Osaka University Knowledge Archive

Title	Molecular Cloning of a Novel Member of the HSP110 Family of Genes, Ischemia-Responsive Protein 94kDa (irp94), Expressed in Rat Brain After Transient Forebrain Ischemia
Author(s)	八木田, 佳樹
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41625
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【59】

氏　　名	八木田　佳　樹（やぎた　よしき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　14488　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 医学系研究科内科系専攻
学　位　論　文　名	Molecular Cloning of a Novel Member of the HSP110 Family of Genes, Ischemia-Responsive Protein 94kDa (*irp94*), Expressed in Rat Brain After Transient Forebrain Ischemia （新規 HSP110ファミリーメンバー，ischemia-responsive protein 94 kDa (*irp94*) のクローニングとラット一過性前脳虚血後脳における発現）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　堀　　正二 （副査） 教　授　柳原　武彦　　教　授　吉峰　俊樹

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

虚血性脳障害では虚血ストレスの多寡に応じて，構成細胞のすべてが速やかに細胞死に陥る梗塞巣から神経細胞のみが数日かけて脱落していく選択的神経細胞死まで多様な病変を形成する。軽度の虚血侵襲による神経細胞死の経過中には，神経細胞は保護的に働く遺伝子発現を含むストレス応答を行うことが知られている。しかし虚血／再灌流後の神経細胞ではmRNA翻訳過程の障害のため蛋白質を合成できず，ついには細胞死に陥ると考えられる。これらの蛋白質を他の手段によって機能させることができれば虚血性神経細胞死を回避できる可能性がある。このような治療戦略を考える上で，虚血／再灌流後の脳において発現が亢進している遺伝子を検索し，神経細胞保護作用を有する蛋白質をコードする遺伝子を同定することは重要である。そこで本研究ではラットの脳虚血／再灌流モデルを用いて虚血ストレスに応答する新規の遺伝子（ischemia-responsive gene）を検索し，同定することを目的とした。

【方法ならびに成績】

1．動物モデル：海馬のCA1領域に再現性よく選択的神経細胞死を作成できるラット4血管一過性閉塞モデルを用いた。雄性Wistarラットをペントバルビタール麻酔下に両側椎骨動脈を永久閉塞し，その翌日に両側総頚動脈を一過性にクリッピング後再灌流させた。虚血中及び虚血後1時間は直腸温を37℃に頭蓋骨表面温を36℃に保った。虚血時間は以下の各実験毎に設定した。

2．Differential Displayと遺伝子クローニング：虚血（4，10分）24時間後の動物及び正常動物の海馬由来cDNAに対しDifferential Displayを行い，虚血／再灌流により誘導される候補遺伝子断片を得た。これをプローブとしてラット正常海馬由来のcDNA libraryをスクリーニングした結果全長4521bpのcDNAが単離された。この遺伝子はHSP110／105，OSP94／APG－1というHSP110ファミリーのメンバーと高いホモロジーを有していることより，HSP110ファミリーに属する遺伝子であると考えられた。この遺伝子がコードする蛋白の分子量は94052Daと予測されたためこの遺伝子をischemia-responsive protein 94 kDa (*irp94*) と命名した。*irp94*がコードする蛋白質はヒトHSP70RYおよびマウスAPG－2と90%以上の相同性を示すことから*irp94*はこれらの遺伝子のラットホモログである可能性が考えられた。Northern blotにより正常状態における*irp94*の発現は多くの臓器に広く分布していたが，特に脳と精巣における発現が大であることが示された。また約5 kbpと約3 kbpの2種類の転写産物が見い出された

が，脳においては5 kbpの，精巣においては3 kbpのmRNAが多く発現していた。5 kbp typeの3′非翻訳領域には2カ所のmRNA不安定化モチーフがあり，2種類の転写産物の寿命は異なることが予想された。

3．虚血脳における発現：Northern blotによる検討では正常海馬においても*irp94*はある程度の発現を認めた。虚血後の海馬における発現は10分以上の強い虚血負荷で増強され，虚血負荷が強い程その誘導量は多かった。時間経過では虚血後4時間から24時間でその発現増強が明らかであった。次にジゴキシゲニンラベルのcDNAを用いたin situ hybridizationによる検討を行った。虚血負荷後の海馬において*irp94*は主として錐体細胞層及び顆粒細胞層の神経細胞に分布していた。この分布パターン自体は正常海馬と比較して変化はなかった。

4．高体温負荷への反応：虚血以外のストレスに対する*irp94*の発現様式の変化を見るためにラットに42℃15分の高体温を負荷した。ラットをペントバルビタール麻酔下にヒートランプを用いて直腸温，頭蓋骨表面温を42℃まで上昇させ，15分維持した後体温を下げ，37℃を一時間維持した。この場合既に高体温時の誘導が報告されている*hsp70*は負荷後1時間で強く誘導されていたが，*irp94*は明らかな誘導を認めなかった。

【総括】

1）虚血ストレスによりその発現が増強される新規遺伝子である*irp94*をクローニングした。*irp94*のコードする蛋白IRP94はその予想される一次構造からHSP110ファミリーに属するものと考えられた。

2）*irp94*は海馬CA1領域に神経細胞死を起こさせる強さ（10分以上）の虚血負荷によりその発現が明らかに増強されていた。また虚血負荷後4時間から24時間において*irp94*の発現増強が顕著であり，その発現細胞は主として神経細胞であった。

3）*irp94*は虚血以外の代表的ストレスである高体温では誘導されず，*hsp70*とは異なった発現調節機構の存在が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では虚血ストレスに応答する新規の遺伝子*irp94*のクローニングとその発現動態の解析を行なっている。虚血／再灌流に曝された神経細胞はそのストレスの多寡により，蛋白合成障害が存在しうる。このため神経細胞のストレス応答について考える際，蛋白レベルの検討のみでは充分といえず，遺伝子レベルの検討を行うことが重要である。本研究において虚血／再灌流ストレスに反応しうる遺伝子検索の結果，単離された遺伝子*irp94*はHSP110 familyに属するストレス蛋白をコードしており，その遺伝子産物IRP94は他のストレス蛋白と同様シャペロンとしての機能が予想される。一過性前脳虚血後海馬における*irp94*は10分以上の強い虚血負荷で，また虚血後4時間から24時間でその誘導が明らかであった。さらに正常時および虚血時の海馬において*irp94*を発現している細胞は主として神経細胞であることをin situ hybridizationを用いて明らかにしている。また，これまで本脳虚血モデルにおいてよく研究されている*hsp70*と異なり，虚血以外の代表的生体ストレスである高体温ストレスでは*irp94*は誘導されず，*irp94*の転写調節機構は*hsp70*と異なることを示唆している。

以上，本研究は神経細胞の虚血ストレス応答に関わる新規遺伝子を単離・同定し，虚血性神経細胞障害の分子機構の究明を進める新たな手がかりを得たという点で重要であり，学位の授与に値すると考えられる。