

| | |
|---------|--|
| 氏名 | 井上秀世 いの うえ ひで よ |
| 学位の種類 | 薬学博士 |
| 学位記番号 | 薬博第 179 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和 54 年 7 月 23 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 5 条第 1 項該当 |
| 研究科・専攻 | 薬学研究科薬学専攻 |
| 学位論文題目 | An x-ray diffraction study of the nerve myelin sheath (神経ミエリン鞘の X 線的研究) |

論文調査委員 (主査) 教授 大崎健次 教授 高木博司 教授 中垣正幸

論文内容の要旨

神経ミエリンはシュワン細胞（末梢神経系，PNS）あるいはオリゴデンドログリア細胞（中枢神経系，CNS）の細胞膜が神経細胞の軸索のまわりにトイレットペーパー型に巻きついたもので，細胞膜の内側同志又外側同志が交互に接触して周期的に重なる構造をとる。この為，神経そのものに X 線を入射するところの構造からの強い回折を生じ，生体膜としては非常によいラメラ反射（ブラッグ反射）を小角領域に生ずる。この回折線の方向から基本周期が，又強度と位相情報から膜面に垂直な方向の平均の電子密度分布が得られる。又，反射のプロファイルのひろがりから膜の重なり方の乱れの程度が，散漫散乱の増減から，非晶質部分の増減が調べられる。更に 2 個以上の相が共存する時には，それぞれの相の反射の全回折強度を求めて，その存在比を求めることができる。その他，炭化水素間の平均距離とその状態は広角反射と比較できる。その上，X 線回折法では電顕法の場合のように，試料作製のための処理をする必要がなく，神経そのままの状態で，神経ミエリン膜の構造を分子レベルで調べられる。ところで神経ミエリン膜はいわゆる興奮膜ではなく，その機能が十分に知られているとはいえないが，ミエリン構造の崩壊や不完全な生成により，インパルスの伝導障害を生じ，多発性硬化症など多くの神経症が生じることが知られている。

著者は，この原因の究明とその対策についての研究の一環として，単独細胞としてはルーズに接触している細胞がどのようにして $20 \text{ \AA} \sim 30 \text{ \AA}$ の間隔で規則正しく密着した，コンパクトなミエリンを形成するのか，又これがどのようなメカニズムで崩壊するのかなど，ミエリン構造の安定性についての研究を行なった。すなわち，細胞外及び細胞内から環境変化を生じさせ，これに対応する構造変化を X 線回折法で追求し，この結果から，ミエリン構造の変化が膜中のどのような成分分子のどのような挙動によって支配されるのか推論した。

1) 神経ミエリンの基本周期

基本周期は回折 X 線の方向から直接求められる値で，膜間相互作用の結果を直接観測できることから重要である。神経ミエリンの基本周期は CNS と PNS で，又動物種によって異なることが知られていた。

その半面それぞれの値にはかなりのばらつきがみられ ($\pm 5 \text{ \AA}$) これは個体差によるものとされていた。外部環境変化に対応する構造変化の X 線実験をくりかえすうち、この基本周期の変動の大部分は試料の環境の差と、回折線の測定誤差にもとづくものと結論できた。そこで環境変化については、1) 動物の飼育条件 (温度、飼料など)、2) 死後の経過時間と摘出技術、3) リンゲル液、4) 試料の保存状態 (温度、加圧) 5) X 線の照射時間について調べた結果、2)~4) が支配的であることがわかった。これらの条件を揃えることによって、基本周期の再現性は向上した。この状態では従来問題とならなかった X 線カメラのジオメトリーにもとづく測定誤差を吟味する必要が生じ、その関係式を導いた。その結果、基本周期の精度は小角領域に回折を与える適当な標準物質の選択によって向上することが、コレステロール、ミリスチン酸ナトリウムを用いて示された。これらの問題に注意し、補正して求めた基本周期は鯉の脊髄の場合、1.2%の精度で測定できることがわかった。

以上の結果、神経ミエリンの構造は神経系と動物種が決まれば個体差を無視して測定することができることが示された。この結果は環境変化による微妙な構造変化も X 線回折で促えられることを示し、以下の実験の基礎を与えた。

