



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 神経細胞死において発現変動する遺伝子群の探索                                                                                                                                                                                                                                               |
| Author(s)    | 松田, 恵子                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Citation     | 大阪大学, 2001, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/43248">https://hdl.handle.net/11094/43248</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">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >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 まつ だ けい こ  
松 田 恵 子

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 6 4 4 7 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 13 年 6 月 5 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 名 神経細胞死において発現変動する遺伝子群の探索

論 文 審 査 委 員 (主査)  
教 授 遠 山 正 彌

(副査)  
教 授 高 井 義 美 教 授 米 田 悦 啓

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

新たな遺伝子発現誘導を必要とする神経細胞死において発現変動する遺伝子群の網羅的探索を目的に研究を開始した。方法は、我々の研究所で開発された、異なる条件下の細胞で発現している遺伝子の差異を検出する新規技術である RLCS (restriction landmark cDNA scanning) 法を用いた。この方法では発現増強する遺伝子と減弱する遺伝子とを同時に単離できるため、細胞死誘導に必要とされる遺伝子を探索すると同時に、細胞死における遺伝子発現変動によって細胞内で起こりうる molecular events をあわせて考察することを目的に以下の研究を進めた。

### 【方法ならびに成績】

神経様 PC12細胞は NGF 除去により、新たな遺伝子発現誘導を必要とする細胞死が引き起こされる。このモデル系を用いて発現増強する遺伝子と減弱する遺伝子とを同時に単離した。RLCS 法は、それぞれのサンプルから調製してきた mRNA から cDNA を調製し、この cDNA 内の制限酵素サイトをランドマークとして標識した後、2 次元電気泳動し、個々の遺伝子種由来の cDNA を、2 次元平面上のスポットとして表わす、という方法である。このスポットの位置が個々の遺伝子種を表わし、スポットの濃さがその発現量を表わすこととなる。遺伝子種を標識する制限酵素サイトとして 22 種類の 6base recognize enzyme を用い、約 20,000 個のスポットを RLCS ゲル上に示すことに成功した。NGF 除去後 18 時間の神経様 PC12細胞から調製した cDNA と除去前のものから得られたスポットを比較し、濃度変化がみられたスポットのうち発現強度が著明に変動するものについて、cDNA 断片をクローニングし塩基配列を決定した結果、既知遺伝子とともに未知遺伝子をもクローニングすることができた。さらにノザンプロット解析を行うことにより、実際に NGF 除去により発現変動が起こることも確認した。NGF 除去により発現減少のみられたスポットからは、既知のものとしては P75 NGF receptor, Serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor、MAP kinase phosphatase3 (Mkp3) が、未知配列を持つ遺伝子として BG34 が同定された。未知遺伝子 BG34 は培養大脳皮質細胞のカルシウムイオノフォア処理における細胞死においても発現減少する事を明らかにした。既知遺伝子には、MAP kinase phosphatase1 (Mkp1) や cathepsin L のように、NGF 除去あるいは虚血によって遺伝子発現が上昇することが判明しているものが含まれていた。しかし一方で、神経細胞死への関与が現在までに未だ示されていない既知遺伝子が、NGF 除去により発現増強する事が見い出された (転写因子 LRF1、Xin、MyD116 など)。そこで LRF1、Mkp1、MyD116 について更に検討を加え、培養交感神経節細胞からの NGF 除去による神経細胞死や、培養

大脳皮質細胞をカルシウムイオノフォア処理することによる神経細胞死において、発現が増強する事を確認した。また、NGF 除去後18時間に発現増強が見られる未知配列 ML1 の全長 cDNA 配列を決定し、全長349アミノ酸の、キナーゼ様ドメインを持つ新規タンパク質をコードすることを明らかにした。この遺伝子は培養大脳皮質神経細胞のイオノフォア処理による細胞死や交感神経節細胞の NGF 除去による細胞死においても誘導された。しかし、未分化 PC12 細胞における血清除去による細胞死、NIH3T3細胞の MMS 処理による細胞死、IL3 依存性のある32D細胞からの IL3 除去による細胞死では誘導されなかった。このように、この遺伝子の発現増強が神経細胞死の場合だけに特異的に見い出されることから、この遺伝子を NIPK (Neuronal cell death Inducible Putative Kinase) と命名した。

#### 【総括】

細胞死の原因となる NGF 除去により発現が減少する未知遺伝子として BG34を同定した。さらに発現増強する未知遺伝子として NIPK の同定に成功し、この遺伝子が神経細胞での細胞死に特異的に発現上昇することを示した。一方、既知遺伝子ではあるが、これまで神経細胞死への関与が未だ報告されていない遺伝子群についても同時に同定し、発現増強・減少する事を明らかにした。以上のように RLCS 法を駆使する事により、神経細胞死に伴い細胞内で引き起こされる諸現象を、遺伝子レベルで統括的に捉えることが出来た。今後、これら遺伝子相互のコミュニケーションに興味をもたれた。

### 論文審査の結果の要旨

本研究では、RLCS 法により 1 万種以上の遺伝子の発現変動を検討し、神経細胞死に伴い発現上昇、減弱する遺伝子群を検出した。RLCS 法は高い感度、再現性を有しており、また多数の遺伝子の検索が可能であるため、これまで神経細胞死時に発現上昇することが知られていなかった遺伝子の発現変動を検出することに成功した。さらにこれらの遺伝子が神経細胞死において普遍的な機能を有するか否かを明らかにする目的で、異なる刺激による神経細胞死での発現上昇を検討した。その結果、これらの神経細胞死共通に遺伝子発現誘導が観察された遺伝子群を同定し、その中から NIPK、および GADD45g を新規遺伝子として単離した。NIPK は神経細胞特異的に発現上昇するキナーゼ様タンパク質であることが明らかになった。また GADD45g を強制発現することによって神経細胞死を誘導することも示した。

本研究は、遺伝子発現変動という観点で神経細胞死機構の解明を試み、そこから、新規遺伝子の同定、およびその遺伝子の神経細胞死促進効果を報告できた点で学位の授与に値すると考える。