



Title	Mouse semaphorin H inhibits neurite outgrowth from sensory neurons
Author(s)	宮崎, 信雄
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41656
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	宮崎信雄
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第14433号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Mouse semaphorin H inhibits neurite outgrowth from sensory neurons. (マウスセマフォリンHの知覚神経軸索に対する反発活性)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌 (副査) 教授 久保 武 教授 高井 義美

論文内容の要旨

【目的】

セマフォリン／コラプシンファミリーは約500アミノ酸からなるセマドメインを持つ分泌型または膜貫通型蛋白である。セマフォリンIII／D (semaIII／D) は知覚神経の成長円錐を退縮させる分子として同定され、神経軸索誘導に関与することが知られている。我々は神経回路の形成機構を解明する目的で、これまでにいくつかのセマフォリン分子をマウス脳から同定した。そのうちの一つであるマウスセマフォリンH (MSH) は分泌型蛋白であり、構造的にsemaIII／Dと同じグループに属する。本研究では脊髄周囲における MSH mRNA の発現部位と MSH の結合部位、また後根神経節からの神経軸索に対する生物活性について検討した。

【方法ならびに成績】

妊娠した ddY マウスより胎仔を採取し、以下の実験に用いた。

1) *in situ*ハイブリダイゼーション法による MSH mRNA の発現部位の同定

胎生11～16日マウスの凍結切片を作製し、³⁵S-UTP でラベルしたプローブを用いて *in situ*ハイブリダイゼーションを行った。MSH mRNA は胎生11日と12日マウス体幹では主に硬節や間葉組織に発現していた。体節のうち後根神経節の外側に位置する硬節、また後根神経節周囲や脊索周囲の間葉組織に発現していた。硬節のうちでは後根神経節や運動神経からの軸索が通らないことが知られている尾側硬節に発現していた。これらの発現は胎生13日以降徐々に低下し、胎生16日頃にはほとんど消失していた。

2) MSH 蛋白の発現

アルカリホスファターゼ (AP) を融合した MSH 蛋白 (MSH-AP) を発現する NIH3T3細胞の培養上清から MSH-AP を、コントロールとして AP を発現する NIH 3T3細胞の培養上清から AP 蛋白を回収した。また発現蛋白の確認のために抗AP抗体を用いて免疫沈降の後、MSH に対する抗体を用いてウェスタンプロットを行った。MSH-AP は175 kDa の蛋白として認められ、さらに90 kDa と70 kDa の蛋白が認められた。MSH はプロテアーゼである furin の認識部位を 2 カ所有し、これによる分解産物の予想分子量と一致することから、90kDa と70kDa の蛋白は furin による分解産物であると考えられた。

3) MSH 結合活性

リガンド-レセプター結合実験は基本的に Flanagan らの方法に従って行った。MSH 結合活性は後根神経節から伸長する知覚神経に強く、運動神経には中程度に認められた。しかし、知覚神経の起始細胞が存在する後根神経節では結合活性は弱かった。また脊髄の中では外側部と腹側部の辺縁部に結合活性が認められた。

4) 生物活性

MSH の生物活性を調べるために後根神経節と MSH 蛋白を発現する NIH3T3 細胞またはコントロール細胞の共培養をコラーゲンゲル内で行った。後根神経節は胎生12日マウスより採取し、培地は 5%牛胎仔血清と 50ng/ml NGF を含む DMEM 培地を用いた。後根神経節から NGF により誘導される軸索は周囲に影響を及ぼすものがない場合には全ての方向に伸長する。後根神経節を MSH 蛋白発現細胞と共に培養した場合には神経節から発現細胞に面する側の神経節からの軸索伸長が抑制された。また、発現細胞近傍に伸長した軸索はそれらの細胞を避けるように方向を変えて伸長する様子が観察された。一方、神経節をコントロール細胞と共に培養した場合には神経節からの軸索は細胞に向かう軸索も他の方向に向かう軸索も全て同じように伸長した。

【総括】

後根神経節から伸長する神経軸索やこれと共に脊髄神経を構成する運動神経は、体節に一致して神経束を形成し伸長する。これらの神経は吻側硬節を通り、尾側硬節は通らない。この神経の選択的な吻側硬節通過には、主に尾側硬節や周囲の間葉組織からの反発因子が関与していると考えられている。これまでに後根神経節周囲の間葉組織は脊髄神経に対し、拡散性反発活性を有することが示唆されている。また尾側硬節は後根神経節からの軸索が通過しない部位であり、接触性反発因子の存在が示唆されている。本研究において、MSH mRNA はマウス胎生11日頃より後根神経節周囲の間葉組織と尾側硬節の吻側部に発現していることが明らかになった。また、後根神経節からの知覚神経が MSH 結合活性を有し、コラーゲンゲルでの共培養では NGF 依存性の軸索伸長が MSH により反発されることが明らかになった。以上の結果から、脊髄神経の体節的伸長を誘導するために、後根神経節や脊髄神経周囲の間葉組織と尾側硬節に発現する反発因子の 1 つとして MSH が関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、現在、その分子メカニズムが明らかにされていない高等動物の神経回路形成における軸索誘導の分子的理 解を目的として、神経反発分子として同定されたセマフォリンのファミリー分子の同定を行いその機能的役割について検討したものである。最初に神経反発分子として同定されたセマフォリン分子である semaIII と 60% の相同性を示すセマフォリン H (M-semaH) をマウス脳からクローニングし、M-semaH の生体内における機能を予測するために、mRNA の発現のパターンを調べ、その生理活性と受容体を検討した。その結果、1) M-semaH の mRNA は胎仔の体幹においてあたかも脊髄神経の分節的投射路を誘導している可能性を示唆するかのように、脊髄神経が通らないことが知られている体節の尾側硬節や脊髄神経節周囲の間葉組織に mRNA が発現すること、2) M-semaH 発現細胞と脊髄神経節の共培養系で M-semaH が脊髄神経節からの神経伸長を反発し方向を変える作用を有すること、3) 脊髄神経に M-semaH 総合活性があること、4) M-semaH の受容体がニューロビリン 1 であることを明らかにした。

以上、本論文は M-semaH が知覚神経の反発分子として脊髄神経の通過路周囲の組織に発現し、脊髄神経の分節的投射を誘導していることを示唆するものであり、神経回路形成の分子機構の解明につながる重要な知見を提供している。したがって本論文は学位の授与に値すると考えられる。