

学位論文題名

新規の神経分化因子 T A 20 の研究：

クローニング、発現および機能

学位論文内容の要旨

100 nM TPA (Protein kinase C (PKC) 活性化薬) および、1 mM diBu-cAMP (膜透過性 cAMP 誘導体) の、ニューロンモデル NG108-15 細胞に対する突起伸展効果を検討した。TPA あるいは diBu-cAMP 単独処理によるものと比較して、両薬物処理によって、400 μ m 以上の長い突起の伸展が強く引き起こされた。この突起伸展は 72 時間の薬物処理を必要とし、また処理後 72 時間を境とし、伸展突起のさらなる伸展が認められた。また、両薬物処理によって伸展した突起のみが薬物除去後も退縮しなかった。10 nM staurosporine (protein kinase 阻害薬) 存在下では伸展がほぼ完全に抑制された。また、対照群ではほぼ 24 時間周期で認められた [3 H]thymidine 取り込みが、両薬物同時処理においては 48 時間以降、完全に抑制された。以上の結果より、TPA + diBu-cAMP 72 時間処理は NG108-15 細胞の神経分化を誘導することが示唆された。

NG108-15 細胞において TPA と diBu-cAMP 同時処理では、それぞれを単独処理した場合と比較して GAP-43 mRNA の強い誘導が引き起こされた。ラット GAP-43 cDNA を NG108-15 細胞へトランスフェクションし、持続的に GAP-43 を発現する、NG-G11 を作製したところ、薬物未処理下では形態変化を示さなかった。NG108-15 細胞において diBu-cAMP 72 時間処理により伸展した突起は、その後薬物を培地から除去すると著しく退縮したのに対し、NG-G11 細胞においては diBu-cAMP 除去後も突起が維持された。この時の GAP-43 mRNA は、NG108-15 と NG-G11 両細胞において、diBu-cAMP 72 時間処理後に各細胞の未処理時の約 2 倍量に増加し、NG-G11 細胞ではトランスフェクションによる GAP-43 mRNA の定常量の加算があるため、常に NG108-15 細胞の薬物未処理時の 2 倍以上の発現量を維持していた。次に、高 K^+ (脱分極性) 刺激誘発 acetylcholine (ACh) 放出量を検討したところ、1 mM diBu-cAMP 72 時間処理後の NG108-15 および NG-G11 細胞のどちらにおいても未処理細胞と比較して約 4 倍の増加が示された。その後 diBu-cAMP を除去して 24 時間後の放出量は、NG108-15 細胞では 60.9% の減少が認められたが、NG-G11 では 31.9% の減少にとどまった。

これまでの結果より、NG108-15 細胞において TPA + diBu-cAMP 処理により、より長い突起の伸展が引き起こされ、その突起は薬物除去後も維持されること、ならびにその突起維持に GAP-43 が関与する可能性が示唆された。しかしながら、GAP-43 は突起伸展それ自体には積極的に関与しないことから、TPA + diBu-cAMP 処理により誘導される GAP-43 とは異なる分化因子が存在すると推定された。そこで、differential screening 法により、両薬物処理により強く誘導される因子、T A 20 cDNA を単離した。

T A 20 は全長 1823 bp よりなり、ホモロジーサーチにより、5' 側約 670 bp は未知の配列であり、そこから 3' 末端まではマウスのミトコンドリアの cytochrome b (cyt. b) の全長と 9 bp 異なるのみの高い相同性を有することが

