

氏 名 (本 籍)	藤 谷 昌 司 (大阪府)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 (論) 第 3 3 1 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 7 年 9 月 1 4 日
学 位 論 文 題 目	Binding of soluble myelin-associated glycoprotein to specific gangliosides induces the association of p75 ^{NTR} to lipid rafts and signal transduction (ミエリン随伴性糖蛋白の特異的なガングリオシドへの結合により、p75 ^{NTR} がリピッドラフトへ集積し、シグナル伝達を開始される)
審 査 委 員	主 査 教 授 木 村 宏 副 査 教 授 新 井 良 八 副 査 教 授 岡 田 裕 作

論文内容要旨

*整理番号	335	(ふりがな) 氏 名	ふじたに まさし 藤谷 昌司
学位論文題目	<p>Binding of soluble myelin-associated glycoprotein to specific gangliosides induces the association of p75 NTR to lipid rafts and signal transduction (ミエリン随伴性糖蛋白の特異的なガングリオシドへの結合により、p75NTR が脂質ラフトへ集積し、シグナル伝達が開始される。)</p>		
<p>(研究の目的) 中枢神経の軸索が損傷を受けると再生しにくいことが知られていたが、これは現在では、中枢神経の再生を阻害する環境が原因とする説が有力である。破壊された稀突起膠細胞に発現している、髄鞘由来の再生阻害因子として現在3つの蛋白 (Nogo, MAG(Myelin-Associated Glycoprotein), OMgp(Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein)) が同定されている。その蛋白の受容体や、そのシグナル伝達機構の解明は、中枢神経の軸索再生を考える上で重要である。今回私は、MAG の受容体の同定とそのシグナル伝達における機構を解明することを目的として以下に示す研究を行った。</p> <p>(方法) 生後7日齢の野生型及び、ガングリオシドの生合成酵素 (GalNacT 及び GD3S) のノックアウトマウスより小脳顆粒細胞を単離し、MAG, Nogo の存在下に24時間培養した。その後、免疫染色を行い、神経細胞体と軸索を可視化し、軸索の長さを測定した。また、Nogo 受容体は PI-PLC(phosphatidyl inositol -specific phospholipase C)を用いて細胞表面から除去し、同様の実験を行い、軸索の長さを評価した。</p> <p>次に、同様の細胞を用いて、p75NTR の下流のシグナルの RhoA の活性を affinity precipitation 法にて評価した。また抗ガングリオシド抗体により、細胞表面のガングリオシドを架橋することで、MAG の作用と同様の効果が見られるかを検討した。</p> <p>そして、神経細胞における脂質ラフトを methyl-beta-cyclodextrin(MβCD)により破壊し、ミエリン由来軸索伸展阻害因子による成長円錐の虚脱の程度を、後根神経節細胞を用いて検討した。</p> <p>最後に、脂質ラフトにおけるシグナル伝達の開始機構を検討するために、異なる界面活性剤(Brij-58, Triton-X100)を用い、ショ糖密度勾配遠心法により小脳顆粒細胞の脂質ラフト分画を採取し、p75NTR 及びガングリオシドのラフト分画における発現を検討した。また、MAG, Nogo, 抗ガングリオシド抗体による細胞の刺激時における、p75NTR のラフト分画への集積を検討した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

(結果) 野生型及び **GD3S** のノックアウトマウスより得られた小脳顆粒細胞に対しては **MAG** も **Nogo** 同様に軸索伸展阻害作用を認めた。しかし、**GalNacT** のノックアウトマウスより得られた小脳顆粒細胞に対しては、**Nogo** は軸索伸展阻害作用を示したのに対し、**MAG** の効果は消失した。また、**PI-PLC** 処理により **Nogo** 受容体が除去された小脳顆粒細胞に対しては **MAG** も **Nogo** も同様に作用が消失した。軸索伸展アッセイの結果と同様に、**p75NTR** の下流の **RhoA** の活性化も同様の結果を示した。**GalNacT** のノックアウトマウスを用いた場合、**Nogo** による活性化は認められたが、**MAG** による効果は消失した。

次に、成長円錐虚脱アッセイの結果からは、**MβCD** により脂質ラフトが破壊されると、虚脱効果が消失した。

シヨ糖密度勾配遠心法により、**p75NTR** の大部分はラフト分画以外に存在した。また、**ガングリオシド** はラフト分画に多く集積していた。更に、**MAG**、**Nogo**、抗**ガングリオシド**抗体により、**Brij-58** に特異的なラフトに **p75NTR** が集積することが分かった。

(考察) 軸索伸展アッセイ及び **affinity precipitation** アッセイの結果からは**ガングリオシド**及び **Nogo** 受容体が **MAG** のシグナル伝達に重要と考えられた。**p75NTR** に **MAG** は結合しないこと、及び、**ガングリオシド**も **Nogo** 受容体も単独では細胞内へのシグナル伝達手段を持たないことが分かっている。従って、**MAG** は**ガングリオシド**及び **Nogo** 受容体の両方で細胞表面と結合し、細胞内へのシグナル伝達は **p75NTR** により行われ、これらの三者は神経細胞上で共受容体を形成していると考えられた。

また、**MβCD** 処理により脂質ラフトが破壊されると、虚脱効果が消失したことにより、その重要性が確認された。シグナル伝達機構としては、**ガングリオシド**を架橋形成することで **MAG** と同様の結果を得たことから、**ガングリオシド**のクラスター形成により **p75NTR** が脂質ラフトへ集積され、シグナル伝達を開始されることが考えられた。

(結論) **MAG** の細胞表面における機能的受容体は**ガングリオシド**及び **Nogo** 受容体の両方である。脂質ラフトは軸索伸展阻害因子のシグナル伝達に重要で、軸索伸展阻害因子により **p75NTR** が脂質ラフトに集積することによりシグナル伝達を開始される。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	335	氏名	藤谷昌司
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>中枢神経の軸索は損傷修復(再生)が困難であるが、2000年から2002年にかけて、神経突起再生阻害因子としてオリゴデンドロサイトが発現する3種のタンパク(Nogo, OMgp, MAG)が単離された。これら3種はいずれも細胞内ドメインをもたないNgRという神経細胞上の受容体に結合し、シグナル伝達を担う受容体p75と受容体複合を形成する機序が解明されつつある。本論文は、MAG(ミエリン関連糖タンパク)について、その結合分子の同定とシグナル伝達機構の解明を目的としたものである。ガングリオシド合成酵素ノックアウトマウス小脳神経細胞を用いた軸索進展阻害作用の観察、成長円錐虚脱アッセイ、およびショ糖密度勾配遠心法などの解析から、次の結論を得ている。</p> <p>MAGは神経細胞表面にあるNgRおよびガングリオシドの両者と結合し、その結果p75が脂質ラフトに集積することにより、軸索進展阻害シグナル伝達を開始される。</p> <p>本研究の成果は、脊髄損傷の治療法開発にとって重要であり、博士(医学)の授与に値するものと判定された。</p>			
(平成17年8月31日)			