

氏 名	佐 藤 まさ あき さとう まさあき
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2395 号
学位授与の日付	平成 13 年 5 月 23 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	NMDA receptor stimulation and brain-derived neurotrophic factor up-regulate Homer 1a mRNA via the mitogen-activated protein kinase cascade in cultured cerebellar granule cells (培養小脳顆粒細胞において NMDA 受容体刺激と脳由来神経栄養因子は MAP キナーゼカスケードを介して Homer 1a mRNA を誘導する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 笹 井 芳 樹 教 授 成 宮 周 教 授 中 西 重 忠

論 文 内 容 の 要 旨

Homer 1a は神経活動依存的にその発現が急速に増加する最初期遺伝子 (IEG) の一つとして単離され、代謝型グルタミン酸受容体の細胞内領域に結合することが示された分子である。Homer 1 遺伝子からは alternative splicing により誘導型の Homer 1a と構造型の Homer 1b/c の 3 つのアイソフォームを生じるが、神経活動による Homer 1a 発現の選択的調節機構は明らかでない。そこで培養小脳顆粒細胞を用いてこの mRNA の発現機構の解析を行った。

はじめに、生後 8 日令のマウスより調製した培養小脳顆粒細胞の RNA プロットング解析を行ったところ、Homer 1 の全てのアイソフォームの発現が確認された。これらの細胞をグルタミン酸 ($10\mu\text{M}$) で刺激すると、刺激後 4 時間に Homer 1a mRNA の増加が最大となった。代表的な IEG である c-fos mRNA はグルタミン酸刺激後 1 時間以内にピークとなったことから、Homer 1a mRNA の誘導は c-fos のような転写因子をコードする IEG とは異なる時間変化を示すことが明らかになった。続いて、グルタミン酸による Homer 1a mRNA の誘導機構を解析した。EGTA (2mM) および、NMDA 受容体のアンタゴニストである AP5 ($100\mu\text{M}$) および MK-801 ($10\mu\text{M}$) の処置がグルタミン酸による Homer 1a mRNA の誘導を阻害したことから、Homer 1a mRNA の誘導に NMDA 受容体を介したカルシウム流入が必要であることが明らかになった。さらに、RNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D ($10\mu\text{g/ml}$) の処置がグルタミン酸による Homer 1a mRNA の誘導を阻害したこと、および Homer 1a mRNA の安定性がグルタミン酸刺激により変化しなかったことから、この誘導は mRNA の安定化ではなく転写活性化によるものであることが示された。また、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド ($30\mu\text{g/ml}$) はグルタミン酸による Homer 1a mRNA の誘導を阻害しなかったことから、Homer 1a mRNA の誘導に他のタンパク質の合成は必要でないことが示された。

次に、種々のタンパク質キナーゼ阻害剤を用いて Homer 1a mRNA の誘導に関わる細胞内シグナル経路を検討した。MAP キナーゼキナーゼ阻害剤である PD98059 ($30\mu\text{M}$) と U0126 ($5\mu\text{M}$) はグルタミン酸による Homer 1a mRNA の誘導を抑制したことから、この誘導には MAP キナーゼカスケードの活性化が必要であることが示された。この経路をさらに検討するために、グルタミン酸刺激による MAP キナーゼのリン酸化をウエスタンブロットングおよび免疫細胞化学で調べたところ、刺激後 5 分をピークとした MAP キナーゼのリン酸化の増加がみられた。また、小脳顆粒細胞において MAP キナーゼを活性化することで知られる BDNF (100ng/ml) で細胞を刺激した場合も、MAP キナーゼカスケード依存的な Homer 1a mRNA の誘導がみられたことから、Homer 1a mRNA の発現調節における MAP キナーゼの中心的な役割が明らかとなった。

以上の結果から、培養小脳顆粒細胞における Homer 1a mRNA の発現調節機構は、NMDA 受容体刺激と BDNF の 2 つの異なる細胞外からの刺激が、MAP キナーゼの活性化を介して Homer 1a mRNA の転写活性化をひき起こすものと結論づけられた。

論文審査の結果の要旨

Homer 1a は、けいれんや長期増強などの神経活動によりその発現が急速に増加する最初期遺伝子の一つとして単離され、代謝型グルタミン酸受容体の細胞内領域に結合することが示された分子である。本研究は培養小脳顆粒細胞を用いて Homer 1a mRNA の発現調節機構の解析を行ったものである。

生後8日令のマウスより調製した培養小脳顆粒細胞をグルタミン酸で刺激すると、Homer 1a mRNA の選択的な増加がみられた。種々の阻害剤を用いた実験から、グルタミン酸による Homer 1a mRNA の誘導は mRNA の安定化ではなく転写活性化によるものであることを示し、さらに NMDA 受容体を介したカルシウム流入と MAP キナーゼカスケードの活性化が必要であることを明らかにした。また、小脳顆粒細胞において MAP キナーゼを活性化する BDNF 刺激も Homer 1a mRNA の誘導をひきおこすことを示した。以上の結果から、培養小脳顆粒細胞における Homer 1a mRNA の発現調節機構は、NMDA 受容体刺激と BDNF の2つの異なる細胞外からの刺激が、MAP キナーゼの活性化を介して Homer 1a mRNA の転写活性化をひきおこすものと結論づけられた。以上の研究は、神経活動による遺伝子発現機構の解明に貢献し、中枢神経系の機能とその異常に関して医学・神経科学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13年3月29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。