

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Neuronal apoptosis triggered by NGF-deprivation or puromycin-addition   |
| Author(s)    | 杉田, 美成子   |
| Citation     | 大阪大学, 1996, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/39970">https://hdl.handle.net/11094/39970</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">〈a href="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">〈/a〉</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           | 杉 田 美 成 子  |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (理 学)  |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 2 6 9 2 号  |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 8 年 9 月 30 日   |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>理学研究科 生理学専攻  |
| 学 位 論 文 名     | Neuronal apoptosis triggered by NGF-deprivation or puromycin-addition<br>(NGF 除去あるいはピューロマイシン添加によって誘導される神経細胞死の解析) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 中西 康夫<br>(副査)<br>教 授 徳永 史生 教 授 辻本 賀英 助教授 米崎 哲朗   |

## 論 文 内 容 の 要 旨

高等動物の神経発生では、適切な神経結合を形成できなかった神経細胞には細胞死が誘導される（予定神経細胞死）。これは、正しい標的細胞と機能的な神経結合を形成できた場合にのみ、生存に必須の因子、神経栄養因子が供給されるからである。従って予定神経細胞死は、正確な神経回路網の構築を保證するための重要な機構であるが、その分子レベルの解析はほとんど進んでいなかった。

本研究では予定神経細胞死の誘導機構を理解するために、ニワトリ胚より交感神経細胞の純培養系を確立した。交感神経は栄養因子である NGF (nerve growth factor) を培地から除去すると、DNA の断片化・トランスグルタミナーゼの活性化等、予定細胞死に特徴的な変化を経て細胞死に至った。この細胞死は、NGF 除去と同時に様々の転写・翻訳阻害剤を投与することで抑制されたので、ある種の遺伝子（自殺遺伝子）発現を必要とする積極的な細胞死（自殺）であると考えられた。

NGF 除去後、細胞の翻訳活性は大幅に低下する。転写阻害剤を用いた解析により、自殺遺伝子群は翻訳活性が低下し始めた時期に転写されたことが示唆された。驚くべきことに、アミノアシル tRNA のアナログであるピューロマイシンを用いて細胞の翻訳活性を阻害した場合にも、同様の細胞死が誘導された。この細胞死も各種転写・翻訳阻害剤の投与によって抑制されることから、ある種の遺伝子発現が誘導された結果であると考えられた。その他様々な共通点から、ピューロマイシンは NGF 除去と同様に、予定神経細胞死と同じ機構を活性化することで、神経細胞死を誘導すると考えられた。

ピューロマイシンによる細胞死は神経細胞特異的で、大脳皮質や知覚神経細胞においても、遺伝子発現に依存した細胞死が誘導された。そこで mRNA differentially display 法を適用することで、細胞死に向かった後に特異的に転写される遺伝子の同定を試みた。その結果、交感・知覚・大脳皮質の 3 種類の神経細胞において、NGF 除去・ピューロマイシン添加後共通に転写が誘導される遺伝子を 4 種、交感・知覚神経細胞においてのみ誘導される遺伝子を 1 種同定することに成功した。ホモロジー検索の結果、前者 4 種のうちの 1 種は hsp70 (熱ショック蛋白) 遺伝子で、他の 3 種は新規遺伝子であることが判った（残り 1 種については塩基配列がまだ未決定である）。

ピューロマイシンを取り込んだペプチド鎖は伸長途上であつてもリボソームから解離し、またリボソームもサブユニットに解離する。この反応はペプチジル基転移反応阻害剤によって阻止されるが、転移反応に続くペプチジル tRNA 転座反応の阻害剤ではもはや阻害されないことが知られていた。これまでの解析により、転移反応阻害剤で処理した細胞では、NGF 除去・ピューロマイシン投与後も、自殺遺伝子の mRNA が蓄積しないことを示唆する結果を得ていた。そこでこの可能性を検証するために、種々の翻訳阻害剤存在下で NGF 除去・ピューロマイシン投与した細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法により、先述の 4 種の遺伝子の転写量を解析してみた。すると、ペプチジル基転移反応阻害剤処理した細胞では、hsp70 を除く 3 種の遺伝子の mRNA がいずれも検出されなかった。

このことは、ペプチジル基転移反応を阻害することによって、少なくとも本研究で同定された 3 種の遺伝子、即ち、神経細胞死特異的な遺伝子の転写が阻害されたことを示している。NGF 除去後、細胞の翻訳系に生じる変化については全く解析されていなかったが、本研究で初めて細胞のリボソーム分画が解析され、NGF 除去またはピューロマイシンを投与された細胞では、ポリソームの分解・リボソームのサブユニットへの解離が進んでいることが示された。また、hsp70 遺伝子の誘導は、不完全長の（異常な立体構造の）ペプチド鎖や、異常な立体構造の翻訳複合体の生成・蓄積を推測させるものである。よって、NGF 除去後神経細胞の翻訳系にはピューロマイシンの作用と類似の変化が生じる可能性が強く示唆された。さらに RT-PCR 法の結果より、自殺遺伝子の転写誘導は、翻訳系に生じるそのような変化によって制御されていることが支持された。

原核生物では、翻訳装置のリボソームが細胞内環境に応答して、特定の遺伝子群の転写を誘導・抑制するシグナルを産生することが知られている。本解析により、神経細胞死をもたらす自殺遺伝子の転写は、翻訳系に生じる特異的な変化が原因で誘導される可能性が強く考えられた。これは細胞死誘導に関する全く新しい概念であると同時に、真核生物においても翻訳系を介した遺伝子発現制御機構が存在することを示す最初の報告になるものと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

動物発生過程にみられる神経細胞死は神経ネットワーク形成に決定的な役割をもつことが知られている。この予定細胞死は、神経栄養因子の競合に起因する神経ネットワーク形成に漏れた神経細胞が運命を大きく変更し、アポトシス（自殺）へと向かう生物学的に極めて興味ある現象である。

本研究は神経細胞死を誘導する仕組みを詳細に解析するため、新たな神経細胞培養系を確立し、細胞レベル、分子レベルでの解析を行なった。その結果、アポトシスは特異的な遺伝子発現を伴うことを明らかにし、実際に発現する 5 種の遺伝子を見つけた。また、これ以外にも該当する遺伝子の候補を多数得た。これらの遺伝子発現は神経細胞運命の変更に重要な意味をもつと考えられる。さらに本研究は、これら新たな遺伝子発現が誘導される仕組みについて遺伝情報翻訳に中心的機能をもつリボソームが重要な役割を果たすことを強く示唆する結果を得た。細胞分化の問題を含めても、細胞の運命を変更させる遺伝情報発現機構について翻訳系の介在を指摘する説はこれが最初である。

以上のように、本研究は神経細胞死誘導の仕組みを今後実体的に解明するための道を開いたものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。