

様式(8)

論 文 内 容 要 旨

題目 IDENTIFICATION OF TWO PROMOTERS FOR HUMAN D-AMINO ACID
OXIDASE GENE: IMPLICATION FOR THE DIFFERENTIAL PROMOTER
REGULATION MEDIATED BY PAX5/PAX2

(ヒト D-アミノ酸酸化酵素遺伝子の 2 つのプロモーター領域の同定：
PAX5/PAX2 が作動するプロモーターの使い分けによる調節について)

著者 Diem Hong Tran, Yuji Shishido, Seong Pil Chung, Huong Thi
Thanh Trinh, Kazuko Yorita, Takashi Sakai, Kiyoshi Fukui
平成 27 年発行 The Journal of Biochemistry に掲載予定

内容要旨

D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) は、D-アミノ酸の酸化を担うフラビン酵素であり基質アミノ酸の酸化によりイミノ酸および過酸化水素を生成する。DAOの生理的意義としてN-メチル-D-アスパラギン酸受容体 (NMDA受容体) のコアゴニストとして作用するD-セリンの分解活性が想定されており、D-セリンレベルの低下によるNMDA受容体の機能低下は統合失調症との関連が示唆されている。また、DAOによる過酸化水素生成能は、抗神経膠腫効果の一助となることから臨床的にもその応用が期待される酵素である。しかしながら、本酵素遺伝子発現の調節機構はまだ明らかにされていない。

そこで、我々はヒトDAO (hDAO) 遺伝子発現の調節機構を調べるために、そのプロモーター領域と転写調節因子の同定を試みた。ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを用いてhDAOプロモーター活性を調べたところ、エクソン1上流直近の領域 (-237/+1, P1) にプロモーター活性がある事が示された。さらに、エクソン2の上流直近の領域 (+4126/+4929, P2) にもプロモーター活性を有する領域を同定した。後者のプロモーターには、P1より強い活性が認められた。また、イントロン1で負の調節を行う領域 (+1163/+1940) の存在を明らかにした。バイオインフォマティクス的手法により、転写因子PAX5ファミリーの結合領域の存在を明らかとし、その解析を行った。その結果、PAX5ファミリー結合領域はそれぞれ (-60/-31) と (+4464/+4493) に位置しており、hDAOのP1とP2内に存在していた。ゲルシフトアッセイにより、PAX5の結合部位 (-60/-31) はP1内にある事が明らかとなり、一方、P2にはPAX2

とPAX5の両方が結合する3つの結合部位が存在した。部位特異的な突然変異導入に基づく実験により、PAX5ファミリーがP1のプロモーター活性は負に調節し、P2のプロモーター活性を正に調節して、hDA0遺伝子の転写調節を担うことが示唆された。以上から、PAX2とPAX5の結合によって別々に調節される2つのプロモーターによるhDA0の遺伝子発現調節の可能性が示唆された。

本報告は、ヒトDA0遺伝子の発現調節に関する初めての研究成果であり、ヒトDA0遺伝子の転写因子としてPAX2とPAX5を同定し、それらが作用する2つのプロモーター領域の同定を行った。その結果、PAX2及びPAX5が関与する2つのプロモーターの使い分けによってヒトDA0遺伝子発現が調節されることが示唆された。本研究はヒトDA0遺伝子発現に関与する転写調節機構の理解に貢献するとともに、本酵素の病態生理学的意義の解明に資する成果と考えられる。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第1229号	氏名	Tran Hong Diem
審査委員	主査	坂口 未廣	
	副査	野間 隆文	
	副査	立花 誠	

題目 IDENTIFICATION OF TWO PROMOTERS FOR HUMAN D-AMINO ACID OXIDASE GENE: IMPLICATION FOR THE DIFFERENTIAL PROMOTER REGULATION MEDIATED BY PAX5/PAX2
(ヒト D-アミノ酸酸化酵素遺伝子の2つのプロモーター領域の同定: PAX5/PAX2 が作動するプロモーターの使い分けによる調節について)

著者 Diem Hong Tran, Yuji Shishido, Seong Pil Chung, Huong Thi Thanh Trinh, Kazuko Yorita, Takashi Sakai, Kiyoshi Fukui
平成27年発行 The Journal of Biochemistry に掲載予定
(主任教授 福井 清)

要旨 D-アミノ酸酸化酵素(DAO)は、中枢神経系においてN-メチル-D-アスパラギン酸受容体(NMDA受容体)のコアゴニストとして作用するD-セリンの代謝分解を介してNMDA受容体の機能調節に関与し、統合失調症を含む精神神経疾患の病態と関連する事が示唆されている。また、腎臓においては近位尿細管細胞に発現が認められ、この部位における腎機能の指標となり得る酵素タンパク質であるが、その病態生理学的意義の解明に重要な遺伝子発現の調節機構については明らかとなっていない。

申請者は、ヒトDAO遺伝子の発現調節機構を調べるために、そのプロモーター領域と転写調節因子の同定を行った。得られた結果は以下の如くである。

1. レポーター遺伝子を伴ったヒトDAOプロモーター領域をDAO高発現培養細胞へ導入し解析する事により、エクソン1上流直近

の領域 (-237/+1, P1) と、エクソン2の上流直近の領域 (+4126/+4929, P2) にそれぞれ単独で機能し得る2つのプロモーター活性を有する領域を同定した。

2. 2つのプロモーターには活性の違いがある事を明らかにし、後者のP2には、P1より強い活性がある事を示した。さらに、イントロン1に負の調節を行う領域 (+1163/+1940) の存在を明らかにした。
3. バイオインフォマティクス的手法により、転写因子PAX5ファミリーの結合領域の存在を明らかにした。PAX5ファミリー結合領域はそれぞれ (-60/-31) と (+4464/+4493) に位置しており、PAX5の結合部位 (-60/-31) はP1内に、PAX2/PAX5の結合部位 (+4464/+4493) はP2内にある事を示した。
4. 部位特異的な突然変異導入に基づく実験により、PAX5ファミリーがP1のプロモーター活性は負に調節し、一方、P2のプロモーター活性は正に調節して、ヒトDA0遺伝子の転写調節を担うことが示唆された。

本報告は、ヒトDA0遺伝子の発現調節に関する初めての研究成果であり、ヒトDA0遺伝子の転写因子としてPAX2とPAX5を同定し、それらが作用する2つのプロモーター領域の同定を行っている。その結果、PAX2及びPAX5が関与する2つのプロモーターの使い分けによってヒトDA0遺伝子発現が調節される可能性が示唆された。

本研究は、ヒトDA0遺伝子発現に関与する転写調節機構の理解に貢献するとともに、本酵素の病態生理学的意義の解明に資すると考えられる知見であり、学位授与に値すると判定した。