分かった。そこでT A 2 Oの gene としての局在について検討した。NG108-15 細胞から、核とミトコンドリアを分取し、各画分より genomic DNA を抽出し、Southern blotting したところ、5' 側 unknown region 657 bp のプローブに結合するバンドは核 DNA にのみ存在した。一方、cyt. b homology region である3' 側 1166 bp や全長 1823 bp をプローブにした場合は、核にもミトコンドリアにも強く結合するバンドが多数検出された。NG108-15 細胞の核画分を用いた nuclear run-off 法により、T A 2 O mRNA が核内で転写されていることが示された。また、T A 2 Oの unknown region と cyt.b homology region の連結部を増幅させるプライマーを用い、NG108-15 細胞の RNA を鋳型にした RT/PCR を行なった結果、T A 2 O DNA が細胞内で実際に連なって存在していることが示された。以上の結果より、T A 2 O gene は核 DNA であることが示され、それにより、細胞質内翻訳機構によって翻訳されていることも予想された。In vitro translation の系において、T A 2 O gene から約 20 kDa の蛋白質が生成された。T A 2 O cDNA の配列上、20 kDa 前後の蛋白質へ翻訳される読み枠は 748 - 1308 bp のみであることから、この部分をT A 2 Oの open reading frame と推定した。ここから予想されるアミノ酸配列は、全く新規のものであった。

NG108-15 細胞におけるT A 2 O mRNA の発現を、Northern blotting により検討したところ、100 nM TPA あるいは 1 mM diBu-cAMP 単独処理によっては検出されなかったが、両薬物処理 72 時間後に約 2 倍の誘導が認められた。ラット各組織におけるT A 2 O mRNA の発現量を、RT/PCR 法により検討したところ、胎生19日齢では小脳、心臓に高く、生後21日齢では小脳、海馬、肺に高く、大脳皮質や肝臓にも発現していることが示された。

T A 2 O cDNA を細胞にトランスフェクションしてその形態に及ぼす影響を検討した。非移入細胞ならびにベクターのみを移入した細胞では何の変化も認められなかったが、T A 2 Oのトランスフェクタントでは薬物未処理下で長い突起を著しく伸展するとともに、増殖を停止した。その効果は、T A 2 O mRNA の発現量と比例していた。NG108-15 細胞の親株であるマウスニューロblastoma N18TG-2 は、薬物処理によるT A 2 O mRNA 発現において NG108-15 細胞と同様の挙動を示し、トランスフェクタントにおいても同様の突起伸展効果を現した。しかしラットグリオーマ C6Bu-1 細胞では、定常時におけるT A 2 Oの発現は他の細胞と同様に認められるものの、薬物処理によるT A 2 Oの増加もトランスフェクタントにおける形態変化も見られなかった。よって、T A 2 Oは神経細胞においてその分化に関与する因子であり、非神経細胞を神経様に転換する作用は有していないものと思われる。

T A 2 Oを glutathione S-transferase (GST) との融合蛋白質として *E. coli* 内で発現させた後、GST に対するアフィニティカラムで精製した画分中には、約 58 kDa の融合蛋白質のシングルバンドが検出された。

以上、本研究において、1) TPA と diBu-cAMP の 72 時間同時処理は、突起伸展や増殖停止などの神経分化を強く引き起こし、両薬物処理によって発現量が多くなる GAP-43 が、伸展した突起の維持と、伝達物質放出促進に関与している、2) 両薬物 72 時間処理により強く誘導される新規因子T A 2 O cDNA は、神経細胞において、突起伸展ならびに細胞増殖抑制作用を有すること、3) T A 2 O gene は核に存在し、mitochondrial DNA-like sequence を有し、分子量約 20 kDa の新規の蛋白質へと翻訳されること、を見い出した。T A 2 Oの神経分化への作用機序や細胞内局在などについて、今後の検討、解明が待たれる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野 村 靖 幸
副 査 教 授 栗 原 賢 三
副 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 助 教 授 徳 光 幸 子

学 位 論 文 題 名

新規の神経分化因子 T A 20 の研究：

クローニング、発現および機能

申請者、東田千尋は、神経細胞の分化に関する薬理学的、生化学的、分子生物学的研究を進めてきたが、今回「新規の神経分化因子 T A 20 の研究：クローニング、発現および機能」という題目の学位論文を申請してきた。

神経系の分化、成熟には数多くの因子が関与して、軸索の伸長、シナプス形成、神経伝達物質の合成と放出、各種イオンチャネルの増加などといった現象が生じるが、どのような因子がどのような機構で神経分化を引き起こすかについては明確にされていない。本論文は、神経芽細胞腫と神経膠細胞腫との雑種細胞である NG108-15 細胞を用いて、神経分化に関与する新しい因子の単離、発現、構造、作用機構について解析した研究であり、以下の新知見を得ている。

