

氏名	服部 喜之
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第 422 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬学研究科薬品作用制御システム専攻
学位論文題目	Fibroblast Growth Factor-5 の脳内発現に関する研究

(主査)

論文調査委員 教授 伊藤信行 教授 川寄敏祐 教授 佐藤公道

論文内容の要旨

Fibroblast Growth Factor (FGF) は、ペプチド性増殖因子の一つであり、現在アミノ酸配列の相同性により FGF-1 から FGF-18 までの 18 種類が同定されている。これら 18 種類の FGF の中でも、プロトタイプである acidic FGF (aFGF), basic FGF (bFGF) についてはよく研究されており、これらは様々な臓器に存在し、多様な生理活性を示すペプチドであるが、脳にも多く存在し、神経栄養作用、神経分化作用を示すことから脳神経系で重要な役割を果たしていると考えられる。又、FGF-5 は胎児期における形態形成、成体の脳における神経栄養因子として働くことが報告されている。著者は生後の脳発達過程における FGF mRNA の発現を *in situ hybridization* 法により調べた。その結果、生後の脳発達過程においては、ほとんどの FGF が Adult での発現部位と同じ領域でその発現が見られたが、FGF-5 mRNA のみが Adult での発現領域とは別に小脳皮質で一過性に発現が見られたのでこれについて詳しく検討を行った。又、FGF-5 の研究の過程において FGF-5 のアイソフォームをコードする cDNA を単離したので、その構造を調べ、発現分布、生理活性についても FGF-5 と比較し、検討を行った。

第一章 FGF-5 の生後の脳内発現に関する研究

著者は生後の脳発達過程における FGF の生理機能を解明することを目的として、生後 2 日、7 日、11 日、15 日、49 日のラット脳において 10 種類の FGF mRNA の発現分布を調べた。その結果、FGF-5 mRNA のみが Adult での発現領域である海馬、視床とは別に、生後 11 日目前後において小脳皮質の内顆粒層の顆粒細胞で一過性に高発現していた。又、当研究室において FGF レセプターについても同様に調べたところ、FGFR-4 mRNA が FGF-5 mRNA の高発現するのと同じ時期に小脳皮質の外顆粒層の顆粒細胞で一過性に高発現していることを明らかにしていたため、FGF-5 と FGFR-4 それぞれのタンパク質を作成し、FGF-5 が FGFR-4 に結合できるかどうか検討を行った。その結果、FGF-5 は FGFR-4 に結合することが判った。これらのことから生後の小脳形成時において内顆粒層の顆粒細胞で発現した FGF-5 が、外顆粒層の顆粒細胞で発現している FGFR-4 に作用し、顆粒細胞の増殖、分化などに関与しているのではないかと考えられる。

第二章 FGF-5 の欠失型アイソフォームに関する研究

著者は FGF-5 の研究の過程で FGF-5 のアイソフォームをコードしている cDNA を単離した。FGF-5 cDNA が 266 アミノ酸残基をコードしているのに対し、この cDNA は FGF-5 の N 末端から 117 個のアミノ酸と 4 つのアミノ酸をコードしていたことから、この cDNA は FGF-5 の C 末端を半分ほど欠失した欠失型 FGF-5 をコードしていることが判った。さらに FGF-5 遺伝子の構造を調べた結果、FGF-5 mRNA が Exon 1 から Exon 3 の 3 つの Exon で構成されていたのに対し、欠失型 FGF-5 mRNA は Exon 1 と Exon 3 の 2 つの Exon で構成されており、FGF-5 遺伝子より alternative splicing により生成されるものと考えられた。そしてこの欠失型 FGF-5 mRNA は FGF-5 mRNA と共に胎児期及び、Adult の脳で発現していた。さらに欠失型 FGF-5 をタンパク質として発現させ、FGF-5 と結合することが報告されている FGFR-1 との結合性について検討を行ったところ、欠失型 FGF-5 は FGFR-1 に結合することが判った。欠失型 FGF-5 が FGF

レセプターに結合できることから線維芽細胞に対する増殖活性を調べたところ、欠失型FGF-5は細胞増殖活性を示さず、FGF-5の細胞増殖作用に対し拮抗作用を示した。これらのことから今回単離した欠失型FGF-5はAdult脳、胎児期においてFGF-5と共に発現し、FGF-5の活性を調節する因子として働いていることが示唆された。

