

学位論文題名

Radiation Induction of the Receptor Tyrosine Kinase  
Gene Ptk - 3 in Normal Rat Astrocytes

(放射線による正常ラットアストロサイトに  
おけるチロシンキナーゼ Ptk-3 の誘導)

学位論文内容の要旨

放射線による中枢神経系の障害は脳腫瘍の放射線治療にとって重大な問題である。組織学的には主にグリア系細胞と血管内皮細胞の障害が放射線障害の原因と考えられている。しかし、詳細な病態は依然として明かにされていない。

正常の中枢神経系の発達、機能はそれを構成する細胞どうしの相互関係によって営まれており、多くの成長因子やサイトカインが関与している。外傷、虚血あるいは薬剤などによる中枢神経系の障害には様々な分子の発現が知られており、一般にこれらの分子は中枢神経系の障害から細胞を回復させるために重要な役割を果たしていると考えられている。多くの実験系において放射線もまた同様に成長因子やサイトカインをコードする遺伝子の発現を誘導することが知られている。中枢神経系の放射線に対する反応にも遺伝子の発現の変化が深く関わっている可能性があり、今回我々はダイファレンシャルディスプレイというPCR(遺伝子増幅法)をもちいた新しい方法で放射線によって培養ラットアストロサイトに誘導される遺伝子を同定した。

胎生21日のラット脳からアストロサイトを分離培養し、10 Gyの放射線照射後メッセンジャーRNA(mRNA)を分離した。0.1ug mRNAをT12MCをプライマーとしてcDNAをつくり、T12MCと10-mer(5'-GACCGCTTGT-3')にてPCRを行なった。PCR産物は6%シークエンスゲルで電気泳動し、オートラジオグラフィ後ゲルから目的のバンドを切り出しノーザンプロットとcDNAライブラリースクリーニングのプロープとして用いた。

ダイファレンシャルディスプレイにより2回の独立した実験にて得られたバンドは10 Gyの放射線照射後に1時間後、24時間後にみられたものである。このバンドをプロープとして用いたノーザンプロットでは放射線照射後30分で誘導がみられ、さらに放射線量との関係を見ると5 Gy 4時間で最大の誘導がみられた。ラット脳アストロサイトのcDNAライブラリーをスクリーニングし、BLAST Serverによるアミノ酸ホモロジー解析の結果、この遺伝子は新しいレセプターチロシンキナーゼとして最近スペインの研究グループによってクローニングされたptk-3と呼ばれる遺伝子と同一であることが判明した。

このptk-3という遺伝子は910個のアミノ酸からなる蛋白質をコードし、アミノ酸配列

の解析から細胞膜貫通型のレセプターチロシンキナーゼであることが予想された。近年多くのレセプターチロシンキナーゼが次々とクローニングされているが、最もその構造上特徴的な点は、細胞外に凝固因子である第八因子に似たアミノ酸配列をもち、細胞膜直下には分子構造に柔軟性をもたらすといわれるグリシンやプロリンといったアミノ酸の多い点である。この特異的な構造をもつチロシンキナーゼが放射線によって誘導されることの意義は不明である。しかし、放射線によって細胞核内のシグナルが細胞膜上へレセプターの誘導という形で伝わるという非常に興味ある結果が得られた。さらにこの分子は細胞外に凝固因子である第八因子に似たアミノ酸配列をもつことから、ほかの細胞との間で細胞間情報伝達、あるいは細胞どうしの接着に関わることが推測され、放射線照射後にみられる放射線壊死あるいは組織修復の過程における様々な細胞の働きを解明するうえで意義ある情報をもたらすと考えられる。

ptk-3のもう一つの構造的特徴である細胞膜直下のグリシンやプロリンといったアミノ酸配列の多い部分にはライブラリーをスクリーニングする過程で111塩基程短いトランスクリプトが発見されptk-3には少なくとも2種類のトランスクリプトが存在することが判明した。これら2種類のトランスクリプトはオールタナティブスプライスにより発現が調節されているものと考えられる。111塩基欠く短いトランスクリプトは細胞内部のチロシンキナーゼドメインとその基質との空間的相互関係が長いトランスクリプトと異なることが推測され、2種類のトランスクリプトはチロシンリン酸化酵素としての機能上で異なる活性をもつものと思われる。2種類のトランスクリプトの意義を解明する目的で、培養アストロサイト、成熟ラット脳、胎児ラット脳の各々から抽出したmRNAを用いスプライスをうける部分をRT-PCR(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)による解析を試みた。短い型のトランスクリプトは細胞膜直下の37アミノ酸を欠き、主に胎児ラット脳で発現がみられ、長い型のトランスクリプトは成熟ラット脳でより発現していた。このことより脳の発達の過程においてptk-3のオールタナティブスプライスによる調節が関与している可能性が示唆された。また、培養アストロサイトでは、さらに長い型のトランスクリプトが優位に発現していたが、このRT-PCRでは放射線によるスプライスパターンの変化は見られなかった。

今後この蛋白質の放射線による中枢神経系細胞障害時における役割及びオールタナティブスプライスの意義についてさらに検討することにより、放射線の生物学的影響に関してより詳細な知見が得られ、中枢神経系の放射線治療において基礎的な面での貢献をもたらすことが期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 細 川 眞澄男

