

氏 名	阪上 由子
学 位 の 種 類	博 士 （医 学）
学 位 記 番 号	博 士 乙 第 3 9 6 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25年 9月11日
学 位 論 文 題 目	Immunohistochemical localization of two types of choline acetyltransferase in neurons and sensory cells of the octopus arm (タコの感覚細胞と脳細胞における2種類のアセチルコリン合成酵素の免疫組織学的局在性)
審 査 委 員	主査 教授 宇田川 潤 副査 教授 平田 多佳子 副査 教授 工藤 基

論文内容要旨

※整理番号	400	(ふりがな) 氏 名	さかうえ ゆうこ 阪上 由子
学位論文題目	Immunohistochemical localization of two types of choline acetyltransferase in neurons and sensory cells of the octopus arm 【タコの神経細胞と脳細胞における 2 種類のアセチルコリン合成酵素の免疫組織学的局在性】		
背景) タコの脚には神経全体の 2/3 が集中し、運動や感覚の情報を独自に処理する特異的な機能をもつことが知られている。タコの脚には中央部に位置する axial nerve cord (ANC) と筋層内に分布する 4 つの神経索 (nerve cord)、および吸盤の神経節など、複数の神経中枢が存在する。タコの脚におけるコリン神経系の免疫組織学的同定は最も信頼性の高いマーカーとされるアセチルコリン合成酵素コリンアセチル基転位酵素 (ChAT) に対する既存の抗体がタコの ChAT と交差反応しないため、困難で、正確な分布は長らく不明であった。 近年我々の研究室では、従来型 ChAT (cChAT) とは異なり末梢コリン神経に優位に発現する新規 ChAT・mRNA (pChAT) の単離ならびに、pChAT を交差認識しない cChAT 特異抗体の作成に成功した。また、この cChAT 特異抗体がタコの cChAT と交差反応し、タコの脳 (視葉) におけるコリン作動性神経を初めて視覚化することに成功した。 目的) 今回我々は、この cChAT 特異抗体ならびに pChAT 特異抗体を用い、タコの脚内の神経系におけるコリン作動性神経系の免疫組織学的局在性を明らかにする。 方法) 麻酔下のマダコより脚を分離し、4%パラホルムアルデヒド・ピクリン酸混入液に浸漬固定した。クリオスタットにて 20 μm 厚の矢状断・水平断・冠状断の切片を作成。アビジン-ビオチンペルオキシダーゼ法にて pChAT、cChAT に対する免疫活性をもつ神経構造を可視化した。上記手法以外に、pChAT 抗体による免疫染色には前処置としてパパイン酵素による抗原賦活化法を行った。ANC および吸盤から抽出したタンパク質を Laemmli 法にて、SDS-PAGE 上で電気泳動した。PVDF 膜にタンパク質転移後、ペルオキシダーゼで標識された一次抗体を用いて、pChAT ならびに cChAT のイムノブロッティングを行った。 結果) 上記手法によるウエスタンブロットの結果、単一のバンドを認めた。これは pChAT 抗体がタコの pChAT に相当するタンパクと交差反応していることを示唆する。cChAT 特異抗体ならびに pChAT 特異抗体を用いた免疫染色では神経構造物のみが染色された。cChAT 陽性のバリコシテイをもつ神経線維は、cerebrobrachial tract (CBT) 内および ANC の神経網に認められたのに対し、pChAT 陽性のバリコシテイをもつ神経線維は ANC の神経網内にのみ認められた。抗原賦活化後の免疫染色の結果は cChAT において変化はなかったが、pChAT においては陽性繊維の数や染色強度の増加等の変化を認めた。抗原賦活化後、pChAT 陽性の神経細胞や神経線維をすべての神経節内に認め、またこれらの神経節間を連絡する繊維や、吸盤の感覚細胞ならびに表皮・筋肉内にバリコシテイを持たない繊維を認めた。			

考察) この研究結果は初めて無脊椎動物においても哺乳類の pChAT に相当するタンパクが存在する事を証明した。また、2 種類の ChAT の分布は明確に異なり、cChAT 陽性繊維は脳から脚に向かう神経が走行する CBT 内に分布し、cChAT 陽性の神経細胞は脚に認められなかった。一方、pChAT 陽性の神経線維と神経細胞は脚の神経中枢すべてに分布していたが、CBT 内にはほとんど分布していなかった。これらの結果から、ChAT 陽性繊維は脳由来であり、pChAT による神経支配は本質的に脚独自のものであると推測される。タコの pChAT が Ach の生合成能を持つか否かは、今後の研究課題であるが、ANC や筋肉内の繊維の形態観察からはコリン作動性神経系が軟体動物の運動系の調整に関与している可能性が示唆される。また、pChAT 陽性の細胞や繊維が筋肉の機械的受容器を保有する神経索に分布していること、吸盤表皮の pChAT 陽性細胞の形態が感覚細胞と合致することより、感覚系の情報伝達にも関与している可能性が示唆される。

結論) 実験結果より pChAT ならびに cChAT がタコの脚におけるコリン神経系のマーカーの候補であること、タコの脚内に分布様式の異なる 2 つのコリン神経が存在することが明らかとなった。この事実はタコの脚が 2 つの独立したコリン神経系の神経支配を受けていることを示唆するものである。タコの脚におけるコリン作動性神経系の詳細を明らかにした今回の研究成果は、タコの運動・感覚系の情報処理機構の解明に寄与すると期待される。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	400	氏名	阪上由子
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。) コリン神経支配はタコの脚の運動・感覚系の制御に関連しているが、コリン作動性神経の分布様式は不明であった。そこで本研究では末梢型コリンアセチルトランスフェラーゼ (pChAT) 特異抗体および従来型アセチルトランスフェラーゼ (cChAT) 特異抗体による免疫組織染色を行い、タコ脚内のコリン作動性神経系の分布様式を検討した。 その結果、 1) タコの脚内には cChAT 陽性のバリコシティを有する線維を認めたが、cChAT 陽性神経細胞は認められなかった。cChAT 陽性線維は cerebrobrachial tract (CBT) および axial nerve cord (ANC) の神経網に認められた。 2) pChAT 陽性のバリコシティを有する神経線維は CBT、ANC 神経網、神経節や神経節間の連絡線維に認められた。また、吸盤の感覚細胞並びに表皮・筋肉内にはバリコシティを持たない pChAT 陽性線維を認めた。一方、pChAT 陽性神経細胞は脚内の神経節内に認められた。 これらの結果から cChAT 陽性線維は脳由来であり、pChAT 陽性線維は脚独自のものと推測された。また、pChAT 陽性線維と運動・感覚系制御との関連が示唆された。 本論文は、タコ脚内のコリン神経系支配様式について形態学的に新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。 (総字数 592 字) (平成 25 年 9 月 2 日)			