以上、著者は生後の脳発達過程で小脳皮質で一過性に発現するFGF-5の存在を明らかにし、FGF-5が小脳分化に関与する可能性を示唆する結果を得た。又、脳内で発現するFGF-5の欠失型アイソフォームの存在を明らかにした上で、FGF-5とのレセプターとの親和性、細胞増殖活性における相違点から欠失型FGF-5の存在意義を推測した。本研究は、FGF-5の脳内における生理的役割の解明に寄与するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

Fibroblast Growth Factor (FGF) は、ペプチド性増殖因子の一つであり、現在アミノ酸配列の相同性によりFGF-1からFGF-18までの18種類が同定されている。これら18種類のFGFの中でも、プロトタイプであるacidic FGF (aFGF), basic FGF (bFGF) についてはよく研究されており、これらは様々な臓器に存在し、多様な生理活性を示すペプチドであるが、脳にも多く存在し、神経栄養作用、神経分化作用を示すことから脳神経系で重要な役割を果たしていると考えられる。又、FGF-5は胎児期における形態形成、成体の脳における神経栄養因子として働くことが報告されている。著者は生後の脳発達過程におけるFGF mRNAの発現をin situ hybridization法により調べた。その結果、生後の脳発達過程においてはほとんどのFGFがAdult脳での発現部位と同じ領域でその発現が見られたが、FGF-5 mRNAのみがAdultでの発現領域とは別に小脳皮質で一過性に発現が見られたのでこれについて詳しく検討を行った。又、FGF-5の研究の過程においてFGF-5のアイソフォームをコードするcDNAを単離したので、その構造を調べ、発現分布、生理活性についてもFGF-5と比較し、検討を行った。

著者は生後の脳発達過程におけるFGFの生理機能を解明することを目的として、生後2日、7日、11日、15日、49日のラット脳において10種類のFGF mRNAの発現分布を調べた。その結果、FGF-5 mRNAのみがAdultでの発現領域である海馬、視床とは別に、生後11日目前後において小脳皮質の内顆粒層の顆粒細胞で一過性に高発現していた。又、当研究室においてFGFレセプターについても同様に調べたところ、FGFR-4 mRNAがFGF-5 mRNAの高発現するのと同じ時期に小脳皮質の外顆粒層の顆粒細胞で一過性に高発現していることを明らかにしていたため、FGF-5とFGFR-4それぞれのタンパク質を作成し、FGF-5がFGFR-4に結合できるかどうか検討を行った。その結果、FGF-5はFGFR-4に結合することが判った。これらのことから生後の小脳形成時において内顆粒層の顆粒細胞で発現したFGF-5が、外顆粒層の顆粒細胞で発現しているFGFR-4に作用し、顆粒細胞の増殖、分化などに関与しているのではないかと考えられる。

又、著者はFGF-5の研究の過程でFGF-5のアイソフォームをコードしているcDNAを単離した。FGF-5 cDNAが266アミノ酸残基をコードしているのに対し、このcDNAはFGF-5のN末端から117個のアミノ酸と4つのアミノ酸をコードしていたことから、このcDNAはFGF-5のC末端を半分ほど欠失した欠失型FGF-5をコードしていることが判った。さらにFGF-5遺伝子の構造を調べた結果、FGF-5 mRNAがExon 1からExon 3の3つのExonで構成されていたのに対し、欠失型FGF-5 mRNAはExon 1とExon 3の2つのExonで構成されており、FGF-5遺伝子よりalternative splicingにより生成されるものと考えられた。そしてこの欠失型FGF-5 mRNAはFGF-5 mRNAと共に胎児期及び、Adultの脳で発現していた。さらに欠失型FGF-5をタンパク質として発現させ、FGF-5と結合することが報告されているFGFR-1との結合性について検討を行ったところ、欠失型FGF-5はFGFR-1に結合することが判った。欠失型FGF-5がFGFレセプターに結合できることから線維芽細胞に対する増殖活性を調べたところ、欠失型FGF-5は細胞増殖活性を示さず、FGF-5の細胞増殖作用に対し拮抗作用を示した。これらのことから今回単離した欠失型FGF-5はAdult脳、胎児期においてFGF-5と共に発現し、FGF-5の活性を調節する因子として働いていることが示唆された。

以上、著者は生後の脳発達過程で小脳皮質で一過性に発現するFGF-5の存在を明らかにし、FGF-5が小脳分化に関与する可能性を示唆する結果を得た。又、脳内で発現するFGF-5の欠失型アイソフォームの存在を明らかにした上で、FGF-5とのレセプターとの親和性、細胞増殖活性における相違点から欠失型FGF-5の存在意義を推測した。本研究は、FGF-5の脳内における生理的役割の解明に寄与するものと考えられる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値のあるものと認める。

更に、平成11年2月18日の論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。