

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title         | 脳虚血に伴う GTP 結合蛋白質の変化                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Author(s)     | 森田, 仁                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Citation      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Issue Date    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| oaire:version |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| URL           | <a href="https://hdl.handle.net/11094/38003">https://hdl.handle.net/11094/38003</a>                                                                                                                                                                                                                                |
| rights        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Note          | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

|            |                                              |
|------------|----------------------------------------------|
| 氏名         | もり 森 田 ひとし 仁                                 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (医学)                                      |
| 学位記番号      | 第 10193 号                                    |
| 学位授与年月日    | 平成 4 年 3 月 25 日                              |
| 学位授与の要件    | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>医学研究科 内科系専攻              |
| 学位論文名      | 脳虚血に伴う GTP 結合蛋白質の変化                          |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 西村 健<br>(副査)<br>教授 三木 直正 教授 祖父江憲治 |

### 論文内容の要旨

#### (目 的)

これまでに、脳虚血により早期から神経細胞内での  $Ca^{2+}$  イオンの上昇や、アラキドン酸を含む遊離脂肪酸の増加、さらにイノシトールリン脂質代謝を発端とする細胞内情報転換系反応の活性化に伴い、ジアシルグリセロールの増加等が知られている。これらの細胞内情報伝達物質は、受容体にアゴニストが結合するとエフェクターによって生成される。

そこで、本研究では、細胞内情報伝達系 [受容体-GTP 結合 (G) 蛋白質-エフェクター] の構成要素の 1 つである G 蛋白質、特に百日咳毒素 (IAP) 感受性 G 蛋白質に対する一過性脳虚血の影響を、生化学的、薬理的、免疫化学的方法を用いて検討した。

#### (方 法)

(1) 脳膜分画の調製：砂ネズミの両側総頸動脈を10分間血流遮断し、血流再開後、0分、1、4、8時間、及び1、2、7日目に断頭し、脳摘出後、前頭葉皮質、海馬の膜分画 (P2分画) を調製した。

(2) IAP 感受性 G 蛋白質の測定

(a) IAP による ADP-ribosylation 量の測定：前頭葉皮質、海馬の膜分画 ( $20 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ) を、 $1 \text{ mM ATP}$ 、 $10 \text{ mM thymidine}$ 、 $2 \text{ mM MgCl}_2$  を含む triethanolamine-HCl buffer ( $50 \text{ mM}$ 、 $\text{pH}7.4$ ) 中で、 $1 \mu\text{M } ^{32}\text{P-NAD}$ 、IAP ( $2 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ) と  $25^\circ\text{C}$ 、90分間、反応させ、反応停止後、Laemmli の sample buffer に懸濁後、SDS-PAGE を行い、オートラジオグラフィにて得た  $39\text{-}41\text{kD}$  のバンドの吸光度を、デンストメーターにて測定し、IAP による ADP-ribosylation 量を観察した。

(b) イムノブロッティング法:  $Go\alpha$  に対するポリクローナル抗体を用いて, G蛋白質の量的変動を観察した。

(c) 免疫組織化学的研究:  $Go\alpha$  に対するポリクローナル抗体と, 固定脳組織切片 ( $20\mu m$ ) を浮遊法にて反応させ, ABC法にて染色した。

#### (成績)

IAPによるADP-ribosylation反応は, 反応時間90-120分にて, ほぼ飽和に達し, 本実験条件下での膜分画におけるG蛋白質のADP-ribosylation量を示すと考えられる。

次に, 虚血処置によるADP-ribosylation量の変化をみると, IAPによるADP-ribosylation量は対照群と比較して, 虚血処置群では時間の経過と共に, 前頭葉皮質, 海馬の両者で減少した。7日目におけるADP-ribosylation量(% of control,  $N=8$ , mean  $\pm$  SEM)は, 前頭葉皮質では $57.5\pm 4.9$ , 海馬では $48.4\pm 6.7$ であった。また, 海馬に比べて前頭葉皮質では, より早期から大きな減少が認められた。

また,  $MgCl_2$  10mM存在下,  $GTP\gamma S$  ( $0.01-10\mu M$ ) 添加によるADP-ribosylation量に対する抑制効果は, 前頭葉皮質と海馬の両者とも, 対照群と虚血群(2日目)において著明な差は認められなかった。

さらに, イムノブロッティング法においても前頭葉皮質と海馬において対照群と虚血群(2日目)で,  $Go\alpha$ 蛋白質のバンドに明かな変化はみられなかった。 $Go\alpha$ に対するポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的観察においても, 前頭葉皮質及び, 海馬では, 対照群と虚血群(2日目)の間に,  $Go\alpha$ 蛋白質様免疫陽性構造に差がみられなかった。

#### (総括)

砂ネズミ脳において, 一過性脳虚血処置により,  $Go$ 蛋白質の $\alpha$ サブユニットの量的変動を伴わないIAP感受性G蛋白質のADP-ribosylation量の減少が生じた。しかし,  $MgCl_2$  10mM存在下,  $GTP\gamma S$  ( $0.01-10\mu M$ ) 添加によるADP-ribosylation制御効果には, 差が認められなかった。このIAP感受性G蛋白質の変動の理由として, 以下の可能性が考えられる。

- (1) G蛋白質の $\alpha$ サブユニットと $\beta\gamma$ サブユニットの解離が促進された。
- (2) G蛋白質の三量体構造のコンフォメーションの変化が生じた。
- (3) 内在性ADP-リボシルトランスフェラーゼの活性化が起こり, 内在的反応が進行した。

以上の成績から, 一過性脳虚血処置により, IAP感受性G蛋白質(39-41kD)に,  $Go$ 蛋白質の $\alpha$ サブユニットの量的変動を伴わない変化が生じている可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

脳虚血により, 神経細胞内でのセカンドメッセンジャーの増加が知られているが, その機序に関しては, 不明な点も多い。本研究は虚血処理を施した砂ネズミ脳を用いて, 細胞内情報伝達系の構成要素の

一つである GTP 結合 (G) 蛋白質の質的量的変動を解明しようとしたものである。

まず、虚血砂ネズミ脳においては、G 蛋白質の百日咳毒素による ADP-ribosylation 量の減少が生じている事を明らかにした。これは GTP  $\gamma$ S による ADP-ribosylation 量の抑制効果に影響を与えないものであった。さらに Go $\alpha$  蛋白質に対する抗体を用いて、イムノブロットィング、免疫組織化学を行い、虚血脳の Go $\alpha$  蛋白質の量的変動は生じていない事を示した。

以上の成績は、セカンドメッセンジャーを介する神経細胞障害に、G 蛋白質の変化が関与している事を示唆するものであり、脳虚血病態の解明に手掛かりを与えた点で意義が大である。