The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Neurocrescin : a novel neurite-outgrowth factor secreted by muscle after denervation
Author(s)	西宗, 裕史
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40966
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

【 16 】

氏　　名	西（にし）　宗（むね）　裕（ひろ）　史（し）
博士の専攻分野の名称	博　　士（理　　学）
学 位 記 番 号	第　13434　号
学位授与年月日	平成 9 年 10 月 24 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	Neurocrescin : a novel neurite-outgrowth factor secreted by muscle after denervation (Neurocrescin：除神経後に分泌される新規な神経突起伸長因子)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 葛西 道生 (副査) 教 授 柳田 敏雄　教 授 村上富士夫　助教授(客員) 田口 隆久

論 文 内 容 の 要 旨

運動神経細胞がその軸索を伸長して骨格筋細胞を神経支配するときに，筋細胞が発現する神経突起伸長因子が軸索の伸長を促すことが予測されてきた。また，坐骨神経の損傷等による除神経状態からの再生にも同様の因子が働くことを示唆する報告がなされてきた。坐骨神経の一部を切除した場合に運動神経終末部では発芽現象が観察されるが，この発芽の誘導は骨格筋の活動状態により制御されていることが観察されている。また，骨格筋細胞は突起伸長活性を持つ未知因子を分泌しており，筋抽出液中にある突起伸長活性は坐骨神経の除神経により上昇することも観察されている。しかし，このような突起伸長活性を裏付ける因子は，まだ同定されていない。本研究では，坐骨神経の除神経状態において下腿部骨格筋で発現する新規な神経突起伸長因子を同定することを試みた。

このような蛋白質因子は，生化学的な分離・精製による手法では同定できていなかったので，分子生物学的手法により因子をコードする mRNA を同定する方法を試みた。坐骨神経を切除し除神経したヒヨコ下腿部骨格筋には，脊髄神経細胞の神経突起の伸長を促進させる因子が含まれていた。この除神経筋の抽出液を抗原としていくつかのモノクローナル抗体を作成し，筋抽出液の突起伸長活性を阻害する機能中和抗体を得た。この抗体は目的因子を認識しているので，これを用いて除神経筋の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果得られた候補遺伝子がコードしていた組み替え蛋白質は，培養脊髄神経細胞に対する突起伸長活性を示した。そこでこの突起伸長因子を neurocrescin と名付けた。neurocrescin の全長 cDNA をニワトリ，マウスからクローニングし，さらにホモロジーの高い人間の遺伝子が遺伝子データベースより見つかったので，独自にニワトリ，マウスからこれをクローニングして比較した。蛋白質の分子量を明らかにするために大腸菌にて発現した蛋白質に対するポリクローナル抗体を作成し，除神経筋に発現している neurocrescin 蛋白質を同定したところ116 kDa, 48 kDa の 2 種類が認識された。非常に興味深いことに，48 kDa の蛋白質は除神経筋においてのみ検出され神経支配されている筋では検出されなかった。次に真核細胞の細胞株 COS7 で neurocrescin を発現したところ，細胞外に48 kDa の抗体陽性蛋白質が分泌された。この分泌蛋白質のN末端アミノ酸配列を解析したところ，neurocrescin が分子内で切断され分泌されていることが判明した。また，この分泌 neurocrescin は培養脊髄神経細胞に対する神経突起伸長活性も示した。以上の結果より neurocrescin は，除神経さ

れた骨格筋で働き，骨格筋の活動依存的に分泌される運動神経細胞に対する突起伸長因子であると考えられることが分かった。

論文審査の結果の要旨

神経細胞がどのようにして標的細胞を認識してシナプスを形成するのかを知ることは神経回路網形成の機構を明らかにする重要な課題である。その例として，運動神経がその軸索を伸長して骨格筋細胞を神経支配するときに，筋細胞が発現する神経突起伸長因子が軸索の伸長を促すことが予測されていた。また，坐骨神経の損傷等による除神経状態からの再生にも同様の因子が働くことを示唆する報告がなされていた。しかし，このような突起伸長活性を裏付ける因子は，まだ同定されていなかった。

申請者は，坐骨神経の除神経状態において下腿部骨格筋で発現する新規な神経突起伸長因子を同定することを試みた。この蛋白質因子は，生化学的な分離・精製による手法で試みた研究者はあったものの同定されていなかったので，申請者は分子生物学的手法によって因子をコードする mRNA を同定する方法を試みた。先ず，坐骨神経を切除し除神経したヒヨコ下腿部骨格筋には，脊髄神経細胞の神経突起の伸長を促進させる因子か含まれていることを確認した。続いて，この除神経筋の抽出液を抗原としていくつかのモノクローナル抗体を作成し，筋抽出液の突起伸長活性を阻害する機能中和抗体を得た。この抗体は目的因子を認識することが確認されたので，これを用いて除神経筋の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果得られた候補遺伝子のコードしていた組み替え蛋白質は，培養脊髄神経細胞に対する突起伸長活性を示した。そこでこの突起伸長因子を neurocrescin と命名した。neurocrescin の全長 cDNA をニワトリ，マウスからクローニングし，さらにホモロジーの高いヒトの遺伝子が遺伝子データベースより見つかったので，独自にニワトリ，マウスからこれをクローニングして比較した。蛋白質の分子量を明らかにするために大腸菌にて発現した蛋白質に対するポリクローナル抗体を作成し，除神経筋に発現している neurocrescin 蛋白質を同定したところ116 kDa，48 kDa の 2 種類が認識された。非常に興味深いことに，48 kDa の蛋白質は除神経筋においてのみ検出され神経支配されている筋では検出されなかった。次に真核細胞の細胞株 COS7 で neurocrescin を発現したところ，細胞外に48 kDa の抗体陽性蛋白質が分泌された。この分泌蛋白質のN末端アミノ酸配列を解析したところ，neurocrescin が分子内で切断され分泌されていることが判明した。また，この分泌 neurocrescin は培養脊髄神経細胞に対する神経突起伸長活性も示した。以上の結果より neurocrescin は，除神経された骨格筋で働き，骨格筋の活動依存的に分泌される運動神経細胞に対する突起伸長因子であると考えられることが分かった。

以上のように，本論文は神経回路網形成の分子機構の解明に重大な貢献をするものであり，博士論文として価値あるものと認める。