

Title	Nerve Injury Enhances Rat Neuronal Glutamate Transporter Expression : Identification by Differential Display PCR
Author(s)	瀬尾, 寿美子
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40732
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【2】

氏名	瀬尾 寿美子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13675 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Nerve Injury Enhances Rat Neuronal Glutamate Transporter Expression : Identification by Differential Display PCR (differential display 法による神経再生関連遺伝子としてのニューロン型グルタミン酸トランスポーターのクローニング)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌 (副査) 教授 越智 隆弘 教授 三木 直正

論文内容の要旨

【目的】

損傷を受けた末梢運動神経は、軸索を伸展させ標的器官に達し再生を行うことが出来る。成熟した神経細胞でこのようなダイナミックな現象が作動するには、傷害神経細胞内で様々な分子群の再構築が行われているはずである。しかし、神経再生の分野では分子レベルでの研究は極めて少なくその報告も限られている。そこで、我々は再生過程における末梢運動神経細胞内で発現が変動している遺伝子群を一挙に検出し、そこから得られた情報をもとに神経再生の分子メカニズムを明らかとすることを目指した。

【方法ならびに成績】

損傷運動神経細胞内での既知あるいは未知分子の転写レベルでの変動を効率よく同定するために differential display 法を行った。本方法は異なる細胞集団の mRNA を RT-PCR にて増幅しその産物をゲル上に展開することにより、各集団間での mRNA 発現量の相違を可視化するシステムである。我々は100匹程度の片側舌下神経損傷ラットを作成し、神経損傷後7日目に断頭、健常側と傷害側の舌下神経核を回収した。それぞれのサンプルより抽出した total RNA を逆転写し、何種類ものプライマーセットによる PCR を行った。その後ゲル上に展開した PCR 産物のパターンを比較することにより神経再生時に発現上昇する遺伝子断片を検出することができた。また並行して、得られた遺伝子断片をプローブとした in situ hybridization 法を行うことにより効率よく擬陽性クローンを排除した。その結果いくつもの候補クローンを得ることができ、そのうち1クローンについて rat brain cDNA library をスクリーニングしたところ約3.7Kbのクローンを単離する事ができた。塩基配列決定後、ホモロジー検索したところ本遺伝子は rabbit より単離された電位依存神経細胞型グルタミン酸トランスポーター、EAAC1 と高い相同性を示す事が明らかとなった。グルタミン酸トランスポーターは細胞外のグルタミン酸を濃度勾配に逆らって細胞内に取り込むという働きを担うことから、本分子は神経損傷後細胞外の過剰なグルタミン酸による毒性から脆弱な神経細胞を守っている可能性が示唆された。加えて、末梢神経切断後再生することができず死へと至る幼若ラットの傷害運動神経細胞においては、本分子の発現上昇は観察されないことも明らかとなった。また、別の differential display により得られた遺伝子断片はグルタミンシンセターズ (GS) と一致し、通常グリア細胞に存在する GS が、神経障害後には運動ニューロンにも発現することが明らかとなった。さらに HEK 細胞に GS を発現させるとグルタミン酸の取り込み

が上昇した。

【総括】

末梢神経再生過程における分子メカニズムを明らかにするため differential display による神経再生関連遺伝子の検出を行った。それらの分子の一つについてさらに解析を進めたところ、神経細胞型グルタミン酸トランスポーターであることが明らかとなった。

グルタミン酸は神経伝達物質であると同時に細胞毒性をもつ分子である。それ故神経細胞は細胞外で毒性の高いグルタミン酸を細胞内に取り込む機構を発達させており、通常細胞内と細胞外のグルタミン酸は大きな濃度勾配が保たれている。このような輸送システムを担う分子である EAAC1 が末梢神経損傷後顕著な転写促進を受けていることが本研究により初めて明らかとなった。さらに元来グリア細胞に存在し細胞外から取り込まれたグルタミン酸を毒性のないグルタミンに変換する酵素であるグルタミンシンセターズが神経細胞内で新たに発現することから、EAAC1 による細胞外グルタミン酸の取り込み効率を上昇させていると考えられる。従って、これらの分子が神経障害後新たに神経細胞内で発現上昇するという事は、グルタミン酸毒性を低下させるためのいわば神経細胞死防御機構が作動していると考えられ、これによって末梢神経細胞は損傷に対する耐性を獲得していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

成熟した神経細胞はダメージを受けると死にいたり、それにとって代わる新たな神経細胞は発現しない。しかし、神経系の中でも末梢神経系は例外的に損傷を受けても細胞死にいたらず再生することが知られている。このような末梢神経再生現象を遺伝子発現調節の面から検討することにより、神経再生メカニズムを解明しようとする試みが本論文で行われている。

本論文では differential display 法という分子生物学的手法を用いることによって、新たな神経再生関連遺伝子としてニューロン型グルタミン酸トランスポーターのクローニングを行っている。グルタミン酸は神経伝達物質であると同時に神経細胞毒性をもつ分子として知られており、神経系の細胞はグルタミン酸トランスポーターにより細胞外のグルタミン酸を細胞内に積極的に取り込む機構を発達させている。このような分子が末梢神経損傷後新たに発現上昇することが本論文により初めて証明された。また元来グリア細胞に発現しているグルタミンシンセターズが傷害後神経細胞内にも新たに発現上昇することも明らかにした。本研究により、グルタミン酸毒性を低下させるためのメカニズムが神経損傷後に作動していることが明らかになり、神経細胞死の研究領域において重要な役割を果たしたと考えられる。以上のことから、申請者の論文は学位論文として十分な価値があると認められる。