

氏 名	ま べ やす こ 真 鍋 康 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1164 号
学位授与の日付	平 成 13 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	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Identification of the bioactive peptides in the rat brain with the hydra bioassay system and analysis of their functions (ヒドラバイオアッセイシステムを用いた脳内生理活性物質の同定とその機能解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 伏 木 亨 教 授 佐 々 木 隆 造 教 授 森 友 彦

論 文 内 容 の 要 旨

脳の情報処理過程は非常に複雑であり、この働きを解明するには多方面からの研究が必要とされる。本論文では脳情報処理過程の一部を担う脳内生理活性物質に注目し、生理的变化にともなう脳脊髄液中の生理活性物質の変動を検討している。脳脊髄液中に存在する生理活性物質は微量であり、物質のわずかな変動を検知するにはこれまで一般に行われている方法では困難であった。そこで、超微量の蛋白性物質に鋭敏に反応するヒドラバイオアッセイを応用し、その反応解析により生理的变化にともなう脳脊髄液中の変動成分の同定を行うことに成功した。さらに、同定した物質が実際に脳内で生理的な応答に関与していることを動物実験により実証した。本研究で得られた主な成果は以下の通りである。

1. 脳内生理活性物質の変化の検知に利用するためヒドラバイオアッセイ系の実用化に向けた再構築を行った。ヒドラの触手球形成応答を用いるアッセイは生理活性物質のわずかな変動を検知できるという特徴がある反面、非常に環境に敏感であり、温度、培養時の水質、ヒドラの餌である *Artemia* の質に影響を受けやすい。水や餌の質、および餌中の夾雑物質に関して詳細な検討を行い、安定したヒドラの応答を得るためにはヒドラの餌である *Artemia* の孵化溶液への微量の $ZnCl_2$ 添加が有効であることを明らかにした。さらに、確立した系で様々な生理活性ペプチドに対するヒドラの応答パターンのデータを蓄積することにより、生理的变化にともない変動する脳脊髄液中の生理活性物質スクリーニングの系を確立した。
2. 確立したヒドラのアッセイ系を用いて、運動後の疲労にともないラット脳内で変動する物質の検索を行い、疲労困憊に至るまで運動させたラットから採取した脳脊髄液中には transforming growth factor-beta ($TGF-\beta$) が増加していることを示した。疲労させたラットの脳脊髄液を抗 $TGF-\beta$ 抗体を用いて中和処理すると、触手球形成抑制パターンが消失した。また、インヒピン、アクチピンなどの $TGF-\beta$ スーパーファミリーに分類される他のペプチドでは $TGF-\beta$ と同様な効果は観察されないことを示し、疲労と脳内 $TGF-\beta$ の関わりを強く示唆する成果を得た。
3. 好ましくない味に対する嫌悪感発生の脳機序を解明する目的で、苦味を有するキニーネ溶液を口腔内カニューレによって強制的に注入されたラットの脳脊髄液を採取し、無処置のマウスの脳内に投与した。この脳脊髄液を脳内に投与されたマウスのスクロース摂取量が有意に抑制されたことから、キニーネを投与されたラットの脳脊髄液中には苦味への嫌悪感に関わる何らかの物質が分泌されていることが示唆された。そこで、この脳脊髄液に含まれる生理活性物質を、ヒドラを用いたバイオアッセイにより検討し、この物質が diazepam binding inhibitor (DBI) 様の物質であることを明らかにした。
4. ヒドラのバイオアッセイによりキニーネを与えたラットの脳脊髄液中には DBI 様の物質が分泌されていることが示唆されたため、DBI ペプチドフラグメントをマウスの第四脳室に投与したときのスクロース溶液摂取を検討した。その結果、DBI の投与によって、キニーネ溶液摂取ラットの脳脊髄液を投与したときと同様にスクロース溶液の摂取が抑制されることが明らかになった。スクロース溶液の摂取抑制に対して、ベンゾジアゼピンレセプターのアンタゴニストであるフルマゼニルの前投与が、部分的ではあるが拮抗することを明らかにした。DBI 投与による溶液の摂取抑制はスクロースだけではなく薄いキニーネや水の摂取においても同様に観察されることを示した。これらのことから DBI 様物質が、摂取した溶液

に対する嫌悪に関連して分泌されていることを示唆した。

論文審査の結果の要旨

動物の生理行動は、脳内での複雑な神経伝達によって制御されている。伝達信号の強弱は神経の発火頻度と比例しているため、シナプス周辺に蓄積された神経伝達物質の濃度によって行動が制御されていると捉えることもできる。また、このような物質は、脳を満たしている脳脊髄液中を拡散する。

本研究では動物の特定の生理・状態の変化にともなって脳脊髄液中での濃度が増加する生理活性物質の同定を目的として、超微量の蛋白性物質に鋭敏に反応するヒドラバイオアッセイを応用し微量成分の解析・同定を行った。さらに、同定した物質が実際に脳内で生理的な応答に関与していることを動物実験により検討した。本論文において評価できる点は次の通りである。

1. 脳内生理活性物質の変化の検知に利用するためヒドラバイオアッセイ系の実用化に向けた再構築を行った。安定したヒドラの応答を得るためにはヒドラの餌である *Artemia* の孵化溶液への微量の $ZnCl_2$ 添加が有効であることを明らかにした。確立した系で様々な生理活性ペプチドに対するヒドラの応答パターンを蓄積することにより、生理的变化にともない変動する脳脊髄液中の生理活性物質スクリーニングの系を確立した。さらにヒドラを用いて $TGF-\beta$ を定量する系を確立し、疲労したラットの脳脊髄液中で $TGF-\beta$ が増加していることを確かめた。

2. 好ましくない味に対する嫌悪感発生の脳機序を解明する目的で、苦味を有するキニーネ溶液を摂取させたラットの脳脊髄液をマウスの脳内に投与した。投与されたマウスのスクロース摂取量が抑制されたことから、脳脊髄液中には何らかの物質が分泌されていることを示唆した。ヒドラを用いたバイオアッセイによりこの物質は diazepam binding inhibitor (DBI) 様の物質であることを明らかにした。

3. DBI ペプチドフラグメントをマウスの第四脳室に投与したときのスクロース溶液摂取について調べ、キニーネ溶液摂取ラットの脳脊髄液を投与したときと同様にスクロース溶液の摂取が抑制されることを明らかにした。スクロース溶液の摂取抑制に対して、ベンゾジアゼピンレセプターのアンタゴニストであるフルマゼニルの前投与が、部分的ではあるが拮抗することを明らかにした。DBI 投与による溶液の摂取抑制はスクロースだけではなく薄いキニーネや水の摂取においても同様に観察されることを示した。これらのことから DBI 様物質が、摂取した溶液に対する嫌悪に関連して分泌されていることを示唆した。

以上のように本論文は、超微量生理活性物質を同定できるヒドラのバイオアッセイ系を整備し実用化した。さらに、実験動物に苦味物質を投与した時に、脳内に嫌悪感に関わる物質が放出されることを明らかにし、ヒドラのバイオアッセイ系並びに実験動物を用いてその物質の実体を解明したものであり、味覚生理学、栄養生理学並びに脳機能科学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年1月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。