



| | |
|--------------|---|
| Title | 樹状突起、シナプス部位に特異的に輸送されるmRNAの探索と解析 |
| Author(s) | 石本, 哲也 |
| Citation | 大阪大学, 2000, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/42158 |
| 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。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 石 本 哲 也

博士の専攻分野の名称 博 士 (理 学)

学 位 記 番 号 第 1 5 5 4 9 号

学 位 授 与 年 月 日 平成12年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

基礎工学研究科物理系専攻

学 位 論 文 名 樹状突起、シナプス部位に特異的に輸送される mRNA の探索と解析

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 葛西 道生

(副査)
教 授 村上富士夫 教 授 倉橋 隆 客員助教授 田口 隆久

論 文 内 容 の 要 旨

近年、数種類の特異的 mRNA が直接シナプスや樹状突起に輸送され、そこで翻訳されるという仮説が提唱されており、それを裏付けるような報告も増えてきている。しかしその輸送メカニズムや局所での翻訳調節メカニズムは未だ不明な部分が多く、それらを解明するためにはもっと多くのシナプスや樹状突起に輸送される mRNA を探索し、その分子情報を解析していく必要がある。我々はシナプス部位に輸送される mRNA を探索すべく、ラット前脳の mRNA と前脳から得られたシナプトソームから抽出した mRNA をディファレンシャルディスプレイ法で比較した。その結果シナプトソーム中に ferritin H chain mRNA と未知のタンパク質をコードすると考えられる mRNA の2種類が高濃度に存在することを発見した。2種類の mRNA のうち Ferritin H chain mRNA は培養神経細胞、及び海馬スライスを用いた *in situ* hybridization による解析で樹状突起に存在することが明らかになった。このことから ferritin H chain mRNA がシナプスへ特異的に輸送される可能性が強く示唆された。もう1種類の mRNA である band83 に関してはその全長 cDNA 配列を決定し、およそ31kDa のタンパク質をコードするであろうことつきとめた。また、この band83 は、他の機能の明らかになったタンパク質の配列のいずれとも相同性を持たないことが明らかになった。今後このタンパク質の脳神経系での機能の解明が期待される。

樹状突起に存在する mRNA は本当にそこで翻訳されるのだろうか、またどのようにその翻訳が制御されているのだろうか、という疑問に答えるためにタンパク質の翻訳のみを、生きた神経細胞内で観察できる系を確立した。エレクトロポレーションによって培養神経細胞に GFP をコードするプラスミドを導入し、翻訳阻害剤と転写阻害剤を時間をずらして投与することにより、顕微鏡上で GFP タンパク質の翻訳に伴う緑色の蛍光が観察できた。この観察方法はタンパク質の翻訳調節機構を解析するための有益な手段となると考えられる。

ニワトリ除神経筋抽出液中に終脳培養神経細胞の神経突起を伸長させる成分が存在することは以前から知られていたが、その伸長活性を担うタンパク質の一つを除神経筋抽出液から生化学的に精製することに成功した。そのタンパク質はアミノ酸配列の分析により、ニワトリヒートショックプロテイン90 (hsp90) と判明した。精製した hsp90 及び、市販の bovine hsp90 は培養したニワトリ終脳神経細胞に対する神経突起伸長活性を持っていることが確認された。

論文審査の結果の要旨

神経間のシナプス形成は、記憶や学習の基本的なメカニズムと考えられている。特定の神経間でシナプスを形成するメカニズムとして、近年、特異的 mRNA が直接シナプスや樹状突起に輸送され、そこで翻訳されるという仮説が提唱され、それを裏付けるような報告も増えてきている。しかしその輸送メカニズムや局所での翻訳調節メカニズムは未だ不明な部分が多く、それらを解明するためにはもっと多くのシナプスや樹状突起に輸送される mRNA を探索し、その分子情報を解析していく必要がある。本研究では、ディファレンシャルディスプレイ法を用いて、ラット前脳の mRNA と前脳から得られたシナプトソームから抽出した mRNA で比較し、シナプス部位に輸送される mRNA を探索した結果をまとめたものである。

まず、シナプトソーム中に ferritin H chain mRNA と未知のタンパク質をコードすると考えられる mRNA の 2 種類が高濃度に存在することを発見した。2 種類の mRNA のうち Ferritin H chain mRNA は培養神経細胞、及び海馬スライスを用いた in situ hybridization による解析で樹状突起に存在することを明らかにした。このことから ferritin H chain mRNA がシナプスへ特異的に輸送される可能性が強く示唆された。もう 1 種類の mRNA である band83 に関してはその全長 cDNA 配列を決定し、およそ 31kDa のタンパク質をコードするであろうことをつきとめた。また、この band83 は、他の機能の明らかになったタンパク質の配列のいずれとも相同性を持たないことが明らかにした。

次に、樹状突起に存在する mRNA が本当にそこで翻訳されるかを決定するために、タンパク質の翻訳のみを、生きた神経細胞内で観察できる系を確立した。エレクトロポレーションによって培養神経細胞に GFP をコードするプラスミドを導入し、翻訳阻害剤と転写阻害剤を時間をずらして投与することにより、顕微鏡上で GFP タンパク質の翻訳に伴う緑色の蛍光を観察した。この観察方法はタンパク質の翻訳調節機構を解析するための有益な手段となると考えられる。

また、ニワトリ除神経筋抽出液中に終脳培養神経細胞の神経突起を伸長させる成分が存在することは以前から知られていたが、その伸長活性を担うタンパク質の一つを除神経筋抽出液から生化学的に精製することに成功した。そのタンパク質はアミノ酸配列の分析により、ニワトリヒートショックプロテイン 90 (hsp90) であった。精製した hsp 90 及び、市販の bovine hsp90 も培養したニワトリ終脳神経細胞に対する神経突起伸長活性を持っていることが確認された。

以上のように、本論文は神経のシナプス形成の分子機構に関して基礎的な研究を行い、神経細胞生物学の分野に新しい知見を与えたものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。。