

氏名(本籍)	おおぬきれいこ 大 貴 玲 子 (東 京 都)
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 甲 第 3255 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Identification and Functional Analysis of Pro-apoptotic Factors in Neuronal Cell Death (神経細胞死に促進的に働く因子の同定と機能解析)
主 査	筑波大学教授 農学博士 馬 場 忠
副 査	筑波大学教授 理学博士 藤 村 達 人
副 査	筑波大学教授 薬学博士 柳 澤 純
副 査	筑波大学教授 農学博士 深 水 昭 吉

論 文 の 内 容 の 要 旨

アルツハイマー病は、神経細胞が細胞死を起こすることで脳機能が障害される疾患である。しかし細胞が死に至る過程は非常に複雑であるため、未だその全貌は解明されていない。本論文では細胞死に至る主要経路の探索とそれに関与する因子の網羅的な同定を行った。

発症初期において神経細胞近傍にアミロイドβペプチド(Aβ)を主成分とした凝集体が見られることから、これが発症原因であるという仮説が提唱されている。この凝集体Aβを投与した培養神経細胞は細胞死を起こすが、これは転写因子を介してFasリガンドが分泌されるためであるという経路等が報告され、カスパーゼ8の関与が示唆された。そこで、カスパーゼ8の活性化を生細胞内で検出するためにその生理的な基質のBidに着目した。この両端にYFP, CFPを融合させ、蛍光エネルギー移動(FRET)を起こす融合タンパクの作製を試みた。融合タンパク発現細胞の抽出液を473nmで励起し、蛍光高度計で測定したところ、効率良いFRETが観察された。また、このタンパクは活性化したカスパーゼ8により切断を受け、このことでFRETを起こさなくなることから、生細胞中のカスパーゼ8活性検出に有効であることが明らかとなった。次いで、神経芽細胞種に発現させ、Aβ投与時における活性を観察した。コントロールのFas抗体投与においてその活性化が認められたのに対し、Aβでは9割以上の細胞においてその活性は認められなかった。以上の結果から、Aβによる細胞死においてカスパーゼ8に依存しない経路が主要であることが明確となった。また、アルツハイマー病との関与が示唆されている小胞体ストレスを起源とする細胞死を誘導する試薬と同様の解析を行ったところ、カスパーゼ8の活性化は全く認められなかった。したがって、Aβによる細胞死において小胞体に関わる経路が主要である可能性が示唆された。

小胞体ストレスを由来とする細胞死についてはまだ不明な点が多いので、次にリボザイムライブラリーを用いてこの細胞死に促進的に関わる因子の同定を行った。ライブラリーを神経芽細胞種に導入し小胞体ストレスを与えることによって、本来細胞死を起こす条件でも生存しうる細胞を選択した。この細胞は発現したリボザイムが細胞死促進因子の発現を抑制することで、抵抗性を獲得していると思われる。そこでリボザイムを単離し解析を行ったところ、二つのリボザイムがdouble stranded RNA dependent protein kinase (PKR)のmRNAを認識し発現を抑制しており、PKRは細胞死を促進する因子らしいことが示された。本来PKRは各細胞質療法に存在し、リン酸化されると活性化することが知られている。野生株を用いて解析を行ったところ、小胞体ストレス依存的にリン酸化型PKRが核内で増加した。また、アルツハイマー病の病理組織をPKR抗体で染色すると核内に凝集した

PKRが見られ、その多くはリン酸化していることが細胞抽出液のウエスタンブロッティングによって明らかになった。以上のことから小胞体ストレスやアルツハイマー病における神経細胞死において、PKRは促進的に働く重要な因子であることが明確となった。

審査の結果の要旨

9割を占める孤発性アルツハイマー病患者の発症機構は未だ解明されておらず、発症自体を抑制する治療は困難であるとされている。そのため、細胞死に関わる因子の詳細な解析は創薬のターゲットになりうる可能性を秘めている。

この学位論文では、蛍光エネルギー移動を起こす融合タンパクをプローブとして生細胞内でカスパーゼ8の活性を検出し、従来からいわれていたカスパーゼ8の活性化がA β による細胞死で重要でないことを見いだしている。さらに、PKRが小胞体ストレスやアルツハイマー病に関与していることを明らかにして、核内のリン酸化型PKRの新たな機能を示唆している。プローブに関しては他の細胞死経路の解析にも用いることができ、さらに一つの細胞内で起るイベントをモニタリングできるため応用範囲が広く有用である。また、PKRについてはそのメカニズムの詳しい検討が望まれるが、「核内のリン酸化したPKR」という新しい機構の発見は非常に興味深い。以上のことは、当該研究分野において十分な貢献をしたものと判断できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有していると認める。