



Title	B-Citryl-glutamateの神経および水晶体組織における局在と、その分解酵素に関する研究
Author(s)	檜原, 正則
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3184487">https://doi.org/10.11501/3184487</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	なら 榎 原 まさ のり 則
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 15902 号
学位授与年月日	平成13年2月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	$\beta$ -Citryl-L-glutamateの神経および水晶体組織における局在と、その分解酵素に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 真弓 忠範  (副査) 教授 山元 弘 教授 馬場 明道 教授 松田 敏夫

#### 論文内容の要旨

脳に特異的に存在する物質は脳の働きに関与しているのではないかと考え、未知物質を検索したところ、ラット脳で幼若期、特に神経細胞の成長期にあたる生後10日目までにその濃度が一過性に上昇し、成熟すると消失する未知物質を発見し、 $\beta$ -citryl-L-glutamate (以下、 $\beta$ -CG) と同定した。その構造は、クエン酸の $\beta$ 位カルボキシル基にグルタミン酸がアミド結合した、分子量321の酸性の化合物であった。 $\beta$ -CGの組織分布を調べたところ、幼若脳の他に成熟睾丸、眼球にも高濃度存在していた。予備的に $\beta$ -CGの睾丸での分布や睾丸の成長に伴う変化を調べたところ、精子形成と密接な関係があることが推測された。 $\beta$ -CGが幼若脳のみならず、成熟睾丸および眼球にも高濃度存在し、これらの組織でいかなる生理的役割を果たしているのか非常に興味を持たれた。そこで著者は、 $\beta$ -CGの神経組織と眼球における局在と、その代謝を明らかにすべく研究に着手した。

第1に培養神経細胞の分化と $\beta$ -CGの局在について検討した。まず、 $\beta$ -CGに特異的な抗 $\beta$ -CG抗体を作製し、その特異性を検討した。残念ながら遊離の $\beta$ -CGを認識する抗体は得られなかったが、ハプテン化した $\beta$ -CGを特異的に認識する抗体を得ることができた。次にこの抗 $\beta$ -CG抗体を用いて、ラット初代培養神経細胞における $\beta$ -CGの細胞局在を免疫学的に検索した。その結果、 $\beta$ -CGは神経細胞の突起と細胞体に局在し、非神経細胞には存在しないことを示した。さらにレチノイン酸により線維芽細胞、神経細胞、グリア細胞の3種類の細胞に分化する胚性腫瘍細胞P19を用いて $\beta$ -CGの局在を細胞免疫学的に調べ、 $\beta$ -CGが神経細胞に分化した細胞にのみ限局して存在することも示した。またレチノイン酸誘導したP19における $\beta$ -CGの経時的変化を調べたところ、神経細胞が分化・成長すると共に、 $\beta$ -CG濃度が高濃度となることを示した。

脳は神経細胞ひとつにしても様々な機能を持った多種類の細胞から構成されており解析が困難である。しかし眼組織は脳とは異なり、比較的構造が単純で解析しやすい。そこで第2に眼組織に注目し、水晶体組織における $\beta$ -CGの局在を詳細に解析した。ニワトリ眼球内における $\beta$ -CG濃度の経時変化を調べたところ、孵卵開始9日目にはすでに高濃度存在しており孵化日までにおおよそ半減するが、孵化後もほぼ一定の濃度を維持し続けている事がわかった。そこでウシ眼球における分布を調べたところ $\beta$ -CGは、水晶体にほぼ限局して存在していた。水晶体は水晶体上皮細胞と水晶体線維細胞の2種類の細胞より構成され解析が容易ではないかと推定された。そこで、さらに水晶体の組織レベルでの詳細な $\beta$ -CGの局在を調べた。その結果、 $\beta$ -CGは水晶体の中でも水晶体上皮細胞が水晶体線維細胞へ分化する基質赤道部に高濃度存在していた。一方水晶体上皮細胞は、*in vitro*の実験系で水晶体線維細胞に分

