

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 李 知恩

神経細胞はエネルギー要求度ならびに酸素への依存度が高く、神経細胞傷害では、虚血に代表される酸素やグルコース供給の障害に基づいた発症機序や病態が注目され、検討されている。ミトコンドリア DNA (mtDNA) は環状 DNA で、生体のエネルギー産生系である酸化的リン酸化、ATP 合成の電子伝達系サブユニットなどをコードしている。近年、ミトコンドリア DNA の転写や複製領域 D-ループ(D-loop)の変異が種々の疾患や老動物で報告され、ミトコンドリア機能の低下をもたらすと考えられている。神経細胞死については、虚血・再還流による早期の細胞死の発現機序は明らかにされつつあるが、遅延性の細胞死については不明である。本研究は虚血環境に暴露したラット海馬由来株化細胞 (HV16-4) の mtDNA D-loop について検討したもので、緒論ならびに総括を除いた以下の三章で構成されている。

第一章では、虚血環境下における HV16-4 細胞の mtDNA の変異について検討している。すなわち、サブクローニング (2 回) して細胞の性質を均一化した後、通常培養条件 (5 % CO<sub>2</sub>、95 % air) あるいは虚血環境下 (2 % O<sub>2</sub>、10 % CO<sub>2</sub>、88 % N<sub>2</sub>) で 7 日間および 14 日間培養した細胞の mtDNA D-loop の塩基配列を、NCBI Entrez Nucleotide AC\_000022 に登録されたラット mtDNA の塩基配列と比較検討している。

通常培養 7 日目の細胞では 72 クローン中 7 クローン (9.7 %) に一塩基置換が、培養 14 日目の細胞では 84 クローン中 6 クローン (7.1 %) に一塩基置換が認められた。一方、虚血条件下で培養 7 日目の細胞では 78 クローン中 37 クローン (47.4 %) に、培養 14 日目では 84 クローン中 41 クローン (48.8 %) に一塩基置換と一塩基欠失が認められた。これらの結果から、HV16-4 細胞は虚血条件下で培養すると、mtDNA D-loop に高頻度に一塩基置換あるいは一塩基欠失の起こることが明らかとなった。

第二章では虚血環境下における HV16-4 細胞の mtDNA 修復能を低下させる、mtDNA 修復機構の鍵である DNA ポリメラーゼ $\gamma$ の酸化について検討している。また、活性酸素 (ROS) のトラップ剤である 5'-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) 添加時の DNA ポリメラーゼ $\gamma$ の酸化ならびに mtDNA D-loop の変異についても併せて検討している。

通常条件下あるいは虚血条件下で培養した HV16-4 細胞のミトコンドリア DNA ポリメラーゼ $\gamma$ の酸化度は、7 日間あるいは 14 日間いずれの場合においても虚血条件下で培養した HV16-4 細胞で通常条件下で培養した細胞のミトコンドリア DNA ポリメラー

ゼ $\gamma$ の酸化度と比較して有意に高かった。また、DMPOを添加した際にはミトコンドリア DNA ポリメラーゼ $\gamma$ の酸化度は有意に低下した。さらに DMPO 添加虚血条件下で7日間培養した HV16-4 細胞では 23.3 % (21/90 クローン)、14 日間培養した細胞では 28.5 % (24/84 クローン)に mtDNA D-loop に変異が認められ、その変異総数は 80,730 bp で 27 bp (変異頻度 : 3.34 bp / 10,000 bp) ならびに 75,348 bp で 29 bp (3.84 bp / 10,000 bp) であった。第一章で得られた DMPO 無添加の 7 日間あるいは 14 日間培養した HV16-4 細胞のそれと比較すると ROS のトラップ剤である DMPO を添加すると mtDNA D-loop の変異は有意に低下することが明らかとなった。これらの結果から、HV16-4 細胞は虚血条件下で ROS により mt DNA 修復機構の鍵となるミトコンドリア DNA ポリメラーゼ $\gamma$ の酸化が生じており、mtDNA D-loop の変異の原因の一つは mt DNA 修復能の低下であると考えられた。

第三章では虚血環境下における HV16-4 細胞のグルタミン酸刺激に対する反応を検討している。すなわちグルタミン酸刺激による HV16-4 細胞の反応を Ca<sup>2+</sup> インフラックスについては蛍光色素 (Fluo-3) を用いる方法で、膜電位の変化についてはパッチクランプ法で検討している。

通常条件下あるいは虚血条件下で 7 日間培養した HV16-4 細胞をグルタミン酸刺激し Ca<sup>2+</sup> インフラックスを検討したところ、刺激後 45 分までの蛍光強度比に差は認められず、Ca<sup>2+</sup> インフラックスに虚血の影響を認めることは出来なかった。また、グルタミン酸で刺激した際の誘発電流では、-70 mV (AMPA 型グルタミン酸レセプター) ならびに 0 mV (NMDA 型グルタミン酸レセプター) のいずれの電圧に固定した場合においても、誘発電流に差は認められず、グルタミン酸による誘発電流に虚血の影響はないと考えられた。ラットの海馬 CA1 細胞に認められる虚血環境における過分極には ATP-sensitive K チャネルが関与しているされ、虚血環境における活動電位 (誘発電流) では ATP-sensitive K チャネルの誘発電流を検討する必要があると考えられた。

以上の結果から、ラット海馬由来神経細胞 (HV16-4 細胞) は虚血条件下では、ROS により mtDNA 修復機構の鍵となる mtDNA ポリメラーゼ $\gamma$ の酸化により DNA 修復能の低下が生じ、mtDNA D-loop に高頻度に一塩基置換あるいは一塩基欠失が起こっていることを明らかとなった。また、虚血条件下の細胞ではミトコンドリア機能の低下が推測され、神経細胞の遅延性細胞死に関連する可能性が示唆された。

このように、本論文は未だ明らかにされていない虚血環境における神経細胞のミトコンドリア DNA D-loop の変異を明らかにしたものである。その内容は、獣医学の学術上貢献するものであり、よって、審査委員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。