



Title	Analysis of Genes Which Are Related to The Neuronal Cell Death
Author(s)	吉田, 聖美
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41571
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	吉 田 聖 美
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 2 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物化学専攻
学 位 論 文 名	Analysis of Genes Which Are Related to The Neuronal Cell Death (神経細胞死に関わる遺伝子の解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 畠 中 寛
	(副査) 教 授 吉 川 和 明 教 授 小 倉 明 彦

論 文 内 容 の 要 旨

脳の発生初期において神経細胞は過剰に生産されるが、およそ半分は死んでしまう。この細胞死は正常に機能する脳を形成する上で重要な生理現象であると考えられている。即ち、脳が正しい神経回路を形成するために、標的細胞と正確なシナプス形成ができる必要がある。シナプス形成した神経細胞はポストの標的細胞から放出される神経栄養因子、およびプレの神経細胞自ら放出される神経伝達物質により生存かつ維持される。一方、シナプス形成できなかつた神経細胞は排除されるのである。この神経細胞死はアポトーシスの形をとり、核の凝集、DNA の断片化、そしてアポトーシス小体の形成等が観察される。この細胞死は RNA や蛋白質合成阻害剤で抑制されることから、新たに合成された蛋白質がこの細胞死に関わると考えられている。私はこ培養ラット細胞におけるアポトーシスの系を用いて、そこに関わる遺伝子を解析した。

生後11日のラットから小脳顆粒細胞を高カリウム培地で4日間培養し、低カリウム培地に置換した。この時、置換後3時間までは RNA 合成阻害剤で抑制されることがわかった。そこで、置換前と後3時間後の培養細胞から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成し differential subtraction を行った。Nuclease Protection アッセイを用いて2次スクリーニング、そしてシークエンスの結果、いくつかのクローンを候補として明らかであった。その一つで、クローン (#3-496) について以下に解析を行った。Northern 解析の結果、約 5 kbp の単一バンドが検出された。In situ hybridization の結果では、脳の全体にこの mRNA が発現しているが、発現は神経細胞に局在していると思われた。

このクローン (#3-496) の全長シークエンスを得るために、ラット海馬の cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、このクローンは SNF1 related kinase (SNRK) の報告されていない non-coding region であった。SNRK は serine/threonine kinase の family、SNF1 family に属することがわかっている。SNF1 family の機能は細胞のエネルギー状態を脅かすような栄養的、環境的ストレスから細胞をエネルギー代謝と遺伝子発現の両方を調節することによって、保護すると考えられている。

遺伝子産物としての SNRK 蛋白質を解析するために、まず in vitro translation を行い、全長の open reading frame を含む vector が SNRK 蛋白質を合成するかを調べた。その結果、81 kDa のバンドが検出され、これは、SNRK の分子量に相当することがわかった。また、ウサギで作成した SNRK の N-terminal に対する抗体と免疫沈降すると、同様に 81 kDa のバンドが検出されたことから抗体がこの蛋白質のバンドを SNRK であることを強く支持

している。しかし、ラット小脳の内因性の SNRK の immunoblotting の結果は、in vitro translation の結果と異なって 65kDa のバンドが検出された。65kDa のバンドは COS 細胞や PC12h 細胞でも見つかったが、81kDa のバンドは検出されなかった。65kDa の内因性の SNRK の経時発現変化を見てみると、SNRK mRNA の経時発現変化と同じように、低カリウム培地置換後 3 時間後から蛋白質の発現量が若干上がっていることがわかった。一方、SNRK の酵素活性の変化を調べたところ、SNRK の発現の上昇とは対照的に、低カリウム培地置換後劇的に減少した。また、酵素活性の高かったサンプルでは 65kDa のバンドの他に 50kDa のバンドも検出された。このように様々な大きさのバンドが検出されることから、SNRK がプロセッシングを受けていると考えられる。また、Immunocytochemistry の結果から、SNRK 蛋白質は神経細胞の核に存在することが認められた。これらの結果より、SNRK は培養ラット小脳顆粒細胞における低カリウム培地置換による細胞死に関与していることがわかった。しかし、SNRK の制御はプロセッシングによってなされていると思われるが、その機構は明らかではない。ラット顆粒細胞のアポトーシスに関与することが明らかになった SNRK は今後の細胞死のメカニズムの理解に貢献できると思われる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、脳神経系における形態形式で生じるプログラム細胞死（アポトーシス）を、培養ラット小脳顆粒細胞を用い解析し、新たにセリンスレオニンキナーゼの一員、SNRK を見いだした。SNRK の発現変動、キナーゼ活性の変化などアポトーシスに関連して興味ある知見を見いだしており、博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。