NG108-15 細胞に 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA、プロテインキナーゼ C 活性化薬) と dibutyryl cAMP (diBu-cAMP、プロテインキナーゼ A 活性化薬) を添加し、その神経突起伸展や細胞増殖に対する効果を検討したところ、両薬物の同時処理においてのみ長い突起伸展が認められること、伸展した突起が維持されること、さらに細胞増殖が停止することを見出した。この事実から、プロテインキナーゼ C とプロテインキナーゼ A の両キナーゼがシナプス形成に重要な役割を担うことを示唆した。

Growth-associated protein-43 (GAP-43) は、軸索伸展や標的ニューロンの認識と到達に關与する growth cone (軸索の終長端) に高濃度に存在する酸性蛋白質であり、神経分化やシナプス形成におけるその役割が注目されている。申請者は、NG108-15 細胞において TPA と diBu-cAMP の同時処理が強く GAP-43 mRNA を発現させることを示した。また GAP-43 cDNA をトランスフェクトした NG108-15 (NG-G11) 細胞では、diBu-cAMP 処理により伸展した短い突起が維持されること、またアセチルコリン (ACh) の放出が増加することを示した。このことより、GAP-43 が増加すると伸展突起が維持され、これが ACh 放出を促進する構造維持に関わると推定した。

上述したように、申請者は TPA と diBu-cAMP の同時処理により長い突起の伸長、増殖停止、薬物除去後の突起維持が引き起こされることを見出し、さらに、GAP-43 は長い突起の伸展や細胞増殖には關与しないことを初めて明らかにした。このことを基礎に申請者は、TPA と diBu-cAMP 同時処理でのみ強く発現する因子が、両薬物処理特異的な神経機能を担う因子であると考え、この因子を探索するため、TPA と diBu-cAMP 処理と diBu-cAMP 単独処理細胞からそれぞれ poly(A)⁺ RNA を抽出し、differential screening 法により両薬物処理においてのみ発現しているクローン T A 2 O を単離した。T A 2 O のシーケンシングを行ったところ、T A 2 O cDNA は 1823 塩基対よりなること、マウスミトコンドリアの cytochrome b (cyt. b) と高い相同性を有するが NG108-15 細胞の核内に存在しそこで転写されることを示した。また、*in vitro* translation により T A 2 O cDNA から約 20 kDa の蛋白質が生成されることを示した。これらの結果より、T A 2 O 遺伝子は核内 DNA として cyt. b とは異なる未知蛋白質へと翻訳されることを示唆した。

次に、T A 2 O mRNA の細胞および組織における発現に關し検討した。まず、NG108-15 細胞において、TPA と diBu-cAMP の両薬物処理によってのみ T A 2 O mRNA が2倍に誘導された。またラット胎生19日齢では、小脳と心臓に、生後21日齢では、小脳、海馬、肺に高く、大脳皮質や肝臓にも発現していることを示した。

T A 2 O の神経分化における機能を明らかにするため、T A 2 O

cDNA を NG108-15 細胞に移入したところ、長い突起の著しい伸展と増殖停止を認めた。また NG108-15 細胞の親株への T A 2 0 cDNA のトランスフェクションの結果から、T A 2 0 はグリア細胞では機能を有せずニューロンの分化因子として機能することを示唆した。

さらに、T A 2 0 の蛋白質としての生成、発現について、*E.coli* 細胞内発現系を用いて検討した。T A 2 0 を glutathione S-transferase (GST) との融合蛋白質として *E.coli* 内で発現させ、GST のアフィニティカラムによる本蛋白質の精製を行ったことにより、T A 2 0 の抗体作製やそれを利用した T A 2 0 の免疫細胞化学的研究への応用の道を切り開いた。

以上のように、本論文は新規の神経分化因子 T A 2 0 の発見、単離に成功しその一次構造の解析を行い、さらに細胞や組織での発現、機能に関し新知見を提示しており、博士 (薬学) の学位を受けるに十分値すると認めた。