

Title	Expression of 5' -AMP-activated Protein Kinase with Starvation in Murine Thymocytes
Author(s)	大越, 林太郎
Journal	歯科学報, 111(6): 656-657
URL	http://hdl.handle.net/10130/2659
Right	

氏名(本籍)	おお こと りん た ろう 大 越 林 太 郎 (千葉県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1684号(甲第977号)
学位授与の日付	平成19年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Expression of 5'-AMP-activated Protein Kinase with Starvation in Murine Thymocytes
掲載雑誌名	The Bulletin of Tokyo Dental College 第52巻 1号 21~29頁 2011年
論文審査委員	(主査) 木崎 治俊教授 (副査) 奥田 克爾教授 川口 充教授 下野 正基教授 柴原 孝彦教授

論文内容の要旨

1. 研究目的

AMPK(AMP-activated protein kinase)は、ATPの低下に伴いAMPによって活性化され、エネルギー枯渇に対応する酵素であり、生体のエネルギー代謝制御に重要な機能を持っている。AMPKは α , β , γ の3つのsubunitによるheterotrimerを形成している。各々、2~3種のisoformが存在し、それらの発現は臓器により異なり、機能との関わりが示唆される。飢餓・栄養障害下では胸腺の萎縮を伴い、免疫機能の低下が認められ、臨床的にもその機構は重要であると考えられる。今回、マウス胸腺細胞を試料として、飢餓ストレスによるAMPKのsubunit isoformの発現変化とその要因を明らかにする目的で、飢餓ストレスに伴う、dexamethasoneと低グルコースの影響について培養胸腺細胞を用いて検討した。

2. 研究方法

本学の動物実験指針に基づき(承認番号05-15)、対象および飢餓マウス(BALB/c, ♂, 6~7週齢)の胸腺細胞を試料として、AMPK isoformの、mRNAの発現はRT-PCR法を用いて解析した。AMPKタンパクはanti-AMPK α 、活性型AMPKであるphospho-AMPK α (p-AMPK α)は、anti-phospho-AMPK α を用いてウエスタンブロット法で解析した。また、1 μ M dexamethasoneと低グルコース培地(8mg/dl)で培養した培養胸腺細胞を用いてその発現機構を解析した。

3. 研究成績および考察

胸腺細胞のAMPK subunitの発現は $\alpha 2$, $\beta 1$, $\gamma 1$ による構成が主であった。飢餓による胸腺重量の減少とともに、12時間で胸腺細胞数は対象の45%、24時間では21%と減少した。 $\alpha 2$, $\beta 1$, $\gamma 1$ subunit mRNAは12時間後には約3倍、24時間後には約7倍と発現の上昇がみられた。AMPK α , p-AMPK α , $\beta 1$, $\gamma 1$ のタンパクも同様に上昇が認められた。発現誘導の機構を明らかにする目的で、胸腺細胞を低グルコース条件下(8mg/dl)で培養したが、AMPKの発現は対象とは変化しなかったが、p-AMPK α は増加した。1 μ M dexamethasone存在下では、飢餓時と同様にAMPKのmRNAとタンパクの発現上昇が用量、時間依存性に観察され、グルココルチコイド受容体のアンタゴニストである10 μ M RU486の処理により、その発現は抑制された。

4. 結 論

マウス胸腺細胞において、グルココルチコイドはそれ自体でアポトーシスを誘導するが、飢餓ストレスではグルココルチコイドの上昇によりアポトーシスの誘発と同時にストレスに対応した AMPK の発現が上昇し、また、低グルコースにより活性化されることにより、細胞が応答していると考えられる。

論 文 審 査 の 要 旨

AMP-activated protein kinase (AMPK) は、様々なストレスによる細胞内のエネルギーの擾乱を感知して細胞をストレスに対応させる酵素である。本論文では臨床的にも課題となる栄養飢餓状態での免疫機能の低下に関与する胸腺の萎縮における胸腺細胞の AMPK の発現に焦点をあてている。この酵素は α , β , γ subunit の heterotrimer から構成され、しかも α , β には 2 種類、 γ には 3 種類の isoform が存在し、細胞や組織によりそれらの発現が異なり、細胞特異的な機能とのかかわりが示唆されている。本論文は、マウス胸腺細胞に発現している AMPK の主要 subunit isoform が $\alpha 2$, $\beta 1$, $\gamma 1$ であることを明らかにし、飢餓により胸腺の萎縮に伴い、それらの発現が mRNA レベル、タンパクレベルともに時間依存的に上昇していることを明らかにした。その機構を、*in vitro* において解析し、AMPK の発現が、グルココルチコイドによって誘導され、リン酸化による活性化には低血糖が関与していることを明らかにしたものである。

本審査委員会は、1) 胸腺細胞の老化に伴うサブポピュレーションの変化、2) 飢餓時間の設定の根拠、3) 制限食と自由食での AMPK の変化、4) *in vivo* の培養液中の糖濃度の決定の根拠、5) qRT-PCR の標準の根拠、6) 実験動物の選択理由、7) 胸腺細胞のステロイド感受性、8) 胸腺萎縮におけるアポトーシスとネクローシスの関与、8) 結果の臨床的意義についての質疑が行われ概ね妥当な回答が得られた。また、英文論文の構成、表現について意見がありそれをもとに校正をおこなった。以上より、本研究で得られた結果は、今後の歯学(生化学)の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。