

審査の結果の要旨

氏名 富岡正典

本研究は神経変性疾患に伴って起きる神経細胞死の具体的なメカニズムを明らかにするために、カスパーゼ阻害タンパク質 (p35) を発生後の神経細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを用いて、興奮性アミノ酸 (カイニン酸) により誘導される神経細胞死のメカニズムの解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. カスパーゼは発生段階の神経細胞死に必要不可欠で、カスパーゼ遺伝子を欠損させたマウスは発生期に致死であることから、p35cDNAを発生後の神経細胞に特異的に発現するCaMKII promoterの下流に接続した結果、p35遺伝子を持つトランスジェニックマウスが得られることが示された。またトランスジェニックマウスの海馬においてp35のmRNA及びタンパク質が発現していることが、RT-PCR法及びWestern blot法によってそれぞれ示された。
2. カイニン酸をトランスジェニックマウスの作製に用いたC57BL/6Crマウスの脳内に直接注入した結果、カイニン酸投与4時間後の海馬CA1, CA3, CA4領域の神経細胞で、神経細胞死に特徴的である細胞体の凝縮が誘導されることがクレシルバイオレット染色によって示された。また、カイニン酸投与8時間後には同領域において、神経細胞死のマーカーであるDNAの切断が起きていることがTUNEL染色法によって示された。
3. カイニン酸誘導神経細胞死における、細胞死実行プロテアーゼであるカスパーゼの神経細胞での活性化について、カスパーゼの細胞内基質であるアクチンタンパク質のカスパーゼによる切断部位を認識する抗体を用いて免疫組織染色を行った結果、カイニン酸投与4時間後の海馬CA3領域の神経細胞においてカスパーゼが活性化されていることが示された。また、同様の検討をp35トランスジェニックマウスを用いて行った結果、カスパーゼの活性がp35タンパク質によって抑制されることが示された。

4. p35トランスジェニックマウスを用いて、カイニン酸誘導神経細胞死におけるカスパーゼの関与を検討した結果、神経細胞死に伴って起きる細胞体の凝縮及びDNAの切断の抑制は認められなかった。したがって、カイニン酸の脳内直接投与により誘導される神経細胞死にはカスパーゼが直接関与していないと考えられた。

5. カイニン酸誘導神経細胞死におけるカルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインの活性化について、カルパインの脳内基質であるスペクトリンタンパク質のカルパインによる切断部位を認識する抗体を用いて免疫組織染色を行った結果、カイニン酸投与4時間後の海馬神経細胞において神経細胞死誘導部位と相関してカルパインが活性化されていることが示された。また、Western blotによりカルパインが神経細胞死の初期段階で活性化していることが示された。よって、カルパインが神経細胞死の実行過程に関与している可能性が示唆された。

以上、本論文はトランスジェニックマウスを用いた解析から、興奮性アミノ酸のマウス脳内直接投与により誘導される神経細胞死における細胞内プロテアーゼの作用を明らかにした。発生後の神経細胞死における細胞内プロテアーゼの関与については、これまで未知な部分が多く存在していたことから、本研究は神経変性疾患に伴って起きる神経細胞死のメカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。