

氏名(本籍)	はま だ かよこ 濱 田 香世子 (茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1,919号
学位授与年月日	平成10年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	腔腸動物生理活性ペプチドとの免疫化学的相同性を利用した未知の哺乳類神経ペプチドの探索
主査	筑波大学教授 薬学博士 後藤 勝年
副査	筑波大学教授 医学博士 工藤 典雄
副査	筑波大学教授 医学博士 渡邊 照男
副査	筑波大学教授 医学博士 庄司 進一

論文の内容の要旨

(目的)

神経系は、多数の神経細胞がシナプスと呼ばれる機能的結合によって電気活動を伝達（神経伝達：neurotransmission）あるいは調節（神経調節：neuromodulation）することにより、その複雑で高次な機能を発揮する。シナプスにおいて、これらの機能を担っている生理活性物質の一群は「シナプスにおける化学メッセンジャー（chemical messenger）」と総称される。シナプスにおける化学メッセンジャーは大きく次の3つのグループに分けることができる。1) アセチルコリン、カテコールアミンなどの古典的神経伝達物質、2) アミノ酸系伝達物質、3) 神経ペプチドである。神経ペプチドは神経系で産生され、比較的少数のアミノ酸（50残基以下）から構成される生理活性分子の総称である。現在までに、約50種の神経ペプチドが哺乳類の神経系で同定されており、脳内で様々な役割を果たしていると考えられている。しかし、近年哺乳動物における神経ペプチドの単離速度は鈍化している。未知の哺乳類神経ペプチドの探索には新しい戦略が必要であると考えられる。

最近、Takahashiら（1997）のグループは腔腸動物であるヒドラにおいて系統的ペプチド単離法を開発した。遺伝子発現変化という大まかな生理活性を指標として、多数のペプチドを一度の精製過程で単離・構造決定し、化学合成ペプチドを用いてペプチド特異的な生理活性を調べることが可能となった。現在までにこの方法を用いて286種類のペプチドがヒドラから単離され、その内の95種類についてアミノ酸配列が決定されている。このうち3種類の新規ペプチドファミリーについて生理活性が調べられ、ファミリーに共通のアミノ酸配列領域に対する特異抗血清が作成されている。

本研究では、このうち2種類のヒドラ生理活性ペプチドファミリーに対する抗血清を用いてラット中枢神経系における相同分子を免疫組織化学的に探索し、次に免疫組織化学法から存在が示唆されたラット中枢神経系に存在する相同ペプチドを単離することを目的とした。

(方法と結果)

凍結ミクロトーム上で脳を急速に凍らせ、50 μ m厚の前額断連続切片を作成し、ペプチドのC末端部-Gly-Leu-Trp amide (GLW amide) を特異的に認識するウサギ抗血清を用いた免疫組織化学的検索に供した。その結果、1種類の抗血清により認識される抗原決定基がラット中枢神経系に存在していた。この抗血清により認識される分子は、1) 細い神経線維とそのシナプス前終末である瘤状構造に強く発現がみられ、2) 軸索流の

阻害剤であるコルヒチンにより神経細胞体に集積することなど、神経ペプチドに共通した形態学的特徴を持つことがわかった。このことは、ヒドラ生理活性ペプチドの相同ペプチドがラット脳内に存在することを強く示唆する。中枢神経内でこの抗血清により免疫陽性構造として観察される免疫陽性線維は、前頭前野、中隔野、手綱核、脚間核、三叉神経脊髄路、三叉神経脊髄路核、脊髄後角などに高密度に認められた。また、背外側被蓋核、後根神経節などに免疫陽性細胞体が認められた。

500匹分のラット脳を熱酢酸法で処理し、得られた抽出物を逆相カートリッジにかけ粗ペプチド分画を単離した。この粗ペプチド分画に含まれる免疫活性物質を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて調べたところ、この免疫活性物質は分子量 5 kDa の限外濾過膜を通過し、プロテアーゼ処理にて失活した。この結果から、この粗ペプチド分画に存在する免疫活性物質は生化学的にもペプチドであることが推測された。次に ELISA による免疫活性を指標として、8段階の逆相、陽イオン交換、陰イオン交換クロマトグラフィーにより 220 m の紫外部吸収が単一ピークを示すまで精製を行った。免疫活性のもっとも強い単一ペプチド分画をアミノ酸配列分析し、予想されるペプチドを化学合成し、天然物とクロマトグラフィー上での挙動を比較し、一次構造を決定した。その結果単離してきたペプチドはヘモグロビン β -鎖のN末端部分と一致するものであった。

(考察)

本研究により、GLW amide 様免疫陽性の細胞体や神経線維が、中枢神経の様々な部位に観察されたが、GLW amide 様免疫陽性線維の局在から次のようないくつかの役割が予想される。1) 脊髄、三叉神経脊髄路核における分布パターンから侵害刺激、特に痛覚系との関係が考えられる。2) 前辺縁皮質、中隔野、手綱などの自己刺激効果を持つ領域に高密度の陽性線維がみられるので報酬系の回路への関与が予想される。3) 中隔、前頭前野、扁桃核、海馬などの陽性線維は攻撃反応、防御反応など情動系に関与しているかもしれない。

ラットの脳から単離・精製したペプチドのC末端は確かに-Gly-Leu-Trp amide であったが、ペプチド全体のアミノ酸配列はラットのヘモグロビンの β 鎖のN末端部(1~15番目)の配列と100%の相同性を示した。ヘモグロビンの断片が生理活性を有するペプチドであるという報告はこれまで数多くなされておられ、本ペプチドはC末端基がアミド化されているという事実を考慮すると、神経ペプチドである可能性は大きいと考えられる。

審査の結果の要旨

本研究は、ヒドラから見出された新しいペプチドのC末端部のアミノ酸3残基-Gly-Leu-Trp amide (GLW amide) を認識する抗体を用いて、ラット中枢神経系に於ける免疫陽性神経の存在を確認し、その分布を観察した後、その抗体に反応するペプチドの単離・精製を試みるという、全く新しいストラテジーに基づいた新規神経ペプチド探索の意欲的な研究である。単離したアミノ酸15個より成るペプチドはヘモグロビン β 鎖のN末端部分と100%相同するものであったが、C末端基がアミド化されていることから、新規神経ペプチドであることが期待される。免疫組織化学的に検出された物質はC末端がGLW amideであるということだけは確かであるが、このペプチドと一致するものとは限らない。このペプチドを含有する神経の投射経路の同定や機能の検出など、追求すべきことは多いが、博士論文の研究としては十分評価されるものである。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。