



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	The expression and localization of Prune2 and its novel isoform in the central nervous system(内容と審査の要旨(Summary))
Author(s)	李, 詩沫
Report No.(Doctoral Degree)	博士(再生医科学) 甲第922号
Issue Date	2013-03-19
Type	博士論文
Version	none
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/48079

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名（本籍）	李 詩 沫（中国）
学位の種類	博 士（再生医科学）
学位授与番号	甲第 922 号
学位授与日付	平成 25 年 3 月 19 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	The expression and localization of Prune2 and its novel isoform in the central nervous system
審査委員	（主査）教授 大 沢 匡 毅 （副査）教授 伊 藤 八 次 教授 中 島 茂

論文内容の要旨

カスパーゼ (Caspase) は、細胞死の誘導に中心的な役割を果たしているシステインプロテアーゼ (タンパク質分解酵素) である。また、近年の研究から、細胞死誘導作用に加え、細胞の増殖・分化や細胞機能制御など多面的な細胞現象にカスパーゼが関与していることが示されている。特に、神経細胞においては、シナプス可塑性や神経ネットワーク構築や記憶形成などにカスパーゼの局所的な活性化が深く関与していることが明らかにされており、これらの高次神経機能におけるカスパーゼの分子的制御機序を明らかにすることが今後の重要な研究課題となっている。

申請者の研究グループは、シナプスに局在する Caspase-3 の基質を検索し Caytaxin を同定した。Caytaxin はカイマン運動失調症の原因遺伝子として同定された遺伝子である。これらのことは、シナプスに存在する Caspase-3、およびその基質である Caytaxin が、神経高次機能制御に重要な機能を果たしていることを示唆している。Caytaxin の発現は主に小脳や海馬に限局していることから、別の脳部位では Caytaxin 類縁分子が存在し Caytaxin の機能を補完している可能性が極めて高い。そこで、本研究では脳組織に発現する Caytaxin 類縁遺伝子をさらに同定するとともに、シナプスにおける Caspase-3 の基質としての特異性とその分子機能を明らかにすることを目的に研究を行った。

【対象と方法】

1. *Prune2* と新規アイソフォーム *Olfaxin* の同定: *In silico* ホモロジーサーチおよび逆転写 PCR 反応によって、目的遺伝子のクローニングおよびシーケンシングを行った。また、新規にクローニングした遺伝子について、逆転写 PCR 産物から作製したリボプローブを用いて Northern blot および RNase protection assay を行い、各脳組織部位における発現パターンを解析した。
2. *Prune2* と *Olfaxin* の脳内における局在の解析: *Prune2* と *Olfaxin* の mRNA の脳内における局在を解析するために、逆転写 PCR 産物を用いたプローブを作製し、マウス脳の切片を用いて *in situ* hybridization を行った。また、*Olfaxin* に対する 2 種類の抗体を作製し、免疫組織染色を行うことによりマウス脳内における *Olfaxin* タンパク質の発現パターンを調べた。同時に、細胞分画法および免疫電子顕微鏡観察法によって *Olfaxin* タンパク質の細胞内局在を解析した。
3. *Olfaxin* の機能解析: *Olfaxin* タンパク質について、Caspase-3 による基質選択性、およびグルタミン酸代謝経路関連分子との相互作用を調べた。また、*Olfaxin* の発現と嗅覚機能との関連性を調べるために、マウスの鼻腔を塞ぎ嗅覚を遮断した後に *Olfaxin* の発現量変化を解析した。

【結果】

1. 哺乳類 *Prune2* 遺伝子とその新規アイソフォーム *Olfaxin* を同定した。さらに, *Olfaxin* は *Prune2* 遺伝子座において異なるプロモーターを使用することを明らかにした。*Olfaxin* は, アミノ酸レベルで *Caytaxin* と高いホモロジーを有していた (56.3%のアミノ酸同一性)。
2. *Prune2* の発現は脳幹や脊髄の運動ニューロンと後根神経節に局在していた。一方, *Olfaxin* の発現は嗅球や小脳に局在していた。*Olfaxin* タンパク質は主に嗅球と梨状皮質の Ia 層に発現しており, 個体発生に伴い発現が上昇した。また, *Olfaxin* は嗅球僧帽細胞の前シナプスにおいて, グルタミン酸神経終末端のマーカである *Vglut1* と共局在を認めた。
3. *Olfaxin* は *Caspase-3* の基質であることが確認された。また, *Olfaxin* は腎臓型グルタミナーゼ (KGA) と共結合することを確認した。嗅覚神経系における *Olfaxin* の発現は発達依存的に変化するが, その発現は嗅覚刺激の影響を受けないことがわかった。

【考察】

本研究において, *Caytaxin* 相同遺伝子として, 哺乳類の *Prune2* およびその新規アイソフォームである *Olfaxin* を同定した。*Caytaxin* と同様に *Olfaxin* について, 1) 脳の発達依存的な発現, 2) グルタミン酸神経終末端における局在, 3) KGA との結合, 4) *Caspase-3* に対する基質特異性, が確認された。以上の結果から, *Olfaxin* は *Caytaxin* と機能的にも相同であることが示された。遺伝子変異モデルマウスの解析から, 小脳や海馬における *Caytaxin* 遺伝子の発現欠損がカイマン運動失調症の発症の原因であることが示されている。従って, 嗅覚神経系に発現する *Caytaxin* 相同分子 *Olfaxin* についても生理的に重要な役割を果たしている可能性が強く示唆される。

【結論】

Olfaxin は嗅覚神経系のグルタミン酸神経終末端に発現する *Caspase-3* の新たな基質である。近年, ヒトのゲノムワイド関連解析により, アルツハイマー病に関連性がある遺伝子としてヒト *PRUNE2* 遺伝子が同定されている。アルツハイマー病は嗅覚障害を認めることから, *PRUNE2* のアイソフォームである *OLFAXIN* の変異体がこのような嗅覚障害に関与している可能性が推測される。*PRUNE2* および *OLFAXIN* 機能解明は, アルツハイマー病の病態の理解に有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者 李詩沫は, グルタミン酸神経終末端に局在する *Caspase-3* の新規の基質である *Olfaxin* を同定し, 嗅覚神経系における特異的な局在を明らかにした。以上の研究成果は, カスパーゼおよびその基質による高次神経機能の制御機構を解明する上で, 新たな研究の道筋を提供する。従って, *Olfaxin* の発現および機能解析に関する本研究の成果は, 神経生物学並びに神経科学研究の進歩に少なからず貢献するものと認める。

[主論文公表誌]

1. Shimo Li, Yoshika Hayakawa-Yano, Masanori Itoh, Masashi Ueda, Kazunori Ohta, Yoshihiro Suzuki, Akihito Mizuno, Eri Ohta, Yoko Hida, Miao-Xing Wang, Toshiyuki Nakagawa : *Olfaxin* as a novel *Prune2* isoform predominantly expressed in olfactory system. *Brain Research* 1488, 1-13 (2012)
2. Shimo Li, Masanori Itoh, Kazunori Ohta, Masashi Ueda, Akihito Mizuno, Eri Ohta, Yoko Hida, Miao-Xing Wang, Kazunori Takeuchi, Toshiyuki Nakagawa : The expression and localization of *Prune2* mRNA in the central nervous system. *Neuroscience Letters* 503, 208-214 (2011)