



Title	条件培養液中の神経突起成長因子の研究
Author(s)	山本, 亘彦
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35177
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・（本籍）	やま	もと	のぶ	ひこ
	山	本	亘	彦
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	7303		号
学位授与の日付	昭和61年3月25日			
学位授与の要件	基礎工学研究科 物理系専攻			
	学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	条件培養液中の神経突起成長因子の研究			
論文審査委員	(主査)			
	教	授	有働	正夫
	(副査)			
	教	授	葛西	道生
	教	授	鈴木	良次
	講	師	村上	富士夫

論文内容の要旨

神経細胞の突起成長を促進する因子が種々の細胞の条件培養液（培養上清）中に存在することが知られている。本論文の目的は、神経成長あるいは神経発芽の物質過程を解明する第一歩として、条件培養液中の神経突起成長因子の特性を明らかにすることである。本論文は2章からなり、その概要を以下に示す。

第1章 条件培養液と神経成長因子による神経突起の成長

神経細胞の成長、生存などを促進する因子として完全に同定されているのは神経成長因子（nerve growth factor, NGF）だけと言ってよい。そこで、条件培養液とNGFの神経突起成長に対する効果を培養後根神経節を用いて調べた。その結果、条件培養液中において神経突起がより速く伸長することがわかった。しかし、神経突起の密度はNGF存在下で培養したときの方が高かった。また、神経節中の1つの神経細胞の突起成長を horseradish peroxidase を細胞内注入して調べたところ、NGF存在下で、神経突起がより広範囲に枝分かれしていた。これらの結果は、条件培養液中の因子がその作用においてNGFと異なることを示すものである。

第2章 ニワトリ胚心臓細胞条件培養液中の神経突起成長因子の精製とその特性

条件培養液中の神経突起成長因子は、ポリオルニチンを塗布した培養皿基壁に接着して、突起の成長を促進することが報告されている。この因子（substratum conditioning factor, SCF）をニワトリ胚心臓細胞条件培養液から硫酸、DEAEセファロース、ハイドロキシルアパタイトを用いて精製した。また、SCFの神経突起成長に及ぼす効果（神経突起成長活性）は、ニワトリ胚後根神経節ニューロンの解離細胞培養を用いたバイオアッセイによって定量的に表わした。その結果、SCFは神経突起

成長活性を指標として10,000倍以上精製され、強い負電荷をもつ糖タンパクであることがわかった。この最終分画をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（還元条件下）によって分析すると、分子量360 Kと220 - 240 Kの主バンドが検出された。これらのバンドは、心臓細胞が培養液中に合成、放出するポリペプチドを ^{35}S メチオニンで標識したとき、放射能活性を示した。一方、非還元条件下でSDS電気泳動を行うと、これらのバンドは消失して、新たに分子量100万以上の領域に主バンドが出現した。また、ゲル濾過により、SCF (native)の分子量は100万以上と推定された。以上の結果から、SCFは分子量360 Kと220 - 240 Kの2つのポリペプチドからなる巨大な糖タンパクであると考えられる。

論文の審査結果の要旨

本研究は中枢神経系の可塑的変化の過程で重要な役割を果たしていると考えられる神経発芽を促進する可能性のある物質を同定したものである。

神経細胞がつくる回路が一旦出来上った後で再構成されうる性質（可塑性）の中で、神経細胞の出力を伝える構造である軸索突起が伸長又は分岐して、標的細胞と結合する神経発芽の過程が重要であることが近年明らかになってきた。神経発芽の過程は1つ又は複数の物質によって促進されていると考えられるが、従来報告された物質を生体内活性と対応させようとすると種々の難点が認められる。

本論文では従来の報告の難点を考慮し、生体内活性と対照できる物質に着眼し、その活性を測定できるアッセイシステムを作成し、そのシステム上で評価される神経突起成長因子を分離精製した。まず対象物質として、周囲組織に接着した状態で突起を成長させる物質に注目する。その理由は、生体内の神経突起成長に際しては、周囲組織の機械的ガイドに基いて突起成長が行われるからである。本研究ではニワトリ胚の心臓細胞条件培養液中に記載されている上記の性質をもつ物質（SCF）に注目した。

アッセイシステム作成に際しては、ニワトリ後根神経節に酵素処理のほか、ピペット内で機械的振動を与えて単一細胞に解離し、培養皿への接着性の差により神経細胞をそれ以外の細胞から分離する等の細胞工学的処理を行う。培地の温度・イオン強度・栄養を注意深く制御した結果、神経突起成長因子に対する濃度・反応曲線及び突起成長の時間経過（成長曲線）がなめらかであることが示された。このアッセイシステムによりSCFの活性を評価したところ、精製前に比べて約1万倍低い蛋白質濃度で同一活性がえられることが判明した。最終分画の電気泳動により分子量が360 Kと220 - 240 Kの二帯域が検出され、この二帯域が最終段のカラムからりん酸ナトリウムの直線濃度勾配によって溶出する際、分画は、神経突起成長活性がえられる分画とよく一致していた。さらに、免疫抗体等を用いることにより、本研究で検出された物質が、従来の報告とは異質の糖蛋白であることを明らかにしている。

本論文は以上のように、神経突起の成長を促進する因子の中、生体内の神経発芽に際して機能する可能性のある物質を分離し、その活性を有力なアッセイシステムを用いて定量的に測定しており、神経系の可塑性を担う物質同定の指針となると考えられる。よって博士論文の価値あるものと認める。