

氏 名	たけ 武 富 雅 則
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2595 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学位論文題目	Nogo-A expression in mature oligodendrocytes of rat spinal cord in association with specific molecules (ラット脊髄の成熟オリゴデンドロサイトにおける Nogo-A の発現と結合分子に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 金 子 武 嗣 教 授 影 山 龍 一 郎 教 授 井 出 千 束

論 文 内 容 の 要 旨

Nogo はオリゴデンドロサイト／髄鞘に付随する分子で、ニューロンの突起伸長を抑制する膜貫通蛋白として2000年にクローニングされた。この分子は2つの疎水性部分を持ち、Nogo-A, -B, -C 3種類のアイズォイムがある。このうち Nogo-A がニューロン突起伸長を阻害する主な分子と考えられている。トポロジーとして、N 末端が細胞外に露出している型と、疎水性部分に挟まれた共通部分が細胞外に露出している型の2種類が考えられている。しかしながら、Nogo-A の細胞内局在については異論が多く、細胞内小器官との関連も不明である。本研究では、Nogo-A の N 末端623-640アミノ酸配列部分を抗原とし、ウサギにてポリクロナール抗体を作成した。この抗体を用いて、ラットの生後発達期(生後1日より21日齢)および8週齢の頸髄後索における Nogo-A の発現と局在を免疫組織化学的に検出し、レーザー顕微鏡と電子顕微鏡で調べた。また Nogo-A 遺伝子を導入した COS7 細胞を用いて Nogo-A の局在、および Nogo-A と結合する蛋白(髄鞘塩基性蛋白およびチューブリン)を同定し、細胞内小器官との関連を調べた。

生後1～12日齢では、Nogo-A とチューブリンはオリゴデンドロサイトや髄鞘にはまだ発現しておらず、皮質脊髓路を構成する軸索のみに発現していた。一方、髄鞘塩基性蛋白(MBP)は髄鞘形成初期のオリゴデンドロサイトに発現していた。生後21日齢では、Nogo-A とチューブリンがオリゴデンドロサイトおよび軸索に共発現していた。また成熟髄鞘(compact myelin)を持ったオリゴデンドロサイトでは Nogo-A と MBP が共発現していた。compact myelin そのものに Nogo-A の発現を認めることはなかった。電顕的に Nogo-A はオリゴデンドロサイトの細胞質および軸索内部に局在していたが、細胞膜表面や髄鞘には認められなかった。遺伝子導入の COS7 細胞の免疫組織化学で、Nogo-A は細胞膜表面には認められず、細胞質内で細胞骨格様の局在様式を示した。また分裂期 COS7 細胞において、Nogo-A が紡錘糸に特異的に局在している所見から、チューブリンとの関連が強く示唆された。免疫沈降にて Nogo-A, MBP, チューブリンは互いに結合している事が明らかになった。

従来、Nogo-A は出生直後の幼若オリゴデンドロサイトから既に発現し、髄鞘そのものにも局在すると言われてきた。しかし本研究で、Nogo-A は、compact myelin を伴った成熟オリゴデンドロサイトに初めて発現し、細胞膜表面や髄鞘ではなく、主に細胞内に局在することが明らかになった。MBP は髄鞘の成分であり、チューブリンは細胞内物質輸送に関与している。従って Nogo-A はこれら2つの蛋白と結合する事によって、オリゴデンドロサイトの細胞体から突起先端への MBP の輸送に関与して、髄鞘形成に大きな役割を果たしているものと考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Nogo-A はニューロンの突起伸長を阻害する分子として神経の再生に関与すると考えられている。しかしながら、Nogo-A の細胞レベルの局在や発生における発現時期には異論が多く、機能的な意義付けについても不明な点が多い。

本論文で申請者は、生後発達期及び成熟ラットの頸髄後索において、Nogo-A の発現時期と細胞レベルの局在を免疫組

組織化学的に調べた。また、遺伝子導入 COS7 細胞においても同様に調べた。さらに、Nogo-A と結合する蛋白を同定し、細胞内小器官との関連を調べた。

Nogo-A は、幼若オリゴデンドロサイトには発現せず、完成した髄鞘を伴った成熟オリゴデンドロサイトに初めて発現した。一方軸索内には生後直後から Nogo-A の発現が見られた。電顕免疫組織化学で、Nogo-A はオリゴデンドロサイト及び遺伝子導入 COS7 細胞の細胞内に局在し、一部は微細管と思われる構造に一致して存在していた。いずれの細胞でも細胞膜表面への局在は認められなかった。また免疫沈降によって Nogo-A はミエリン塩基性蛋白 (MBP) 及びチューブリンと結合する事が明らかとなった。Nogo-A は、チューブリン及び MBP と関連して成熟髄鞘の形成と維持に大きな役割を果たす事が示唆された。

以上の研究は、Nogo-A の局在と関連分子を明らかにし、Nogo-A の新たな機能的側面を示唆したもので、神経科学の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は平成15年2月10日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。