学 位 論 文 題 名

## Radiation Induction of the Receptor Tyrosine Kinase Gene Ptk - 3 in Normal Rat Astrocytes

(放射線による正常ラットアストロサイトに  
おけるチロシンキナーゼ Ptk-3 の誘導)

放射線による中枢神経系の障害は脳腫瘍の放射線治療にとって重大な問題である。組織学的には主にグリア系細胞と血管内皮細胞の障害が放射線障害の原因と考えられている。しかし、詳細な病態は依然として明かにされていない。

正常の中枢神経系の発達、機能はそれを構成する細胞どうしの相互関係によって営まれており、多くの成長因子やサイトカインが関与している。外傷、虚血あるいは薬剤などによる中枢神経系の障害には様々な分子の発現が知られており、一般にこれらの分子は中枢神経系の障害から細胞を回復させるために重要な役割を果たしていると考えられている。多くの実験系において放射線もまた同様に成長因子やサイトカインをコードする遺伝子の発現を誘導することが知られている。中枢神経系の放射線に対する反応にも遺伝子の発現の変化が深く関わっている可能性があり、今回我々はディファレンシャルディスプレイというPCR（遺伝子増幅法）をもちいた新しい方法で放射線によって培養ラットアストロサイトに誘導される遺伝子を同定した。

胎生21日のラット脳からアストロサイトを分離培養し、10 Gyの放射線照射後メッセンジャーRNA(mRNA)を分離した。0.1ug mRNAをT12MCをプライマーとしてcDNAをつくり、T12MCと10-mer(5'-GACCGCTTGT-3')にてPCRを行なった。PCR産物は6%シーケンスゲルで電気泳動し、オートラジオグラフィ後ゲルから目的のバンドを切り出しノーザンプロットとcDNAライブラリースクリーニングのプロープとして用いた。

ディファレンシャルディスプレイにより2回の独立した実験にて得られたバンドは10 Gyの放射線照射後に1時間後、24時間後にみられたものである。このバンドをプロープとして用いたノーザンプロットでは放射線照射後30分で誘導がみられ、さらに放射線量との関係を見ると5 Gy 4時間で最大の誘導がみられた。ラット脳アストロサイトのcDNAライブラリーをスクリーニングし、BLAST Serverによるアミノ酸ホモロジー解析の結果、この遺伝子は新しいレセプターチロシンキナーゼとして最近スペインの研究グルー

プによってクローニングされたptk-3と呼ばれる遺伝子と同一であることが判明した。

このptk-3という遺伝子は910個のアミノ酸からなる蛋白質をコードし、アミノ酸配列の解析から細胞膜貫通型のレセプターチロシンキナーゼであることが予想された。近年多くのレセプターチロシンキナーゼが次々とクローニングされているが、最もその構造上特徴的な点は、細胞外に凝固因子である第八因子に似たアミノ酸配列をもち、細胞膜直下には分子構造に柔軟性をもたらすといわれるグリシンやプロリンといったアミノ酸の多い点である。この特異的な構造をもつチロシンキナーゼが放射線によって誘導されることの意義は不明である。しかし、放射線によって細胞核内のシグナルが細胞膜上へレセプターの誘導という形で伝わるという非常に興味ある結果が得られた。さらにこの分子は細胞外に凝固因子である第八因子に似たアミノ酸配列をもつことから、ほかの細胞との間で細胞間情報伝達、あるいは細胞どうしの接着に関わることが推測され、放射線照射後にみられる放射線壊死あるいは組織修復の過程における様々な細胞の働きを解明するうえで意義ある情報をもたらすと考えられる。

ptk-3のもう一つの構造的特徴である細胞膜直下のグリシンやプロリンといったアミノ酸配列の多い部分にはライブラリーをスクリーニングする過程で111塩基程短いトランスクリプトが発見されptk-3には少なくとも2種類のトランスクリプトが存在することが判明した。これら2種類のトランスクリプトはオールタナティブスプライスにより発現が調節されているものと考えられる。111塩基欠く短いトランスクリプトは細胞内部のチロシンキナーゼドメインとその基質との空間的相互関係が長いトランスクリプトと異なることが推測され、2種類のトランスクリプトはチロシンリン酸化酵素としての機能上で異なる活性をもつものと思われる。2種類のトランスクリプトの意義を解明する目的で、培養アストロサイト、成熟ラット脳、胎児ラット脳の各々から抽出したmRNAを用いスプライスをうける部分をRT-PCR(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)による解析を試みた。短い型のトランスクリプトは細胞膜直下の37アミノ酸を欠き、主に胎児ラット脳で発現がみられ、長い型のトランスクリプトは成熟ラット脳でより発現していた。このことより脳の発達過程においてptk-3のオールタナティブスプライスによる調節が関与している可能性が示唆された。また、培養アストロサイトでは、さらに長い型のトランスクリプトが優位に発現していたが、このRT-PCRでは放射線によるスプライスパターンの変化は見られなかった。今後この蛋白質の放射線による中枢神経系細胞障害時における役割及びオールタナティブスプライスの意義についてさらに検討することにより、放射線の生物学的影響に関してより詳細な知見が得られ、中枢神経系の放射線治療において基礎的な面での貢献をもたらすことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。