Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Differential distribution of the mRNA encoding two isoforms of the catalytic subunit of calcineurin in the rat brain

高石，知明

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1993-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲1198
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001198

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏名・（本籍）　髙石知明（たかいしともあき）　（徳島県）

博士の専攻分野の名称　博　士（医学）

学位記番号　博い第848号

学位授与の要件　学位規則第４条第１項該当

学位授与の日付　平成５年３月31日

学位論文題目　Differential distribution of the mRNA encoding two isoforms of the catalytic subunit of calcineurin in the rat brain

カルシニューリン触媒サブユニットの二種の分子種をコードするmRNAがラット脳において異なる分布を示すこと

審査委員　主査　教授　田中千賀子

教授　千原和夫　教授　西塚泰美

論文内容の要旨

【緒言】

カルシニューリンは，カルシウム・カルモジュリン依存性のセリン・スレオニン特異的蛋白質脱リン酸化酵素であり，中枢神経系に最も多く存在することからニューロンの細胞内情報伝達機構に重要な役割を有すると考えられている。その生理的意義については不明な点が多いが，これまでの研究から，この酵素は触媒サブユニット(A)と調節サブユニット(B)からなるヘテロ二量体であり，Aサブユニットには別個の遺伝子にコードされる二種類の分子種Aα，Aβが存在することが報告されている。今回，我々はカルシニューリンAα，Aβがニューロン間の情報伝達において異なる機能を担っている可能性を探るため，ラット脳組織を用いてカルシニューリンAαおよびAβのmRNAの局在に差異があるかどうかを検討し，これらの機能について考察した。

【方法】

・プローブの調整　カルシニューリンAα，AβのmRNAの塩基配列のうち互いの相同性の低い部分を二カ所選び，mRNAと相補的な配列をもつ45塩基のオリゴデオキシヌクレオチドを合成した。T４ポリヌクレオチドキナーゼにより５’末端を^{32}Pで標識したものをノーザンブロットに，ターミナルトランスフェラーゼにより３’末端を^{35}Sで標識したものをin situ hybridizationに使用した。

・RNAの抽出およびノーザンブロット　ウィスター系雄ラットの全脳または，嗅球，大脳皮質，海馬，綿条体，視床，中脳，小脳，延髄の各脳部位を，４Mチオシアン酸グアニジン／25mM酢酸ナトリウム／0.5%βメルカプトエタノール中でホモジナイズし，5.7M塩化セシウム上に重層して超

遠沈し，総RNAを得た。25μgのRNAを，0.67Mホルムアルデヒド／0.2M MOPS／0.05M酢酸ナトリウム／0.01M EDTAを含む1.0%アガロースゲル上で電気泳動し，10×SSC溶液中でニトロセルロース膜上に転写した。これを，42℃の10mMトリス／40%ホルムアミド／2×SSC／1×デンハルト液中で上記プローブにハイブリダイズさせた。最終的に55℃の1×SSC／0.1%SDS溶液で洗った後，オートラジオグラフィーを行ない特異的バンドを検出した。

• In situ hybridization　4週齢のウィスターラットを麻酔下に4%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液で左室から灌流固定した。脳組織を取り出して後固定した後，ショ糖液に浸漬し，クリオスタットにて20μm切片を作成した。これをpoly－L－lysineでコートしたスライドグラスに張り付け，0.1Mトリエタノラミン／0.9%塩化ナトリウム溶液に10分間浸した後，エタノールで脱水，クロロホルムで脱脂した。ハイブリダイゼーションは，ノーザンブロットの場合と同じ溶液を使用したが，^{35}S標識のプローブが組織に非特異的に結合するのを防ぐために100mM DTT／14mMβメルカプトエタノールを加え，49℃で行なった。組織切片は51℃の1×SSC／20%ホルムアミドで洗った後，脱水，乾燥させ，オートラジオグラフィーを行ない，標識プローブの局在を観察した。

【結果】

• 検出されたシグナルの特異性の確認　作成した4種のオリゴDNAプローブはすべてノーザンブロットでカルシニューリンAα，AβのmRNAを1本のバンドとして検出し，そのサイズはcDNAをプローブとした場合と同じであった。In situ hybridizationにおいては，未標識のプローブを過剰量加えた場合にはシグナルがほとんど検出できなくなり，塩基配列の異なる未標識のオリゴDNAを過剰量加えた場合には検出されるシグナルに変化がないことから，標識プローブの組織への非特異的な結合は無視できる程度と考えた。

• カルシニューリンAα，AβのmRNAの脳内部位別分布　ノーザンブロットでは，各々のmRNAはともに脳内各部位により不均一な分布を示し，海馬に最も多く発現しており，大脳皮質，小脳にも多く発現していたが，中脳や延髄ではいずれも発現の程度は低かった。綿条体では，AαのmRNAは嗅球や視床よりも多く発現していたが，AβのmRNAは嗅球や視床よりも少なかった。

