



Title	Differential Display Reveals Transcriptional Up-regulation of the Motor Molecules for Both Anterograde and Retrograde Axonal Transport During Nerve Regeneration
Author(s)	蘇, 慶寧
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41705
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 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	蘇 慶 寧
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 3 2 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 医学系研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Differential Display Reveals Transcriptional Up-regulation of the Motor Molecules for Both Anterograde and Retrograde Axonal Transport During Nerve Regeneration (末梢神経再生過程における逆行性及び順行性軸索輸送分子群の発現促進：ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いた探索)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 遠山 正彌 (副査) 教 授 三木 直正 教 授 米田 悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

末梢の運動神経は神経損傷後も生存し再生・修復することができるが、中枢神経系の神経細胞は損傷に対して極めて脆弱である。中枢神経系の神経細胞を神経損傷から守るには、確実に生存・再生する末梢運動神経について理解することが不可欠であると考えられる。末梢運動神経系の損傷に対する耐性はいかなる分子基盤に基づくのかを解明するために、運動神経軸索損傷後に発現が変化する遺伝子群を明確にし、それらを統合した分子レベルでの再生モデルを構築する必要がある。そこで、我々はマウスの舌下神経損傷モデルを用い、ディファレンシャルディスプレイと類似した RNA フィンガープリンティング法を行うことにより遺伝子の探索を試みた。その結果、軸索損傷後に多くの既知及び新規の遺伝子群の発現が新たに生じていることが明らかになった。今回得られた遺伝子のうち、逆行性及び順行性の軸索輸送に関与する分子群の発現促進についてさらに検討を行った。

【方法ならびに成績】

軸索損傷後に発現が上昇する遺伝子を同定するために RNA フィンガープリンティング法を用いた。マウス (BALB/c, 50匹) の片側舌下神経を切断し、6 時間後に損傷側の舌下神経核と健常側の舌下神経核をそれぞれ顕微鏡下で切り出した。得られた組織より RNA を抽出し cDNA を作成した後、ランダムプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物をゲル上に展開後、健常側に比べて術側で発現量の増加している PCR 産物を切り出した。得られた候補 cDNA 断片 (PCR 産物) をプローブとして in situ ハイブリダイゼーション法を行い、組織上で実際に発現量が上昇している遺伝子を絞り込んだ。最終的に得られた遺伝子の塩基配列を決定し、データベースを用いて検索したところ、得られた遺伝子の 1 つ (clone #KS110) はラットの kinesin light chain (KLC) であることが明らかになった。KLC は順行性の軸索輸送に関与する遺伝子として知られており、ラットでは 3 つのサブライシングバリエント (KLC-A, KLC-B, KLC-C) が存在することが知られている。そこで、これらを区別して同定するための特異的なオリゴプローブを合成し、in situ ハイブリダイゼーション法によりどのバリエントが応答しているのかを検討した。また、ubiquitous- 及び neuron specific-kinesin heavy chains (uKHC, nKHC)、さらに逆行性の輸送分子である dynein についてもそれぞれに対する特異的プローブを作成し、神経傷害後の応答について同時に検討した。すべての KLC (tape A, B, and C) と dynein は舌下神経損傷後に損傷運動神経細胞においていずれも著しい mRNA の発

現上昇を認めた。一方、uKHCは舌下神経核においては術側、健常側ともに発現は見られなかったが、nKHCは健常側の運動ニューロンで既に豊富な発現を示しており、術後その発現量に変化は認められなかった。

【総括】

マウス舌下神経損傷モデルを用いたRAP法により多くの既知及び新規の遺伝子が得られた。これにより本方法は神経再生に関連した遺伝子探索には有効な方法であることが明らかになった。得られた遺伝子断片の1つ(KS110)は、順行性の軸索輸送を担うKLCであった。KLCの3つのスプライシングバリエントのいずれも軸索損傷後には発現が上昇していたこと、さらに神経型のKHC(nKHC)の発現は常に高レベルであったことから、軸索損傷後には、たとえば軸索進展の為に必要な膜の供給などを促進するために順行性の軸索輸送が活性化されることが示唆される。また、逆行性の軸索輸送を担うdyneinの発現の亢進も認められたが、神経損傷後には損傷神経終末より神経成長因子などの取り込みやそれらの逆行性軸索輸送が促進することが知られており、今回得られたdyneinの発現上昇はその機能亢進に貢献していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は末梢運動神経の軸索損傷時に作動する神経生存・再生の分子メカニズムを明らかにすることを目的に行われたもので、神経再生関連遺伝子を同定するためにディファレンシャルディスプレイ法に類似したRNAフィンガープリント法を用いている。舌下神経損傷モデルにこの分子生物学的な手法を適用することによって、神経再生関連候補遺伝子を効率よく同定しているとともに、組織学的なスクリーニングによって候補遺伝子をさらに絞り込むことによって効率よく擬陽性遺伝子を取り除くことに成功している。また本研究では得られた遺伝子群のうち軸索輸送に関連する分子に焦点をあて、キネシンやダイニンなどの順行性及び逆行性の輸送分子群が神経傷害後にはいずれも発現亢進していることを明らかにしている。このことは、軸索損傷後に生じる末梢からの神経栄養因子の取り込みと逆行性輸送の促進、さらに軸索進展のための膜の供給亢進のための順行性輸送の活性化などの分子的な裏付けとなると考えられる。このように、得られた分子の妥当性からも本研究で用いられた手法の有効性が立証されている。以上により本論文は博士の学位に十分値するものと考えられる。