



Title	Role of p53 in DNA damage-induced apoptosis of cerebellar granule neurons : Analysis using slice culture system from p53 knockout mice
Author(s)	稲村, 直子
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41573">https://hdl.handle.net/11094/41573</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">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	稲 村 直 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 0 3 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 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	Role of p53 in DNA damage-induced apoptosis of cerebellar granule neurons ～Analysis using slice culture system from p53 knockout mice～ (小脳顆粒細胞のDNA 鎖切断傷害による細胞死におけるp53 遺伝子の役割) ～p53 ノックアウトマウスの切片培養系を用いた分析～
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 畠 中 寛  (副査) 教 授 永 井 克 也    教 授 小 倉 明 彦

### 論 文 内 容 の 要 旨

脳神経系におけるニューロンのアポトーシスは、非分裂細胞にとって、その死が置き換えがきかないことから重要なものと考えられている。特に、疾患あるいは障害によって生じるアポトーシスは、脳神経系における機能に重大な影響を及ぼすものと考えられる。

分裂終了後の小脳顆粒細胞を用いた DNA 鎖切断傷害で生じるアポトーシスに、がん抑制遺伝子 p53 が関わっていることがすでに明らかになっている。私は、今回、脳神経系を構成している様々な細胞間相互の影響がどのようにニューロン死に関わっているのか明らかにする目的で、より *in vivo* に近い系である切片培養系を確立し、p53 野生型およびノックアウトマウスを用いて研究を行った。

生後12日目の p53 野生型及びノックアウトマウスの小脳を、正中線に平行に厚さ400  $\mu$ m にスライスし、多孔質膜上で1日間培養後、DNA 鎖切断をもたらす薬剤ブレオマイシンを添加し、切片培養下のニューロンに与える影響を調べた。培養後凍結切片を作製し、ニッスル染色、TUNEL 染色、および抗 p53、抗 c-Jun、抗 c-Fos 各抗体での免疫組織化学染色を行った。phospho-JNK の発現、caspase-3 の活性、および PARP の分解については、別に分散培養した小脳顆粒細胞の細胞抽出液を用いた。

#### 1) ブレオマイシン添加による p53, c-Jun, c-Fos の発現変動

p53 野生型マウスから小脳の切片培養を行い、ブレオマイシン添加により、TUNEL 陽性細胞数の経時的増加を観察した。このとき、p53 および c-Jun 陽性細胞数の増加もみられた。しかし、p53 ノックアウトマウスからの小脳培養切片では、TUNEL 陽性細胞は観察されず、c-Jun 陽性細胞もみられなかった。一方、c-Fos 陽性細胞では差はみられなかった。p53, c-Jun 発現の小脳における構成分布を培養切片上で観察すると、特に外顆粒層、プルキンエ細胞層において、p53 野生型マウスの場合のブレオマイシン添加条件で、p53, c-Jun の著しい発現上昇がみられた。これらの結果は、小脳切片培養上でみられた DNA 切断に伴うアポトーシスにおいても、p53 が関与していることを示している。また、c-Jun の発現上昇が p53 依存的にみられることから、c-Jun が p53 依存性の細胞死のカスケードに深く関与していることが示唆された。

#### 2) p53 が関与する小脳顆粒細胞のアポトーシスカスケード

この細胞死の系における時間経過をみると、c-Jun 陽性細胞の発現は、TUNEL、p53 陽性細胞の発現よりも早い

段階で起こっていた。即ち、ブレオマイシン添加後比較的早い時間に c-Jun 陽性細胞の増加がみられたため、ブレオマイシン添加後 9 時間以内における、c-Jun の上流にある JNK のリン酸化を調べた。即ち、phospho-JNK のレベルを培養小脳顆粒細胞のウェスタンブロッティング法により調べた。その結果、ブレオマイシン添加により、phospho-JNK のレベル上昇がみられた。一方、ノックアウトのマウスからの小脳顆粒細胞では、その様な変化はみられなかった。これらのことから、この細胞死での c-Jun の発現の上流に JNK の活性化が関与していることが示唆された。

次に、この細胞死における caspase の関与を調べるため、切片培養系にブレオマイシンと caspase-3 の阻害剤 Ac-DEVD-cho を同時添加した。その結果、TUNEL 染色によるアポトーシス陽性細胞の数は減少したが、p53, および c-Jun 陽性細胞数の増加はみられなかった。このことから、この細胞死における caspase-3 の活性化が考えられたので、このとき実際に caspase-3 の活性が起きているかどうか調べると、ブレオマイシン添加後 6 時間後において、無添加に比べて、約 18 倍の caspase-3 の活性の上昇がみられた。

さらに、ブレオマイシン添加による caspase-3 の活性化により、PARP の分解が起こっているかをウェスタンブロッティングにより調べると、ブレオマイシン添加時間が長くなるに連れて、PARP の分解が進んでいることが分かった。このとき、caspase-3 の阻害剤を同時添加すると、PARP の分解が抑制された。

これらのことから、ブレオマイシン添加による DNA 鎖切断傷害で生じる小脳顆粒細胞のアポトーシスにおいては、p53 が深く関与しており、p53 および c-Jun の発現上昇の上流に JNK の活性化が関与していること、また、p53 の発現上昇の下流に caspase-3 の活性化、それに伴う PARP の分解が関与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、DNA 傷害に伴うニューロンのアポトーシスを、p53 遺伝子野生型および欠損型マウスを用い、小脳スライス培養系での c-Jun, JNK またカスパーゼ-3 などの関与について解析し、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。