• In situ hybridization histochemistry　カルシニューリンAα，AβのmRNAを示すシグナルはともに海馬の錐体細胞に最も強く，次いで歯状回顆粒細胞層，小脳顆粒層にみられた。延髄では総じてシグナルは弱く，白質にはほとんどみられなかった。Aα，AβのmRNAの局在に違いがみられたのは，1）嗅球ではAαのシグナルは内顆粒層のみにみられたのに対しAβでは内顆粒層と僧帽細胞層に強いシグナルがみられたこと，2）anterior olfactory nucleusではAαに比しAβのシグナルが強いこと，3）大脳皮質ではAαのmRNAはⅡ，Ⅲ，Ⅴ，Ⅵ層に強い層別分布を示したがAβにはこのような傾向が明らかでないこと，4）綿条体ではAαの強いシグナルに対しAβのシグナルは弱いこと，であった。

【考察】

In situ hybridization histochemistry は，組織切片上で目的とする遺伝子の mRNA を検出する方法であるが，特にカルシニューリンＡαとＡβのようにアミノ酸レベルでは相同性が高く，各々に対する特異抗体を調製するのが難しい場合にはその mRNA の局在を個別に検討する手段として有用である。

カルシニューリンの脳内分布については，その精製標品を抗原として調製した抗体を用いて免疫組織化学的に検討した報告があるが，その場合複数の分子種を同時に，あるいは特に抗原性の強いものを主に，観察することになると考えられる。従来の報告ではカルシニューリンは綿条体，海馬および大脳皮質Ⅲ，Ⅴ，Ⅵ層に多いとされており，これはカルシニューリンＡαの mRNA の分布とほぼ一致する。脳内ではＡαの方がＡβよりもはるかに多く発現しているかまたは抗原性が強いことが示唆される。

綿条体には，Ｄ１受容体を持つ細胞に DARPP－32 なる蛋白質が豊富に存在しており，この蛋白質は細胞のドパミン刺激に伴ってリン酸化され，カルシウムに非依存性の脱リン酸化酵素を阻害すると考えられている。リン酸化 DARPP－32 はカルシニューリンの良い基質であることから，ここではカルシニューリンはＡキナーゼと共役していると考えられるが，綿条体にはカルシニューリンＡαの方がＡβよりも多く発現していることから，この反応に与かるのはＡαであることが示唆された。

また，いずれの分子種もその mRNA の分布はこれまでに報告されている特定のプロテインキナーゼの脳内分布と完全には一致せず，蛋白質のリン酸化酵素と脱リン酸化酵素が１対１の関係をとっているとは限らないと考えられた。

【結語】

カルシニューリンの触媒(A)サブユニットの二種類の分子種Ａα，Ａβの mRNA は別個の脳内分布を示すことが明らかとなり，中枢神経系において異なる機能を担っていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

カルシニューリンは、神経系に多量に存在するカルシウム結合蛋白質として見出され、カルシウム・カルモジュリン依存性の蛋白質脱燐酸化酵素であることが判明し、ニューロンの細胞内情報伝達に重要な役割を担っていると考えられているが、その生理機能との関連については不明な点が多い。近年、細胞内情報伝達に関わる他の多くの酵素と同様に、カルシニューリンについてもその触媒サブユニット(A)にＡα、Ａβの二種類があることが見出され、これらの間に機能上いかなる差異があるのかが重要な問題となっている。

本研究は、その端緒として、合成 DNA をプローブに用いて、ラット脳におけるこれら分子種の mRNA の局在を検討したものである。その結果、カルシニューリンＡα、Ａβの mRNA はそれぞれ脳内で不均一な分布を示し、分布様式は互いに異なっていることが明らかとなった。どちらの mRNA も海

馬に最も多く、大脳皮質や小脳にも多く発現していたが、Ａαの場合には視床や嗅球よりも綿条体に多く発現していたのに対し、Ａβでは綿条体の方が少なかった。また in situ hybridization 法により、嗅球ではＡαの mRNA は内顆粒層のみに、Ａβの mRNA は内顆粒層と僧帽細胞層に強く発現していること、大脳皮質ではＡαの mRNA はⅡ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ層に多い層別分布を示すがＡβにはこのような傾向がみられないこと、などの相違点が判明した。免疫組織化学的な検討により過去に報告されたカルシニューリンの脳内分布はＡαの mRNA とほぼ一致するため、Ａαの方がＡβよりもはるかに多く発現しているか、或いは抗原性の強いことが示唆された。また、綿条体のＤ１受容体を持つ細胞に存在してＡキナーゼによりリン酸化される蛋白質である DARPP－32 を脱燐酸化するのはＡαである可能性が高いと考えられた。

本研究は、カルシニューリンの触媒サブユニットについて、その二種の分子種が異なる脳内分布を示すことを明らかにしたものであるが、それらがニューロン間の情報伝達において異なる機能を受け持つことを確立した重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）学位を得る資格があると認める。