化誘導させることができ、条件によってはレンズ様体を形成させることもできる。そこでこの *in vitro* でレンズ様体形成時にどの細胞に  $\beta$ -CG が局在するのか細胞レベルで検討した。抗  $\beta$ -CG 抗体を用いて、ウシ培養水晶体細胞における  $\beta$ -CG の細胞局在を免疫学的に検索したところ、レンズ様体自身ではなくむしろその周辺の細胞が染色された。このことは水晶体線維細胞に分化する直前の細胞に  $\beta$ -CG が存在することを示唆するものであった。さらに培養水晶体細胞における  $\beta$ -CG 濃度の経時変化を調べたところ、水晶体線維細胞分化の指標である  $\alpha$ -クリスタリンより先行して高濃度となることがわかった。

$\beta$ -CG のような低分子化合物の細胞内での濃度は、合成酵素と分解酵素の活性調節により決まる。 $\beta$ -CG の生理作用の解明にはその代謝系を明らかにする必要がある。そこで第3に基礎的研究の立場から本物質の合成、分解酵素の単離を試みた。合成酵素は同定が困難でいまだ単離することは出来ていないが、幸いにも  $\beta$ -CG 特異的分解酵素を見出し、睾丸から単一にまで精製することに成功した。またこの酵素の諸性質を明らかにし、これまでに報告のない新しいアシラーゼであることを示した。さらに、神経細胞に分化誘導した P19細胞の分化・成長にともなう  $\beta$ -CG 特異的分解酵素の活性の変動を調べたところ、 $\beta$ -CG 濃度が減少する時期に一致してその酵素活性が上昇することがわかった。

以上、神経細胞のみならず水晶体細胞においても細胞分化の時期に一致して  $\beta$ -CG が高濃度となることから、 $\beta$ -CG は神経細胞や水晶体細胞の分化・成長に重要な働きを演じている可能性を示唆した。また、 $\beta$ -CG を特異的に分解する酵素を単一に精製し、その活性が神経細胞の成熟と共に上昇することを示した。これらのことから、 $\beta$ -CG が神経細胞および水晶体細胞の分化・成長と非常に関連が深い物質であることを明らかにした。

#### 論文審査の結果の要旨

脳は神経細胞が相互にネットワークを形成し、高度な機能を営んでいる。この脳が正常な機能を果たすためには、神経細胞が機能的に分化するのみならず、突起を伸展し、シナプスを形成すると言った形態的分化が必要となる。このような神経細胞の分化は多くの未知な因子により厳密に調節されている。

著者の研究グループでは、脳に特異的に存在する物質は脳の働きに深く関与している可能性を考え、脳の成長期で未知物質を探索したところ、ラット脳で幼若期、特に神経細胞の成長期にあたる生後10日目までにその濃度が一過性に上昇し、成熟すると消失する未知物質を発見し、 $\beta$ -citryl-L-glutamate (以下  $\beta$ -CG) を同定している。著者は、 $\beta$ -CG の組織分布を調べたところ、幼若脳のみならず眼球にも高濃度存在していたことから、 $\beta$ -CG の神経組織と眼球における局在とその代謝を明らかにすべく検討を行った。その結果、以下の成果が得られた。

- 1) 抗  $\beta$ -CG 抗体を用いて、ラット初代培養神経細胞における  $\beta$ -CG の細胞局在性を免疫学的に検討したところ、非神経細胞は染色されず、神経細胞の突起と細胞体が染色された。
- 2) 胚性腫瘍細胞 P19は、レチノイン酸誘導により繊維芽様細胞、神経細胞、グリア細胞の3種類の細胞に分化するが、神経細胞に分化した細胞にのみ  $\beta$ -CG が局在することを明らかにした。この経時変化を調べたところ、神経細胞が分化・成長するに伴って  $\beta$ -CG 濃度の上昇が確認された。
- 3) 水晶体組織における  $\beta$ -CG の局在を調べたところ、水晶体上皮細胞が水晶体線維細胞に分化する赤道部に局在する事、さらに水晶体線維細胞分化の指標である  $\alpha$ -クリスタリンより先行して  $\beta$ -CG が高濃度となることが判明した。
- 4)  $\beta$ -CG 合成酵素については未だ不明であるが、 $\beta$ -CG 特異的分解酵素を精製し、本酵素の諸性質を明らかにした結果、新規なアシラーゼであることが判明した。

以上の成果は、神経細胞や水晶体線維細胞分化研究に、 $\beta$ -CG という新たな視点を提供したものであり、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものとする。