



Title	小脳の神経組織発生における神経突起伸展因子受容体 (NOFR) の役割
Author(s)	加藤, 行
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37995
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	か とう 藤 行
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 0 1 4 5 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 生理系専攻
学位論文名	小脳の神経組織発生における神経突起伸展因子受容体 (NOFR) の役割
論文審査委員	(主査) 教 授 三木 直正 (副査) 教 授 和田 博 教 授 遠山 正彌

論文内容の要旨

(目 的)

神経突起伸展因子 (Neurite Outgrowth Factor, NOF, 700KDa) は、ニワトリ砂嚢平滑筋より精製した細胞外マトリックス蛋白質の一種で、網膜や毛様体神経節などの神経細胞膜に発現する特異的な受容体 (Neurite Outgrowth Factor Receptor, NOFR, 82KDa) を介して、神経突起の伸展を促進する。しかし、中枢神経系での NOFR の存在や機能に関しては未だ解明されていない。そこで、神経組織発生のモデル系として有用なニワトリ小脳を用いて、1) 組織薄切片の免疫組織染色による NOFR の局在、2) 膜分画のイムノブロットとリガンドブロットによる NOFR の分子的特性、3) 移植片培養による NOF の細胞伸展活性と NOFR 抗体による阻害作用について検討した。

(方 法)

- 1) 免疫組織化学：ニワトリ胚 (10-18 日胚) 小脳を摘出し、クリオスタットで組織薄切片 (10 μ m) を作製した。薄切片は抗 NOFR 血清と反応させた後、Fluorescein 結合の二次抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。
- 2) イムノブロットとリガンドブロット：10日と18日胚小脳より粗 P₂膜分画を調整し NP-40 で可溶化、また Triton X-114 で相分離 (界面活性剤層と水層) の後、SDS ゲル電気泳動で分離した。ニトロセルロースシートへ移した蛋白質は抗 NOFR 血清と反応させ、HRP 法で染色した。リガンドブロットはシートへ移した蛋白質を、NOF (100 μ g/ml) と結合させ、さらに抗 NOFR 血清と反応させた後、HRP 法で染色した。
- 3) 移植片培養：10日と12日胚小脳を0.5-1 mm の小片に切断後、ポリオルニチンでプレコートした培養

皿に静置し DMEM (10% FCS) で通気培養した。

(結 果)

- 1) 免疫組織化学：抗 NOFR 血清は10日と12日胚小脳の外顆粒層に局限して強く反応し、特に細胞表面層部が濃く染色された。それに対し、加齢の進んだ18日胚では殆ど染色が認められなかった。
- 2) イムノブロットとリガンドブロット：10日胚小脳粗 P₂膜分画を用いた Triton X-114 による相分離法では、大部分の NOFR が界面活性剤層に回収された。また、10日胚と18日胚小脳の膜分画を用いた抗 NOFR 血清によるイムノブロットの結果、還元条件下で両胚ともに約82 KDa のダブルバンドが検出された。そして免疫組織化学の結果と同様に10日胚に比べ、18日胚では加齢による受容体蛋白質濃度の減少がみられた。
- 3) 移植片培養：10日胚と12日胚小脳移植片を NOF (1,000ng /well) でプレコートした培養皿で2日間培養した結果、コントロールに比べ顕著な神経突起の伸展と細胞移動が観察された。しかし NOFR 抗体 (300 μ g /well) の共存下で培養した場合、NOF による細胞伸展作用は完全に抑制された。

(総 括)

本研究により、1) NOFR が末梢神経と同様にニワトリ胎児小脳で一過性に発現し、その時期と領域が小脳外顆粒層の増殖活性時期とほぼ一致すること、2) イムノブロットの結果、NOFR の性質はニワトリ砂囊筋や網膜のそれと一致すること、3) 小脳移植片培養の結果、NOF による突起伸展や細胞移動の促進作用は、NOFR を介するものであることが明らかとなった。以上の結果より、NOFR がニワトリ小脳の細胞構築、特に外顆粒細胞の分化と成長に深く関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は中枢神経における神経突起伸展因子受容体 (NOFR) の発生学的分布と機能的役割をニワトリ小脳を用いて解明したもので、その分子的特性は分子量約82 KDa の膜蛋白質であり、小脳の移植片培養で神経突起伸展因子 (NOF) により誘導される細胞の移動作用が NOFR 抗体で完全に抑制される等、以前に報告された末梢神経 (毛様体神経節、網膜等) での結果とほぼ一致する。さらに小脳での NOFR は10日および12日胚の外顆粒層に局限して発現し、18日胚では消失していた。これは同層の増殖活性期とよく一致している。これらの結果は NOFR が小脳の特に出芽細胞層の分化成長に深く関与することを示し、中枢神経の細胞構築過程に対し NOFR が促進的役割を果たすことを解明した労作で、学位に値するものと考えられる。