

氏 名	みの しま たけ とも 養 島 豪 智
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2168 号
学位授与の日付	平 成 11 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学位論文題目	Structural Organization of the Mouse Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 3 Gene and its Regulation by Growth Factors in Cultured Cortical Astrocytes (マウス代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ3遺伝子の構造と、大脳皮質ア ストロサイト初代培養における増殖因子によるその調節に関する研究)

論文調査委員 (主 査)
教 授 影山龍一郎 教 授 鍋島陽一 教 授 中西重忠

論 文 内 容 の 要 旨

代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) はシナプスの可塑性、修飾において重要な働きを担うことが明らかにされてきているが、遺伝子発現調節機構に関してはほとんど知られていない。

mGluR 3 は mGluR 5 と同様に神経細胞だけでなくグリア細胞にも発現しており、生後早い時期に多く発現するという特徴をもつ。しかし、特異的なアゴニスト、アンタゴニスト、抗体などが存在しないために、神経細胞・グリア細胞における mGluR 3 の機能と調節を詳細に研究することは困難な状況にある。mGluR 3 発現調節機構を探るため、ゲノム DNA クローニングと 5' -RACE, 3' -RACE によりマウス mGluR 3 遺伝子の構造を明らかにし、アストロサイト初代培養における増殖因子による mGluR 3 mRNA 発現調節を定量的 RT-PCR 法により調べた。

マウス mGluR 3 遺伝子は 6 つのエクソンからなる 95 kb 以上の大きな遺伝子であった。mGluR の中で他に全遺伝子構造が明らかになっているのはヒト mGluR 6 遺伝子であり、全長 16,742 bp, 10 個のエクソンからなる。比較により、エクソン/イントロン境界が 3 カ所で相当する部位に存在することが明らかになった。

第 1 エクソンとその前のプロモーター領域は続く蛋白質コーディング領域から少なくとも 20 kb 離れている。想定されるプロモーター領域の塩基配列上に転写因子認識部位として可能性のある箇所が複数見出されたが、mGluR 3 特有の発現を直接説明しうるものはなかった。

ラット大脳皮質 I 型アストロサイト初代培養において、bFGF, EGF, TGF- α 刺激により mRNA・蛋白質レベルで mGluR 5 が上昇することが報告されていたことから、この系を用いて mGluR 3 の発現変化を調べた。

マウス大脳皮質 I 型アストロサイト初代培養における mGluR 3 mRNA 発現レベルは非常に低く、従来の RNA プロッティングでは検出不可能であった。この微量分子の変化を調べる方法として定量的 RT-PCR 法を用いた。用いた RNA 中に含まれる当該遺伝子 mRNA 量にほぼ比例した量の RT-PCR 産物が得られる条件下で測定を行った。

mGluR 5 と同様に、bFGF, EGF (TGF- α) 刺激により mGluR 3 mRNA レベルは上昇した。G 3 PDH では変化は認められず、この上昇が特異的であることが示された。

この上昇に対する効果は EGF の方が bFGF より大きいものであった。(EC₅₀ は EGF で 1.5 ng/ml, bFGF で 5.5 ng/ml であった。)

マウス mGluR 3, ラット mGluR 5 ゲノム DNA の 5' 側塩基配列に、両者の協調的な調節を説明しうる相同領域や保存された配列は見出されなかった。

TGF- α などの増殖因子は生後早い時期に高い発現を示し、mGluR 3, mGluR 5 に共通した生直後の高発現に関与してい

る可能性がある。

mGluR 3 はアストロサイトの増殖を抑制し、mGluR 5 は促進するとの報告があり、両者の同調した調節はそれぞれの異なる情報伝達系を通じて、増殖や成長といったアストロサイトの機能平衡を計る上で重要な働きをしていると考えられる。

アストロサイトに発現するグループ 2 mGluR (おそらく mGluR 3) は、アゴニストによる活性化の結果、TGF- β の産生・放出を介して隣接する神経細胞を興奮毒性から保護することに関わっていることが報告されている。本研究の結果と合わせ、mGluR 3 は特殊な増殖因子の産生に関与しているだけでなく、それによる調節も受けていることが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究はマウス代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ 3 (mGluR 3) の遺伝子の構造と増殖因子による発現調節を解析したものである。

遺伝子の単離と 5' - , 3' -RACE の組み合わせにより、マウス mGluR 3 遺伝子は 6 個のエクソンからなり全長 95 キロ塩基対 (kb) 以上に及び、第 1 エクソンとその前のプロモーター相当領域は続く蛋白質コーディング領域から 22 kb 以上離れていることが示された。mGluR 3 と mGluR 5 は神経細胞だけでなくグリア細胞にも発現し、生後早い時期に高発現を示すが、両者は異なる情報伝達系に共役しており培養アストロサイトの機能では相反する役割を担っている。培養アストロサイトに bFGF, EGF, TGF- α を加えると、mGluR 5 同様、mGluR 3 も mRNA レベルが有意に上昇し、その上昇に対する効果は EGF の方が bFGF より大きいことが示され、両者が増殖因子によって協調的な正の調節を受けていることが示された。

以上の研究は神経情報伝達の機構の解明に貢献し、神経機能の理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 11 年 11 月 9 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。