



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	https://hdl.handle.net/11094/46144
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	き樹 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 と共に発現させると、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〕

一方法一

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。

一成績一

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、大脑皮質など、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髓質由来の 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。