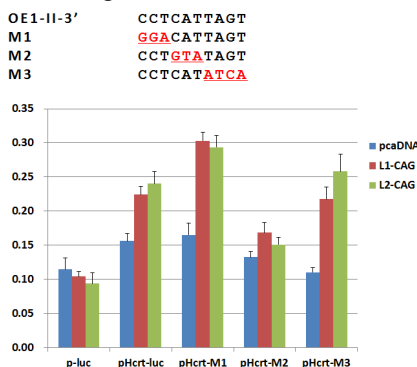


Figure5

< 子宮内電気穿孔法 >

子宮内電気穿孔法による胎生 11 日目の第 3 脳室へのインジェクションにより視床下部への c111 強制発現を試みたが、現在の所成功していない。異所性発現による効果を検討する意味で胎生 13 日目の側脳室へのインジェクションを行い、大脳皮質での c111 発現を確認し

た。しかしながら、この際の大脳皮質でのオレキシン発現は確認できていない。

< 成獣オレキシン神経における発現 >

成獣マウスにおける c111 発現を検討し、オレキシン神経細胞に共存していることを確認した。視床下部においては弓状核においても c111 は発現していた。そこで、睡眠覚醒への関与と摂食への関与を検討したが、それらの条件による c111 陽性細胞数の変化や細胞内局在は観察されていない。

< GWAS >

今回同定した c111 およびそのスーパーファミリー、ならびにその他の制御候補に関してオレキシンが原因となるナルコレプシーへの関与を検討した。GWAS により遺伝子領域 ±200KB 内の SNP を検討した。一番低い P 値が 1E-03 オーダーで、遺伝子領域内の SNP も存在したが強い関連とは言えず、ナルコレプシーの原因にはオレキシンの転写制御異常が関与することを肯定する結果は得られなかった。

今後、c111 ノックアウトを作成し、実際にオレキシン細胞数または転写量が変化していることを確認する必要がある。

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 5 件)

1. Katzav A, Arango MT, Kivity S, Tanaka S, Givaty G, Agmon-Levin N, Honda M, Anaya JM, Chapman J, Shoenfeld Y. Passive transfer of narcolepsy: Anti-TRIB2 autoantibody positive patient IgG causes hypothalamic orexin neuron loss and sleep attacks in mice. **J Autoimmun** 45:24-30. (2013) < 査読有 >
2. Taniya T, Tanaka S, Yamaguchi-Kabata Y, Hanaoka H, Yamasaki C, Maekawa H, Barrero RA, Lenhard B, Datta MW, Shimoyama M, Bumgarner R, Chakraborty R, Hopkinson I, Jia L, Hide W, Auffray C, Minoshima S, Imanishi T, Gojobori T. A prioritization analysis of disease association by data-mining of functional annotation of human genes. **Genomics** 99(1):1-9. (2012) < 査読有 >
3. Tanaka S. (2012) Transcriptional regulation of hypocretin/orexin gene. **Vitam Horm** (Sleep Hormones) 89: 75-90. < 査読無 >
4. Miyagawa T, Miyadera H, Tanaka S, Kawashima M, Shimada M, Honda Y, Tokunaga K, Honda M. Abnormally low serum acylcarnitine levels in narcolepsy

patients. **Sleep** 34(3):349-53A. (2011) < 査読有 >

5. **Tanaka S.** (2011) Are narcolepsy and idiopathic hypersomnia associated with abnormalities in IgG? **Best of Sleep Medicine 2011** 49-51. < 査読無 >

[学会発表](計 17件)

1. **Tanaka S.**, Honda Y, Kodama T. Involvement of *insomniac* homolog in mammalian sleep regulation. 第36回日本分子生物学会年会、神戸 [2013.12.05]
2. **Tanaka S.**, Honda Y, Honda K, Kodama T. Involvement of *insomniac* homolog in mammalian sleep homeostasis. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto [2013.06.25]
3. **Tanaka S.**, Honda Y, Honda K, Kodama T. *insomniac* 相同遺伝子による哺乳類睡眠制御. Neuro2013, 京都 [2013.6.20]
4. **Tanaka S.**, Yamazaki K, Sunakawa A, Honda Y, Honda K, Kodama T. Involvement of Ub-proteasome pathway in mammalian sleep regulation. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡 [2012.12.13]
5. **Tanaka S.**, Yamazaki K, Sunakawa A, Honda Y, Kodama T. Involvement of protein degradation pathways in mammalian sleep. The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry/ 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Kobe [2012.10.1]
6. Koshihara M, Yui K, **Tanaka S.**, Kodama T, Aoki I, Yamanouchi H, Nakamura S. Neuromolecular analysis of attachment disorder based on quantitative behavioral analysis. 第35回日本神経科学大会, 名古屋 [2012.9.20]
7. KODAMA T, **Tanaka S.**, Honda Y, Honda K, Honda M. Orexin changes in experimentally immunized rats by TRIB2. ヨーロッパ睡眠学会第21回定期学術集会, Paris [2012.9.7]
8. **田中進**, 児玉亨, 本多芳子, 本多和樹, 本多真. 免疫操作によるオレキシンの変化 第37回日本睡眠学会, 横浜 [2012.6.29]
9. **田中進**. オレキシンの免疫 第37回日本睡眠学会, 横浜[2012.6.28] 招待講演
10. **Tanaka S.**, Yamazaki K, Honda Y, Kodama T. Involvement of protein degradation pathways in mammalian sleep regulation. *Frontiers in Behavioral Brain Science ~Solving the mystery of sleep~, Tokyo* [2012.3.19]
11. **Tanaka S.**, Kodama T, Honda Y, Usui S, Mizuno K, Honda M. Orexin changes in experimentally immunized rats by TRIB2. *Worldsleep2011*, Kyoto [2011.10.19]

12. **Tanaka S.**, Honda M, Kodama T, Mignot E. NR6A1 regulates hypocretin/orexin transcription. *Worldsleep2011*, Kyoto [2011.10.19]
13. 本多真, **田中進**, 児玉亨. Immunological alteration in narcolepsy – possible contribution to the deficit of orexin. 第36回日本睡眠学会, 京都 [2011.10.18]
14. **Tanaka S.**, Kodama T, Honda M, Mignot E. NR6A1 regulates hypocretin/orexin transcription. 第36回日本睡眠学会, 京都[2011.10.15]
15. 本多真, 宮川卓, **田中進**. ナルコレプシー患者のQOL 国際生活機能分類による評価試行. 第36回日本睡眠学会, 京都[2011.10.15]
16. **田中進**. IgG abnormality in narcolepsy and idiopathic hypersomnia. **日本睡眠学会第16回研究奨励賞受賞講演** 第36回日本睡眠学会, 京都 [2011.10.15] 招待講演
17. **田中進**, 本多芳子, 本多真, 児玉亨. オレキシン発現制御領域結合因子の同定. 第54回日本神経化学学会大会, 加賀 [2011.9.27]

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 進 (TANAKA, Susumu)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主席研究員

研究者番号：30399472