



Title	Expression of Zinc Transporter Gene, ZnT-1, Is Induced after Transient Forebrain Ischemia in the Gerbil
Author(s)	津田, 学
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41050">https://hdl.handle.net/11094/41050</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=" <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>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	津田	まなぶ
博士の専攻分野の名称	博士	(医学)
学位記番号	第	13519号
学位授与年月日	平成10年1月30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	Expression of Zinc Transporter Gene, ZnT-1, Is Induced after Transient Forebrain Ischemia in the Gerbil (砂ネズミ一過性前脳虚血モデルにおける亜鉛トランスポーターZnT-1の発現誘導)	
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌	
	(副査) 教授 早川 徹 教授 柳原 武彦	

### 論文内容の要旨

#### [目的]

一過性前脳虚血(5分虚血)を砂ネズミに負荷すると、海馬CA1錐体細胞が数日後に変性する事が知られている(遅発性神経細胞死)。また、予め軽度の虚血(2分虚血)を与えておくと、本来致死的な虚血に対し耐性となる現象が存在する。これらの現象がどのような分子メカニズムで起こっているのかを理解することは、虚血性脳血管障害の病態理解を深めるとともに、新しい治療法を確立する上で重要であると考えられる。そこで、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて、5分虚血あるいは2分虚血後に海馬で誘導される遺伝子のスクリーニングを行った。

#### [方法]

軽エーテル麻酔下に砂ネズミ両側総頸動脈を剥離し、2分間あるいは5分間クリップすることにより一過性前脳虚血を負荷した砂ネズミ、及びコントロールとして偽手術を施した砂ネズミを10匹ずつ作製した。虚血24時間後に海馬を取り出し、それぞれのグループごとに10匹分の海馬をまとめてtotal RNAを調製し、ディファレンシャル・ディスプレイを行った。虚血後に発現量が上昇していると考えられる遺伝子を回収し、塩基配列の決定、ノーザン解析及びin situハイブリダイゼーションを行った。また、得られた遺伝子のコーディング領域を取得するため、砂ネズミ脳cDNAライブラリーを作製しスクリーニングを行った。神経細胞死の確認は、クレシルバイオレット染色を用いた。また、虚血後のZn<sup>2+</sup>の動態を観察するため、Zn<sup>2+</sup>のキレーターである蛍光試薬Zinquinにより、脳の切片を染色し、レーザー顕微鏡で観察した。

ラット海馬より神経細胞初代培養系を調製し、Zn<sup>2+</sup>を培地に添加した後、ZnT-1 mRNAの発現をノーザン解析により調べた。さらに、ZnT-1を高発現する細胞を作製し、Zn<sup>2+</sup>感受性が野生型細胞と比べどのように変化するのかを測定した。

#### [成績]

3種の遺伝子(P17, P28, P41)が、ノーザン解析により5分虚血後に発現上昇することが確認され、塩基配列からセリンプロテアーゼインヒビターSPI-3(P17)及び未知遺伝子(P28, P41)であった。P28は3'-ノンコーディング領

域と考えられたので、ライブラリースクリーニングを行ったところ、コーディング領域の一部が得られ、ラット亜鉛トランスポーター ZnT-1 とアミノ酸レベルで 90% 以上の相同性が認められた。したがって、P28 は砂ネズミ ZnT-1 と考えられた。

In situ ハイブリダイゼーションの結果、ZnT-1 mRNA の発現は、5 分虚血 12 時間後海馬 CA1 錐体細胞に認められ、虚血 2 日後に最大となった。その後、細胞の死滅に対応して ZnT-1 の発現は消失した。興味深いことに、海馬 CA3、大脑皮質などの神経細胞死を生じない領域では、遺伝子発現は認められなかった。また、2 分虚血後、あるいは 2 分虚血 24 時間後に 5 分虚血を与えた場合も、ZnT-1 の発現誘導は認められなかった。したがって、ZnT-1 mRNA は、遲発性神経細胞死を起こす細胞のみに誘導されることが明らかとなった。

ラットにおいて一過性前脳虚血後、海馬 CA1 錐体細胞に  $Zn^{2+}$  が蓄積し、そのため細胞死が引き起こされるということが報告されている。砂ネズミでも同様に  $Zn^{2+}$  が蓄積していることが、Zinquin により確認できた。

さらに  $Zn^{2+}$  は細胞毒性があることが知られているが、神経細胞初代培養系に  $Zn^{2+}$  を添加した場合、ZnT-1 mRNA が発現誘導されることが明らかとなった。また、ZnT-1 高発現細胞は野生型に比べ、 $Zn^{2+}$  に対して耐性を獲得した。

#### [総括]

ZnT-1 は細胞外に  $Zn^{2+}$  を排出するトランスポーターである。虚血後に Zn が蓄積する細胞にのみ ZnT-1 mRNA が誘導されること、in vitro においても  $Zn^{2+}$  を添加すると ZnT-1 mRNA が誘導されることから、蓄積する  $Zn^{2+}$  を排出するために ZnT-1 mRNA が誘導されると考えられる。しかし、虚血後の海馬 CA1 では、タンパク質合成障害のため、タンパク質の翻訳が行われない場合がある。抗 ZnT-1 抗体を作製し、免疫組織化学を行った結果、CA1 領域には免疫反応陽性細胞は認められなかったので、ZnT-1 タンパク質は合成されていない可能性がある。ZnT-1 高発現細胞は  $Zn^{2+}$  に対し耐性を示すことから、虚血後に ZnT-1 タンパク質を合成できれば、神経細胞死を防ぐことができるのではないかと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、虚血性神経細胞死の分子メカニズムを明らかにするため、砂ネズミ一過性前脳虚血モデルを用い、ディファレンシャルディスプレイ法により、虚血後に発現量が上昇する遺伝子の探索を行ったものである。その結果、細胞死を起こす海馬 CA1 神経細胞のみに亜鉛トランスポーター ZnT-1 mRNA が誘導されることを見出した。また、虚血後の CA1 神経細胞に Zn が蓄積することを示した。次に、神経細胞初代培養系において、培地に Zn を添加し細胞死が起るときにも、ZnT-1 mRNA が誘導されることを、さらに ZnT-1 高発現細胞 (Neuro2A) は Zn に対し耐性となることを明らかにした。虚血後の CA1 神経細胞では、ZnT-1 蛋白質の発現は認められなかったことから、ZnT-1 蛋白質が合成されれば、神経細胞死は抑制される可能性があることを示した。虚血後、神経細胞にカルシウムが流入することは知られているが、亜鉛が蓄積することは最近報告されたところであり、本研究は先進的であると思われる。さらに、ZnT-1 と虚血の関係を論じた最初の研究で独創性が高く、臨床的にも有用な新知見であり、学位論文に値するものと考える。