



Title	Role of Per1-interacting protein of the suprachiasmatic nucleus in NGF mediated neuronal survival
Author(s)	樹山, 敦子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46144">https://hdl.handle.net/11094/46144</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">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	樹 山 敦 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 19912 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 2 月 20 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	Role of Per1-interacting protein of the suprachiasmatic nucleus in NGF mediated neuronal survival (神経成長因子 NGF による神経細胞生存における PIPS の機能)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 永井 克也 (副査) 教 授 岡本 光弘 教 授 内山 安男

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔 目 的 〕

当研究室で Yeast two-hybrid system を用い新規時計関連分子の探索を行った結果、発見・同定された PIPS (Per1-interacting protein of the suprachiasmatic nucleus) について、これまでに哺乳類の概日時計中枢である SCN に多く発現していること、Cos7 cell に時計分子の 1 つである rat Per1 と共発現させると、両者が核へ移行することを明らかにしてきた。しかし、PIPS には既知のドメインやモチーフ構造が認められず、機能についても不明な点が多い。PIPS の発現を詳しく検討したところ、SCN と連携する脳神経核や網膜、副腎といった神経組織に強く発現していることを認めた。また、胎生期の脳でも発現しており、神経細胞において何らかの機能を担っていることが考えられる。そこで、PIPS を内在的に発現している神経培養細胞 PC12 cell を用いて、神経細胞における PIPS の機能解析を試みた。

#### 〔 方法ならびに成績 〕

##### —方法—

1. PIPS の発現 PIPS N'、C' 末端 100 aa を抗原とし、作製したポリクローナル抗体を用い、Western blot 法によりラットの各組織および PC12 cell での PIPS の発現を解析した。
2. PC12 cell の培養 PC12 cell は 10% FBS、5% HS を添加した DMEM で培養した。NGF (100 ng/ml) 刺激 2 時間前に無血清状態とし、各種阻害剤の添加は NGF 刺激 30 分前に行った。
3. PIPS-GFP Transfection PIPS cDNA 全長を pGFP-C1 vector に組み込み、Lipofection 試薬を用いて PC12 cell に導入、発現させた。
4. RNA interference PIPS 標的配列およびコントロール配列は Invitrogen stealth RNAi design algorithms により決定した。siRNA cocktail は Lipofection 試薬により PC12 cell に導入した。
5. Cell survival assay siRNA により PIPS 発現を抑えた PC12 cell は、各濃度の NGF を添加した無血清培地で 48 時間培養し、DAPI で染色後、無作為に抽出した領域で死細胞の割合を算出した。

—成績—

1. PIPS は SCN との連携が明らかにされている脳神経核や海馬、大脳皮質など、広範囲で発現しており、網膜や副腎といった末梢神経組織でも発現していた。また、脳での発現は胎生 14 日から認められた。
2. PC12 cell 内在性 PIPS は、そのほとんどが細胞質に局在するが、NGF 刺激により一部が核へ移行した。この核移行は、NGF 受容体 TrkA の阻害剤である K252a 処理により抑制された。また、PI3K の阻害剤である Wortmannin 処理によっても PIPS の核移行は消失した。NGF による核移行は PC12 cell に発現させた PIPS-GFP でも確認された。
3. PI3K 活性にかかわる Gab1 と PIPS の結合を双方向の共沈実験で認めた。
4. RNA interference により PIPS の発現が低下した PC12 cell では、無血清状態より誘発される細胞の apoptosis が増大した。また、NGF による apoptosis 抑制効果が低下した。

〔 総 括 〕

PC12 cell には内在的に PIPS が発現しており、ほとんどが細胞質に局在するが、NGF 刺激により一部が核に移行した。この核移行は、TrkA 阻害剤の K252a や PI3K の阻害剤である Wortmannin により抑制された。TrkA 下流で PI3K の活性にかかわる Gab1 と PIPS が結合することは、NGF シグナル系において PIPS が Gab1 と相互作用し、はたらくことを示唆している。PIPS は核移行シグナルを持たないが、Gab1 の核移行シグナルによって Erk1/2 が核移行することが報告されており、PIPS の核移行も Gab1 によることが示唆される。

RNA interference により PIPS 発現が低下した PC12 cell では、apoptosis を起こす細胞が増加した。また、PIPS は中枢・末梢神経組織に発現しており、脳での発現は胎生 14 日から認められた。PIPS の体内分布や胎生期からの発現は Gab1 と類似している。このことから、PIPS が脳・神経組織の発達過程においても機能していることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

本論文は発表者らが哺乳類の概日時計関連遺伝子 *rper1* の helix-loop-helix と PAS domain を bait として用いて Yeast two-hybrid system でラット脳・視床下部ライブラリーから rPER1 と結合する蛋白質をコードする遺伝子として同定した PIPS (Per1-Interacting Protein of the Suprachiasmatic nucleus) の NGF による神経細胞生存維持作用における役割を副腎髄質由来の PC12 細胞にて解析したものである。本論文は PC12 細胞において NGF が PIPS を核内に移行させることを発見し、その機構には TrkA、PI3 kinase、Gab1 などが関与することを明らかにし、PIPS の RNAi 法による発現阻害が NGF による神経生存維持効果を抑制することを明らかにした。本論文は神経の生存維持機構の解明に貢献するものであり、博士（医学）の学位授与に値する。