

Title	The accumulation of Arc(an immediate early gene)mRNA by the inhibition of protein synthesis
Author(s)	市川, 久詞
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43880
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	い 市 川 ひさ し 詞
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 7 5 8 2 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	The accumulation of Arc (an immediate early gene) mRNA by the inhibition of protein synthesis (蛋白合成阻害による最初期遺伝子 Arc mRNA の蓄積)
論文審査委員	(主査) 教授 三木 直正 (副査) 教授 谷口 直之 教授 米田 悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) 遺伝子は神経特異的最初期遺伝子としてラットの脳より単離された。Arc mRNA 発現は、ラットの脳でアンフェタミン、けいれんや BDNF などの刺激によって急速に増加し、活性化された樹状突起部位に輸送されることが報告されている。また、Arc のノックアウトマウスは胚令 8.5 日で致死となるので、シナプスの可塑性だけでなく胚形成にも Arc 蛋白質が重要な役割を果たしていることが報告されている。しかしながら、Arc 蛋白質の機能および Arc 遺伝子の発現機構について不明である。

Arc 遺伝子は、細胞内カルシウム増加により誘導されるので、本研究ではカルシウムによる Arc mRNA の発現機構の解析を行った。

[方法および成績]

1. PC12 及び L929 細胞に A23187 (5 μ g/ml) 処理を行ない、ノーザンプロットで Arc mRNA の増加を調べた。PC12 細胞では c-Fos と同様な最初期遺伝子特有の一過性の増加が見られたが、L929 細胞においては一過性の増加ではなく、比較的持続性のある増加が認められた。
2. カルシウム応答エレメントを同定するためにマウスゲノムライブラリーより Arc 遺伝子を単離し、PC12 及び L929 細胞でレポーター遺伝子アッセイを行った。非刺激時では、Arc 遺伝子の 5' 上流のプロモーター活性は SV40 プロモーター活性と同等もしくは 2-3 倍強い活性を示した。しかし、A23187 (5 μ g/ml) 処理によってもレポーター活性の増加を確認することが出来なかった。
3. A23187 (5 μ g/ml) 処理による PC12 及び L929 細胞での Arc 蛋白質の増加をウエスタンプロットで調べた。いずれにおいても有意な蛋白質の増加を確認することは出来なかった。
4. 蛋白質合成阻害剤存在下で細胞に刺激を与えると、最初期遺伝子の過剰発現 (superinduction) が起こることが報告されている。そこで PC12 および L929 細胞において、シクロヘキシミド存在下で A23187 (5 μ g/ml) 処理を行い、ノーザンプロットで過剰発現誘導が起こるかどうかを調べた。PC12 細胞では Arc mRNA の過剰発現が認

められたが、L929 細胞では、シクロヘキシミドの単独処理で Arc mRNA 発現増加が著明にみられ、A23187 を添加しても増強効果を確認することはできなかった。また、シクロヘキシミドによる Arc mRNA 発現は、シクロヘキシミド非存在下での A23187 処理による増加とほぼ同程度であった。

5. 蛋白合成阻害により、mRNA の安定性が増加することが知られている。A23187 (5 μ g/ml) 処理による L929 細胞の蛋白質合成阻害を [35 S] メチオニンと [35 S] システインの蛋白質への取り込みで調べた。蛋白質合成は、強く阻害され、対照の約 15%まで低下した。

[総括]

Arc mRNA 発現は、最初期遺伝子に特有の一過性の増加を示すことが報告されているが、本実験において A23187 処理を行った L929 細胞では、その発現増加が比較的長く持続されることを見出した。また、この増加は蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミドの単独処理でもみられ、かつその増加は A23187 とほぼ同程度であった。シクロヘキシミド存在下で A23187 処理を行っても、最初期遺伝子特有の過剰発現誘導が起こらなかった。さらに、A23187 処理により、L929 細胞の蛋白質合成は、対照レベルの 15%まで阻害された。また、プロモーター領域にカルシウム反応活性は見い出せなかった。以上のことから、細胞内カルシウム上昇により、蛋白質合成が阻害され、Arc mRNA が安定化して、蓄積することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) gene は、神経活動やアンフェタミンなどの様々な刺激に誘導される。しかし、Arc の遺伝子発現機構については不明である。本研究は、カルシウムによる Arc mRNA 発現メカニズムの解析を行った。

カルシウムイオノフォアの A23187 により、PC12 と L929 の両細胞株で、Arc mRNA が誘導されることを見出した。しかし、両者の発現様式には差があり、PC12 細胞では一過性であったが、L929 細胞では比較的持続的な増加であった。L929 細胞の Arc mRNA が、A23187 および cycloheximide によりほぼ同程度に増加すること、A23187 により著明な蛋白合成の阻害が起こることを見出した。このことより、本申請者は、カルシウムの細胞内増加が蛋白質合成の阻害を引き起こし、その結果、mRNA の安定性が向上し、Arc mRNA の蓄積が引き起こされる可能性を示した。本研究は、Arc 遺伝子発現機構の解明に新しい糸口を与える重要なものであり、学位に値するものとする。