



Title	発達に伴い脳内に一過性に発現するニューロテンシン (NT) , ニューロメジンN (NN) の意義について
Author(s)	佐藤, 真
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/2964378">https://doi.org/10.11501/2964378</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	佐藤真
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9658 号
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 26 日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	発達に伴い脳内に一過性に発現するニューロテンシン (NT), ニューロメジン N (NN) の意義について
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌 (副査) 教授 三木 直正    教授 福田 淳

## 論文内容の要旨

### (目 的)

ニューロテンシン (NT), ニューロメジン N (NN) は同一遺伝子同一 exon 上に連続してコードされているペプチドで, 神経伝達物質としての働きが示唆されている。NT の個体発生を免疫組織科学的に検討すると脳の多くの領域では, 成熟動物でもなおかつ強い免疫活性が認められるが, 後帯状回, 海馬支脚ではシナプス形成が完成する以前の幼若期にのみ一過性の発現を示す。これらの事実は上述の領域では NT が神経栄養因子として働く可能性を示唆するが, その意義については不明である。

本研究は幼若期にのみ一過性に発現される NT, NN の意義を明かにするため, まず一過性に出現する NT は細胞内での産生能の推移を反映しているのか否か, 又一過性に出現する NT 細胞が細胞死によるものかを *in situ* ハイブリダイゼーション法 (ISHH 法) を用い, 遺伝子レベルで検討した。また幼若期に出現する NT, NN が神経活性物質としての作用を有しているか否かを調べるため, 次に幼若期に一過性に NT 結合を示す大脳皮質を例に取り NT, NN の大脳皮質ニューロンへの作用を細胞内遊離カルシウム濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) を指標として培養系を用いて検討した。

### (方 法)

ISHH はラット NT/NN 前駆体 mRNA の NT コーディング部位に相補的な 39mer 合成オリゴヌクレオチドをプローブとし行なった。シグナルの可視化には emulsion autoradiography をもちいた。プローブは 3' エンドラベリング法により  $^{35}S$ -dATP で標識し, その特異性は RNase 前処理実験, cold プローブとの競合実験及び Northern ブロッティング法による解析で確認し使用した。動物は Wistar 系ラット胎生 16, 17 日 (受精日を第 0 日とする), 生後 0, 2, 5, 7, 14, 21, 42 日齢 (生ま

れた日を0日とする)のものをを用いた。各細胞上のグレイン数をカウントしたところ、バックグラウンドの2倍を境に2つの集団に分かれたので、バックグラウンドの2倍以上のグレインを有する細胞を陽性とした。 $[Ca^{2+}]_i$  測定にはArgus100(浜松ホトニクス)を使用し、遊離カルシウム濃度は340nm, 380nmでの蛍光強度の比をもとに算定して。Wistar系ラット生後0日齢の大脳新皮質を取り出しパイインで分散処理後0.28cm<sup>2</sup>のwellで2-5日培養し、Fura2-AM色素を取りこませた細胞に対し測定を行った。NT, NN, NTアナログを濃度を変え、単独または連続投与し $[Ca^{2+}]_i$ の変化を観察した。なお、測定中は灌流液の温度は35-37℃となるよう留意した。

#### (結 果)

I S H E法にて後帯状回、海馬体を検索した。NT/NN前駆体mRNAは胎生17日で初めて観察され、生直後では後帯状回の2/3及び6層に、また海馬支脚および海馬のCA1に強く発現していた。7日齢以後前者では発現量が急速に減少するのに対し、後者では従来の免疫組織化学の報告と異なり、発現量はやや減少するものの成熟動物まで引き続きNT/NN前駆体mRNAが発現していた。海馬支脚を例にとると、7日齢と成熟動物で陽性細胞は殆どかわらなかった。このように発達に伴いNT/NN前駆体mRNAを一過性に強く発現するものと、成熟動物まで引き続き発現する2群が観察された。

培養大脳皮質細胞の $[Ca^{2+}]_i$ はNT(1nM以上), NN(10nM以上)投与で一過性に上昇し、その変化の様子はほぼ同一であった。NTアナログを投与すると、そのバインディング能に応じた $[Ca^{2+}]_i$ の反応が見られた。NT, NN投与では細胞外 $Ca^{2+}$ をEGTAにてキレートしても同様に $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した。NT(またはNN)を連続投与すると反応のdesensitizationが観察された。すなわち初回投与後 $[Ca^{2+}]_i$ がベースラインに戻った後すぐ2度目の投与を行っても $[Ca^{2+}]_i$ は変化しなかったが、15分洗浄し再び投与すると $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が観察された。NT(またはNN)投与後15分洗浄しNN(またはNT)を投与した所、幾つかの細胞とともに $[Ca^{2+}]_i$ は上昇し、NTまたはNN一方のみに応じた細胞はみられなかった。次にNT, NNを連続投与し15分の洗浄を行い再びNNを投与した。 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はNT及び洗浄後投与したNNに対してのみ見られた。NT, NNを入れ換えても同様に最初のNNと最後のNTにたいして $[Ca^{2+}]_i$ の変化が観察された。

#### (総 括)

I S H H法により一過性のNTの発現は細胞死を反映しているのではなく産生能力が急速に低下する為であることが明らかとされた。産生能を調節する因子の解明が今後の課題である。幼若期大脳皮質の細胞はNTにより細胞内 $Ca^{2+}$ ストアからCaイオンの動員がみられることより、(1)幼若期に出現するNTは標的細胞を有し活性物質として作用すること、(2)この作用はG-蛋白結合型リセプターを介している可能性が示唆された。更に、シナプス形成が完成する以前に一過性に発現するNT/NN前駆体mRNA含有細胞の存在はNT, NNに神経伝達物質としての働きのみならず、神経栄養因子としての側面があることを示唆した。又、NTまたはNNのみに応じる細胞の観察されなかった事、およびNT(またはNN)投与によりNN(またはNT)にたいしてdesensitizationがおこったことより、NT, NNが同一のリセプターを介して働く可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

神経ペプチドであるニューロテンジン（NT）様免疫産物は、幼若期にのみ一過性に後帯状回、海馬支脚に発現することは知られていたが、その発現様式、作用様式については不明であった。申請者は、まず *in situ* ハイブリダイゼーション法を用い、遺伝子レベルでNTの発現を検討し、一過性のNTの発現は細胞死を反映しているのではなく産生能力が急速に低下するためであることを明らかにした。ついで、幼若期の大脳皮質細胞を培養し、NTまたはニューロメジンN（NN）による細胞内遊離  $\text{Ca}^{+2}$  濃度の一過性上昇を観察することで、(1)幼若期に出現するNTは標的細胞を有し活性物質として作用すること、(2)NTとNNが同一リセプターを介して働く可能性、および(3)この作用はG-蛋白結合型リセプターを介している可能性が大きいことを示した。本研究は、従来全く未知であった幼若期NT、NNの意義について、重要な示唆を与えており、博士号授与に値するものと思われる。