

氏名	大山 和美
学位	博士
専門分野の名称	学術
学位授与番号	博乙第4416号
学位授与の日付	平成26年3月25日
学位論文題目	ニコチンはカテコールアミントランスポーター遺伝子の発現を制御する
学位論文審査委員	杉本 朋貞 教授 宮脇 卓也 教授 十川 紀夫 准教授

学位論文内容の要旨

ニコチンは、中枢神経系ならび末梢神経系において、ドパミンおよびノルアドレナリン神経活動を修飾することによりさまざまな薬理作用を発揮している。

しかし、これらの神経活動を調節する鍵となるドパミントランスポーター(DAT)、およびノルアドレナリントランスポーター(NET)に対する作用については、これまでほとんど研究がなされていない。そこで今回われわれは、DAT およびNET 発現に対するニコチンの影響を、内因性DAT/NET を発現する培養細胞、および遺伝子導入によるレポーターアッセイにて検討した。

レポーターアッセイでは、ヒトDAT およびNET 遺伝子を含むBAC クローンよりプロモーター領域を含む5' 領域を切り出し、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとする発現プラスミドに挿入した。さらに、これらを元に段階的な5' 領域欠損コンストラクトを作製、種々の培養細胞に一過性に導入してその転写活性を計測した。トランスポーターmRNA 発現はRT-PCR 法あるいはリアルタイムRT-PCR 法により、蛋白質発現はウエスタンブロット法により検討した。

その結果、ニコチンは、0.1-100 μ M の範囲でSK-N-SH 細胞におけるDAT 転写活性を増加させた。また、その作用は神経性ニコチン性アセチルコリン(NN)受容体アンタゴニストであるヘキサメトニウムで遮断された。一方、ニコチンはNET 転写活性には影響しなかったが、ニコチン受容体を発現するSK-N-SH 細胞においてNETmRNA 並びに蛋白発現を減少させた。

以上より、ニコチンはNN 受容体を介してDAT を転写レベルで調節しているが、NET は転写後調節により制御していることが示唆された。

学位論文審査結果の要旨

中枢神経系および末梢神経系において、ニコチンはカテコールアミン神経活動を修飾することによりさまざまな薬理作用を発揮している。しかし、これらの神経活動を調節する鍵となるドパミントランスポーター(DAT)、およびノルアドレナリントランスポーター(NET)については、ニコチンによる遺伝子発現制御機構の詳細は未だ明らかになっていない。

そこで本研究は、カテコールアミントランスポーター遺伝子発現に対するニコチンの作用を明らかにすることを目的として、レポーターアッセイにより DAT および NET 遺伝子転写活性に対するニコチンの影響を解析している。

研究では、プロモーター領域を含むヒト DAT および NET 遺伝子の 5' 領域を段階的に欠損したレポーターコンストラクトを作製し、種々の培養細胞に一過性に導入して、その転写活性を測定する方法が用いられている。また、RT-PCR あるいはリアルタイム RT-PCR 法、およびウエスタンブロット法により、トランスポーター mRNA 発現と蛋白質発現が検討されている。

その結果、ニコチンは神経細胞由来細胞 SK-N-SH において DAT 転写活性を増強し、その効果は神経性ニコチン性アセチルコリン (N_A) 受容体アンタゴニストであるヘキサメトニウムで遮断された。このニコチンの転写活性増強作用は pD5.7 コンストラクトで著明に認められた。一方、ニコチンは NET 転写活性には影響しなかったが、ニコチン受容体を発現する SK-N-SH 細胞において NET mRNA 並びに蛋白発現を減少させた。

以上の結果は、ニコチンが、 N_A 受容体を介して DAT を転写レベルで調節し、NET を転写後調節により制御することを示すとともに、DAT 遺伝子転写開始部位より上流 1.0kb から 3.5kb に新規のニコチン応答配列が存在することを示唆している。これらの知見は、ニコチンの薬理作用に拮抗する新たな創薬標的の発見に繋がる重要な知見を提示したものと評価できる。

よって、審査委員会は本論文に博士(学術)の学位論文としての価値を認める。