2) ウサギの座骨神経ミエリン膜に対する DMSO, アセトン, グルタルアルデヒド (G.A.) の与える効果——外部から与えた環境変化にもとづく構造変化

ウサギの座骨神経は新鮮状態で $d=184 \text{ \AA}$ の F 相のみの X 線回折を与える。これを DMSO を含んだリンゲル液につけると、相分離が起って、数種の回折パターンが重なった形で観測される。DMSO 濃度 30% では $d=120 \text{ \AA}$ の C 相と 184 \AA の N 相が共存し、処理後 DMSO を含まないリンゲル液に戻すと、元の F 相が回復する。ところが 40% 以上の濃度になると、 $d=120 \text{ \AA}$ の C' 相と $d=200 \text{ \AA}$ の E 相が共存し、リンゲル液に戻すと F と少し異なる F' 相になる。この不可逆変化はアセトンの場合は 20% 以上でおこる。DMSO とアセトンの作用による可逆性から不可逆性への構造変化には同一の様式がみられる。すなわち、不可逆的になる場合には、1) N 相が E 相になる、2) C 相が奇数次の弱い C' 相になる、3) F' はわずかに基本周期が増し、奇数次の反射が弱くなり、構造の乱れが増加する。F 相と F' 相の電子密度分布を比較すると周期のひろがりには主に細胞質側の間隙と脂質二重層部分の広がりによることがわかった。又 C 相と C' 相は脂質で作った膜のラメラ反射とよく似ており、特に C' 相でそれが著しい。このことは DMSO を作用させたあと乾燥し強度変化をみると、抽出脂質のそれと似た挙動を示すことからいえる。更に、G.A. で固定したあと、高濃度の DMSO を作用させても C 相が得られた。以上のことから DMSO, アセトンを作用させると、脂質に富んだ相と脂質と蛋白質の強く結合した相に同一膜面内で分離すること、又膜の疎水領域に非対称的に存在する成分が変化することによって、N 相が E 相に変わり、リンゲル液に戻すと F' 相になることが示された。ミエリンのコンパクトな構造保持にはこの成分が重要であると考えられる。

3) 鯉の脊髄ミエリンの死後変化——内部から生じる環境変化にもとづく構造変化

脊椎動物の神経ミエリンは新鮮状態では、単一相から成るが、魚に限って 2 相から成ることが知られていた。鯉の死後直ちに、リンゲル液とともにキャピラリに封じて、X 線回折法で時間変化を追跡したところ、 $d=155 \text{ \AA}$ の I 相が $d=183 \text{ \AA}$ の II 相に変化していくことが見出された。この間、それぞれの相の基

本周期，構造因子は不変で，全回折強度のみが変わった。この変化は温度を下げることによって，又架橋剤である G.A. によって抑えられるほか，低い pH や phosphate バッファーによっても抑制されることをつきとめた。このことは膜構成成分中のある蛋白質がミエリン膜の安定化に関与していることを示している。又体内においても I 相から II 相への変化が死後生じることが確かめられた。I 相と II 相の電子密度分布から，基本周期の差 28 \AA は主として細胞質側の間隙と，脂質二重層部分のひろがりのちがいでよっている。これは細胞質側に存する成分と，疎水部にある成分が関与していることを示している。

以上の結果，死後に細胞内で生ずる変化は G.A. で固定され，疎水部と膜の細胞質側に存在する成分が変化することによって，膜内の分子集合状態が変わることによると考えられる。

以上の研究から，ミエリン膜の安定化には，膜の疎水領域に非対称的に存在する成分が重要で，これが膜の細胞質側に存する成分と関連をもって行動するモデルが最も理解しやすいものと思われる。鯉の脊髄ミエリンの研究から，PNS と CNS の基本周期にみられる膜間相互作用のちがいは，膜構成成分のアセンブリのちがいでよって生ずることを予想させる。又死後変化との関連から脱髄現象の分子レベルでの解明につながるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

神経ミエリン鞘は生体膜のうちで X 線回折法による構造研究に最も適した組織であるが，本論文は，DMSO などの試薬の作用やその他の環境変化によるミエリン構造の変化を追究することによって，その構造自体およびそれを安定化する要因を探ろうとしたものである。

神経ミエリンの構造に関しては，従来その基本周期に動物種による差ばかりでなく個体によるばらつきも大きいため，これを手がかりとする構造研究は実りが少いと考えられていた。

井上は，多くの予備実験の結果，測定装置に起因する誤差を検討し除去すると共に，動物の飼育条件をも含めた試料の調製・処理条件を注意深く制御することによって，個体差は充分に無視しうることを，その結果，基本周期の測定精度が少くとも 3 倍に向上することを示し，この成果を基礎として以下の研究を行った。

DMSO その他の試薬によるウサギの座骨神経ミエリン膜の構造変化を種々の試薬濃度について比較検討した結果，ある濃度以上では不可逆的な構造変化を生じ，脂質に富む相と，脂質とたんぱく質とが強く結合した相とに同一膜面内で分離することを結論し，さらに，ミエリンのコンパクトな構造の保持には膜の疎水領域に非対称的に存在する成分が重要な役割を持つことを推論した。

魚類の場合には神経ミエリンが 2 種の相からなることが以前から報告されていたが，著者は充分な測定精度の得られる条件の下に X 線回折図形の時間的変化を追跡した結果，基本周期 155 \AA の I 相から死後変化によって 183 \AA の II 相が生じていることを確めた。また，両相の電子密度分布の差と，この変化がグルタールアルデヒドなどの架橋剤その他の試薬によって抑えられることから，この変化は疎水部分と細胞質側に存在する成分の変化によって膜内の分子集合状態に変化が生じたものと結論した。

以上，著者の研究は，生体膜の X 線回折的研究において高い精度と再現性を得るための条件の幾つかを明らかにしたばかりでなく，神経ミエリン膜における構造の研究を通して，その安定化に寄与する物質の

所在についての推論をしたものであって、生体膜の構造と機能に関する今後の研究に寄与するところ大である。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。