The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	神経突起伸展因子(NOF)に結合する新しい細胞接着因子 gicerin のクローニングとその機能解析
Author(s)	平, 英一
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38922
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

【15】

氏　　名	平（たいら）　英一（えいいち）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　11253　号
学位授与年月日	平成6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	**神経突起伸展因子（NOF）に結合する新しい細胞接着因子 gicerin のクローニングとその機能解析**
論文審査委員	（主査） 教　授　三木　直正 （副査） 教　授　祖父江憲治　　教　授　遠山　正彌

論文内容の要旨

［目的］

ニワトリ胚毛様体神経節ニューロンの突起伸展を引き起こす因子として神経突起伸展因子（neurite outgrowth factor, NOF）をすでに単離精製している。NOF は分子量約 700 kDa の細胞外マトリクスに存在する酸性糖タンパク質であり，神経系の他に砂嚢平滑筋，骨格筋，心筋などにも存在している。gicerin（SDS-PAGE 上で，82 kDa 及び 90 kDa のダブレットバンドを示す）は，NOF に結合する細胞膜蛋白質として砂嚢平滑筋から精製しており，発生初期の神経系や網膜にも発現している。gicerin の神経系における発現時期は，神経細胞のシナプス形成時に最大発現が見られ，以降加齢と共に減少・消失していく。小脳においては外顆粒層の神経細胞が内方に移動する時期に一致して発現が見られる。また，網膜においては視神経細胞が中枢に神経突起を伸展する時期に一致して発現が見られる。このことは，神経構築やシナプス形成に gicerin が深く関与していることを示唆している。本研究では gicerin 抗血清を用いて，ニワトリ砂嚢の λ gt 11 発現ライブラリーのスクリーニングを行い，gicerin cDNA を単離し，その塩基配列を決定し，その構造を明らかにした。さらに，培養細胞に gicerin cDNA を導入しその機能を解析した。

［方法］

すでに精製している gicerin（82 kDa）に対する抗体を用いて，ニワトリ砂嚢平滑筋の λ gt 11 発現ライブラリーのスクリーニングを行った。得られたクローンは，phagemid Bluescript II SK(-) にサブクローン化しさらに制限酵素および Exonuclease III 処理によるフラグメントを作成し，Sanger 法によりその塩基配列を決定した。さらに gicerin cDNA をマウス線維芽細胞 L929 にリポフェクチンを用いて導入，発現させた。恒常発現細胞株を作成するためにネオマイシン耐性遺伝子との co-transfection を行った。この gicerin 恒常発現細胞および parental L929 細胞をトリプシンで単細胞化した後に，NOF, BSA 及び laminin をスポット状にコートした培養皿上で培養し，これらのスポットへの結合を検討した。

［成績］

ニワトリ砂嚢 gicerin の cDNA をクローニングしたところ，gicerin は 584 個のアミノ酸から構成されており，長い細胞外領域に続き 1 回の膜貫通部位と短い細胞内領域からなる。アミノ酸の一次構造の解析から，gicerin は，イムノグロブリン（Ig）ジーンスーパーファミリーに属するタンパク質である事が明らかとなった。細胞外領域には Ig 様ループ構造を 5 個持ち，SC1, MAG, L1, NCAM 等と類似した構造をしており，その N 末の 2 個は V タイプ，他の

3個はC-2タイプであると思われる。細胞内領域にはチロシンキナーゼなどの既知の機能的なドメインは含まれていなかった。gicerinを恒常的に発現させた線維芽細胞は，砂嚢のgicerinのダブレットバンドの90 kDaに一致したgicerinを細胞表面に発現した。さらにこれらの細胞はNOFにのみ選択的に結合し，その結合は抗gicerin抗体で阻害された。

［総括］

gicerinはNCAM, SC1, MAG, VCAM-1などのイムノグロブリン（Ig）ジーンスーパーファミリーに属する新しいタンパク質であることが明らかになった。ホモロジーはSC1と30％程度，NCAM, MAG, VCAM-1, CEAなどとは20％以下である。Igジーンスーパーファミリーに属する分子は一般的に同種親和性結合により神経突起伸展をひきおこす。また神経突起伸展能を持つラミニンファミリー分子に対する受容体はインテグリンが知られている。Igジーンスーパーファミリーに属するgicerinがラミニンファミリーに属するNOFとの異種親和性結合により神経突起伸展を引き起こすことは新しい知見である。

論文審査の結果の要旨

本研究は神経突起伸展因子（neurite outgrowth factor, NOF）に対するレセプターであるgicerinの構造と機能を明らかにする事を目的とし，抗gicerin抗体を用いて，gicerin cDNAのニワトリ砂嚢平滑筋からのクローニングを行い，さらに培養系における発現実験を行った。単離したcDNAは584残基のアミノ酸をコードしており，gicerinは新しい細胞接着因子である事が明らかになった。その構造は，細胞外に5個のイムノグロブリン（Ig）様ループと，1ヵ所の膜貫通部位を挟んで短い細胞内ドメインを持つ。gicerin cDNAをマウス線維芽細胞L929に導入すると，砂嚢に発現しているgicerinの片方に一致するバンドがウエスタンブロットで確認され，細胞はNOFに対する結合能を示した。Igジーンスーパーファミリーに属するgicerinがラミニンファミリーに属するNOFに選択的に結合することは非常に特徴的である。

本研究は新しい細胞接着因子の同定及び機能を解明することにより，神経系の形成機構の解明に大きく寄与する研究であり，学位に値する。