

Title	Cloning of Novel Genes Induced by Hypoxia/Reoxygenation and The Expression in Ischemic Rat Brain : Using in vitro Hypoxia Model of Rat Cultured Astrocytes
Author(s)	松尾, 徳幸
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40922">https://hdl.handle.net/11094/40922</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"&gt;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">&lt;/a&gt;</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	まつおのりゆき 松尾徳幸
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 13443 号
学位授与年月日	平成 9 年 11 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Cloning of Novel Genes Induced by Hypoxia/Reoxygenation and The Expression in Ischemic Rat Brain —Using in vitro Hypoxia Model of Rat Cultured Astrocytes— 低酸素負荷、再酸素化により発現誘導される新規遺伝子の探索—アストロサイトの in vitro 低酸素モデルを用いて—
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌 (副査) 教授 辻本 賀英 教授 米田 悦啓

## 論文内容の要旨

### [目的]

虚血性の臓器傷害は、低酸素そのものによる傷害と同時に再灌流によるダメージも大きな要因となる。また、中枢神経系において最も虚血に強いとされるアストロサイト (AST) のストレス応答は、脳虚血の病態生理を理解する上で極めて重要である。そこで、このようなストレスにさらされた細胞の応答を、培養 AST の in vitro 低酸素負荷モデルを用いて検討した。

培養 AST を低酸素負荷した後に再酸素化すると、低酸素負荷時とは異なるストレス蛋白や神経保護作用を持つ IL-6 等が誘導されることが既に報告されている。これらより、再酸素化時に AST に誘導される蛋白が好气的環境への再適応に重要であることが示唆される。

そこで、本研究では培養 AST の再酸素化時に誘導される因子を Differential Display (DD) 法を用いて検索し、得られた 2 つの遺伝子 (RA301, RA410) について解析した。

### [方法ならびに成績]

生直後ラット大脳皮質より AST を分離培養し、in vitro 低酸素負荷は低酸素チャンバー内に培養皿を置くことにより行い、再酸素化は外気に戻すことにより行った。

AST を 24 時間低酸素環境下に曝露した後再酸素化し、再酸素化直前と再酸素化 1 時間後に RNA を抽出した。続いて DD 法を行い、再酸素化時に特異的に誘導される 2 種類のポジティブバンド (RA301, RA410) を得、ラット脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングして、それぞれの全長をコードする cDNA を得た。

RA301 は 288 個のアミノ酸よりなり、RNA 認識モチーフ (RRM) と 2 つのセリン-アルギニンに富んだ領域 (SR ドメイン) を持つ SR 蛋白であった。また RA301 は、ショウジョウバエの性決定因子でありスプライシング調節因子である Transformer-2 とアミノ酸配列上、ドメイン構造上最も相同であった。一般的にスプライシング調節因子は RRM と SR ドメインを有しており、RA301 が新規のスプライシング調節因子であることが示唆された。

RA410 は 637 個のアミノ酸よりなり、酵母の小胞体・ゴルジ装置間の小胞輸送蛋白である Slyp と最も相同性が高か

った。更に、他の小胞輸送蛋白(酵母の Sec1p, ラットの n-Sec-1, ヒトの  $\beta$ -COP 等)とも相同性のあるドメインを全長に渡って有しており、新規の小胞輸送関連蛋白であることが示唆された。

これら2つの遺伝子の AST における発現を、ノーザン解析で検討した。これら遺伝子は正常酸素下、低酸素下では誘導されないが、再酸素化後15分以内に誘導され1時間以内に最大となり、その後漸減した。再酸素化によるこの遺伝子発現は、予め AST にシクロヘキシミドを添加することによって抑制されないが、NADPH oxidase 阻害剤である diphenyl iodonium (DPI) によって抑制された。DPI は再酸素化後の酸素ラジカル ( $O_2^-$ ) の産生を抑制することより、これら遺伝子が再酸素化後に NADPH oxidase によって発生する  $O_2^-$  で直接誘導される遺伝子群の一つであることが示唆された。

これら2つの遺伝子の特異的な抗体を、それぞれ合成ペプチドを用いて作製した。ウェスタン解析で、RA301抗体は約30 kDa, RA410抗体は約70 kDa の蛋白を検出し、両蛋白の誘導は再酸素化後1時間より検出され、4時間で最大となった。

細胞分画のウェスタン解析, AST の免疫染色や免疫電顕より、RA410蛋白はゴルジ装置や Large Vesicle に存在しており、細胞内輸送に関わっていることが示唆された。また、RA301は免疫染色の結果、核に存在していたことより、スプライシングに関わっていることが裏付けられた。

最後に、虚血・再灌流後のラット脳における発現を検討した。RA301は in situ hybridization において再灌流後12~24時間をピークに虚血側のみ発現が誘導されたのに対して、RA410は免疫染色において再灌流後1時間の AST に発現しており、これら2つの因子間で虚血・再灌流に対する反応に違いが認められた。なお、RA301は強い虚血によって発現が誘導されるのに対し、RA410は神経細胞死が起こらない程度の弱い虚血でのみ発現が誘導され、RA410が神経保護機作の発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

[総括]

虚血時及び再灌流時(低酸素負荷時及び再酸素化時)に発現誘導されてくる因子の研究は、これまでは専ら熱ショック蛋白等のストレス蛋白に関するものであったが、本研究ではスプライシング調節因子や小胞輸送関連因子もこれらストレス応答に対して重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、脳虚血・再灌流の単純なモデルとして、アストロサイトの低酸素負荷・再酸素化モデルを用い、そのストレス応答を解明することによって、脳虚血の病態生理を理解しようとしたものである。これまでに低酸素下の各種ストレス蛋白に関する研究は多いが、再酸素化後早期の遺伝子発現に関する研究は少なく、またそれらの遺伝子のランダムスクリーニングを行った点が、本研究の特色である。

ランダムスクリーニングにより得られた2つの新規遺伝子は、新規のスプライシング調節因子(RA301)と小胞輸送関連因子(RA410)であった。RA301は、ショウジョウバエの性決定因子である Transformer-2 (Tra-2) の初めての Mammalian Homologue であり、RA410は酵母の Sly1p の Homologue であった。これらの遺伝子は再酸素化後の非常に早期に発現誘導され、再酸素化時に産生される活性酸素中間体による直接的な発現誘導であった。更に正常組織以上に、脳虚血・再灌流モデルの梗塞側のアストロサイトに強く発現誘導されており、in vitro の低酸素負荷・再酸素化モデルが in vivo に反映できることを証明した。

以上、本研究は、脳虚血・再灌流の病態でストレス蛋白以外にスプライシング調節因子や小胞輸送関連因子が関わっていることを明らかにし、再灌流後早期の遺伝子発現や pre mRNA のスプライシング、mRNA の翻訳や翻訳された蛋白の小胞輸送等の一連の流れが、細胞の好气的環境に対する再適応化に重要であるという考えを提起した最初の知見であり、学位論文に値するものと評価される。