

Title	神経損傷応答性新規遺伝子(neurorep1)の機能に関する研究
Author(s)	上部, 健一郎
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43048
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	上 部 健 一 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 8 0 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 1 年 4 月 3 0 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	神 經 損 傷 応 答 性 新 規 遺 伝 子 (neurorep 1) の 機 能 に 関 する 研 究
論 文 審 査 委 員	(主 査) 教 授 馬 場 明 道 (副 査) 教 授 前 田 正 知 教 授 山 元 弘 教 授 松 田 敏 夫

論 文 内 容 の 要 旨

中枢神経は損傷に対して脆弱であるが、ラットの顔面神経のような末梢運動神経は損傷を受けると、その後修復、再生することが知られている。本研究の目的は中枢及び末梢神経の修復、再生のメカニズムを分子レベルで理解することにある。その為にはこのような病変が生じたときに発現が変動する遺伝子を分離し、その機能解析を行う必要がある。本研究では、ラット顔面神経軸索切断に伴い発現が変動する遺伝子群をディファレンシャルハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした。神経損傷の実験系としてラット顔面神経軸索損傷モデルを選んだ主な理由は、末梢運動神経は損傷に対して脆弱な中枢神経に比べ比較的容易に修復、再生できることが挙げられ、この末梢運動神経の高い修復、再生能力を解明できれば、損傷を受けた中枢神経を保護し、機能再生する手がかりが得られると予想されるからである。軸索切断側の顔面神経核から作製した約5,000個のcDNAをスクリーニングしたところ、軸索切断に伴い発現が変動する候補遺伝子が139個得られ、その内新規遺伝子3つを含む27個の遺伝子が、in situハイブリダイゼーションにより、顔面神経切断に伴い発現変動することが確認できた。本研究では、神経細胞内での修復機転を調べることに重点を置くため、これらの遺伝子の中から神経損傷に応答して神経細胞で発現が上昇する新規遺伝子neurorep 1の機能を解析することにした。neurorep 1の神経損傷後のmRNA発現の経時的变化を調べてみると、損傷後7日目あたりで遺伝子発現誘導が極大に達し、その後徐々に減弱することが明らかになった。軸索切断後7日目の時点は、actin、tubulin等の細胞骨格構成蛋白質の合成がもっとも盛んに行われている時期であり、またCystatin C等が活性化ミクログリアからもっとも盛んに合成されている時期、すなわちミクログリアによる神経組織修復が盛んに行われている時期でもある。このような時期にNeurorep 1は神経修復のために働いている可能性がある。また正常ラットの各臓器でのneurorep 1 mRNAの発現の検討を行った結果、調べた全ての臓器でその発現が認められ、肝臓、脳、腎臓で特に多く発現していることが分かった。このことからneurorep 1は脳以外の組織でも何らかの機能をしている可能性が考えられる。全長neurorep 1 cDNAがコードする蛋白質は293アミノ酸からなり推定分子量が約34 kDaであった。

Neurorep 1の機能解析を行うために先ず、抗Neurorep 1抗体を作製し、Neurorep 1のラット脳内での分布と細

胞内での局在を知ることを試みた。正常ラットの脳で Neurorep 1 の免疫組織化学を行った結果、脳幹、間脳では、顔面神経核、網様体、視床下部外側部、マイネルト基底核の神経細胞が Neurorep 1 陽性であり、グリア細胞で陽性のものは非常に少なかった。また終脳では大脳皮質の第 5 層の一部の神経細胞が陽性であった以外は Neurorep 1 陽性の神経細胞は少なく、陽性アストログリアの数が多いことが分かった。Neurorep 1 陽性の神経細胞は脳のある部位に限られているため、このことは Neurorep 1 の正常脳内での機能を反映していることが考えられる。また、顔面神経核の免疫組織化学では、予想された通り軸索切断に伴い、Neurorep 1 の量が神経細胞で増加していることが明らかとなった。Neurorep 1 の N 末端にはシグナル配列は存在しないことから、Neurorep 1 は分泌性、及び膜蛋白質の可能性が低いと考えられた。実際、大脳皮質のアストロサイト細胞内での Neurorep 1 の局在を電顕免疫組織化学により調べた結果、Neurorep 1 は細胞内の特定のオルガネラと相関を示さず、細胞内で弥漫性に存在していることが明らかになった。次に Neurorep 1 は C 末端付近に ecto-5'-nucleotidase のコンセンサス配列を 1 つ持つことを手がかりとして、in vitro での Neurorep 1 の機能解析を行った。その結果、Neurorep 1 自身には ecto-5'-nucleotidase の活性が存在しないが、ecto-5'-nucleotidase の活性を有意に増強させることが明らかになった。また、ecto-5'-nucleotidase が Neurorep 1 に会合し得ることも明らかになった。ecto-5'-nucleotidase により産生されるアデノシンは、損傷を受けた神経の突起伸展を促し、活性化ミクログリアの増殖にも必要であるとされ、また神経細胞保護にも働くと考えられている。Neurorep 1 は、神経損傷後の修復、再生に積極的に関与すると考えられている ecto-5'-nucleotidase の活性を増強することにより、細胞外アデノシンを量産し、神経の損傷修復に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。Neurorep 1 が ecto-5'-nucleotidase の活性を増強するメカニズムは現在のところ不明であるが、in vitro の実験で、Neurorep 1 が 5'-AMP と特異的に結合することが明らかとなったため、ecto-5'-nucleotidase の活性増強時に、Neurorep 1、ecto-5'-nucleotidase そしてその基質である 5'-AMP がどのように作用し合っているのか詳細に検討をする必要がある。また Neurorep 1 のデリーションミュータントを用いた実験から、ecto-5'-nucleotidase の活性増強には Neurorep 1 が持っている、ecto-5'-nucleotidase のコンセンサス配列が必要であることが明らかとなった。Neurorep 1 の機能解析は主として in vitro で行われた為、in vivo でも予想される機能を持ち、神経修復、再生に関与しているかを検討する必要がある。そのためには、neurorep 1 ノックアウトマウスや neurorep 1 のアンチセンスを投与したマウスを用い、神経損傷後の神経の修復、再生にどのような変化を示すか検討し、同時に抗アデノシン抗体を用い、顔面神経核におけるアデノシンの量の変化を調べる方法等が考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ラット顔面神経軸索切断に伴い発現が変動する遺伝子群の同定を試み、その中で新規遺伝子 neurorep 1 を見出した。neurorep 1 は、ラットの顔面神経軸索切断に伴い神経細胞で発現が上昇する遺伝子で、ミクログリアを含む神経組織の修復、再生が活発に行われている時期に神経再生のために機能していることを示した。Neurorep 1 蛋白質は、ecto-5'-nucleotidase と会合し、且つその活性を有意に増強させる機能を持つことを明らかにした。

本研究は、神経修復、再生に関わる新規遺伝子とその発現蛋白質の機能を明らかにしたものであり、薬学博士に値するものと判定する。