

氏名(本籍)	神前 英明 (和歌山県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第 524号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成18年3月24日
学位論文題目	Presence of monoamine oxidase type B protein but absence of associated enzyme activity in neurons within the inferior olive nucleus of the rat (ラット下オリーブ核の神経細胞において、モノアミン分解酵素タイプBの蛋白は存在するが活性は認めない)
審査委員	主査 教授 工藤 基 副査 教授 木村 宏 副査 教授 陣内 皓之祐

論文内容要旨

※整理番号	589	(ふりがな) 氏名	こうざき ひであき 神前 英明
学位論文題目	Presence of monoamine oxidase type B protein but absence of associated enzyme activity in neurons within the inferior olive nucleus of the rat. (ラット下オリーブ核の神経細胞において、モノアミン分解酵素タイプ B の蛋白は存在するが活性は認めない)		
<p><目的></p> <p>モノアミン分解酵素は 2 種類存在し、タイプ A (MAOA: monoamine oxidase type A) とタイプ B (MAOB: monoamine oxidase type B) にわかれる。MAOA はセロトニン、ノルアドレナリンに高い親和性をもつ、一方、MAOB は β-phenylethylamine に高い親和性をもつ。dopamine と tyramine が MAOA、MAOB 両方の基質となる。MAOA、MAOB ともに中枢神経ではモノアミンを失活させる作用を持つ。</p> <p>一般的に、細胞が酵素の mRNA を発現したとき、細胞は蛋白を産生し、それに関連した酵素活性を示すはずである。MAOA と MAOB の mRNA 発現は下オリーブ核 (IO: inferior olive nucleus) においては in situ hybridization にて過去に報告されている。</p> <p>IO は脳幹や脊椎の多くの異なった起源から接続する求心線維を受け取る。IO からの遠心線維には小脳にいく唯一の線維である登上線維がある。3 つのパートに分かれており (IOP: inferior principal nucleus, IOD: dorsal nucleus, IOM: medial nucleus)、それぞれの MAOB の蛋白、活性は、まだ証明されていない。本研究の目的は IO の神経細胞に MAOB の蛋白が発現していること、さらに、MAOB の分解酵素として活性の有無を調べることです。対照として、既に MAOB の mRNA、蛋白の存在および活性が確認されている DR (dorsal raphe nucleus) を比較のため使用した。</p> <p><方法></p> <p>動物種として雄 Sprague-Dawley rats (200~250g) を使用した。</p> <p>抗体は抗 MAOB 抗体を使用した。</p> <p>① ラットを還流固定後、脳を摘出し、IO、DR に対し、抗 MAOB 抗体を用い ABC 法にて免疫染色を行い発色、顕鏡した。さらに、抗体による染色後、オスミウムにて脱水し、薄切切片を作成し顕鏡した。</p> <p>② 酵素組織化学法にて IO と DR の MAO 活性を調べた。MAO 活性の染色には tyramine を基質として用いた。さらに、24、48、72 時間、反応させた後、オスミウムにて脱水し、薄切切片を作成し顕鏡した。</p> <p>③ IO、DR を抗 MAO 抗体による免疫組織化学染色、MAO 酵素組織染色の後 (24 時間反応)、</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。

それぞれを電子顕微鏡にて観察した。

④ IO、DR を MAO 酵素組織染色と MAOB 蛍光免疫組織染色の 2 重染色を行い、顕鏡した。

<結果>

抗 MAOB 抗体の免疫組織化学染色では、IO の神経細胞体と周囲の点状構造物に陽性反応が見られた。電子顕微鏡では、染色産物は神経細胞体と神経突起のミトコンドリア周囲に認められた。逆に、MAO 酵素組織化学染色では神経細胞体には陽性反応が見られなかったが、周囲の点状構造物には陽性反応が見られた。電子顕微鏡では、染色産物は神経細胞体には見られなかったが神経突起のミトコンドリア周囲に認められた。2 重染色でも、IO の MAOB 陽性の神経細胞体がみられたが、MAO 酵素組織化学反応はみられなかった。

対照比較した DR では、MAOB の免疫組織化学において神経細胞体と周囲の点状構造物に陽性反応が見られた。MAO 酵素組織化学でも、神経細胞体と周囲の点状構造物に陽性反応が見られた。それぞれ電子顕微鏡で観察しても、染色産物は神経細胞体と神経突起のミトコンドリア周囲に認められた。また 2 重染色でも DR の MAOB 染色、MAO 酵素組織化学反応、両方とも陽性の神経細胞体が見られた。

MAO 酵素組織化学の染色反応時間を最大 72 時間まで延長しても、DR の神経細胞体では染色強度は増すが、IO では反応の発現はなかった。

<考察>

今回の実験では、IO の神経細胞体は MAOB 免疫組織化学では陽性であるが、MAO 酵素組織化学では反応は認めないことが判った。また、IO の神経突起においては MAOB 免疫組織化学、MAO 酵素組織化学、両者とも陽性反応がみられた。

これらの結果を論じる前に、方法論が厳格で再現性あるものであるのか検討する必要がある。MAOB 蛋白の局在を調べるために、抗 MAOB 抗体を使用し免疫組織化学染色を行った。DR において、MAOB 陽性神経細胞体の局在は、抗 MAOB 抗体を用いた論文で報告済みである。よって、この免疫組織化学法は信頼できる技術で、IO における反応結果も信頼しうる。また、MAO 酵素活性を調べるために、基質を tyramine とした酵素組織化学を用いた。DR において、MAO 酵素組織化学における反応の局在は報告されており、この方法も信頼しうる技術である。IO の MAO 酵素反応の限界閾値が低いために、神経細胞体において MAO 活性の発現が生じなかった可能性があるため、反応時間を最大 72 時間まで延ばした。DR においては、神経細胞体内での反応強度が増したが、IO では依然、MAO 酵素組織反応は見られなかった。今回、酵素組織化学において、基質として tyramine を使用した。これは、MAOA、MAOB 両方に高い親和性を持ち、それ故、IO の神経細胞体は MAOA、MAOB 両方の酵素活性とも持っていないと結論づけることができる。

<結論>

IO の神経細胞体に MAOB 蛋白は存在するが、活性は持っていないこと、対照的に IO の神経突起では MAOB 蛋白、活性ともに認められることが示された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	529	氏名	神前 英明
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>下オリーブ核は前庭神経核の信号を小脳へ送る中継路である。一部のめまい疾患で鬱症状の出現が報告され、モノアミンとの関連が示唆されている。下オリーブ核で、モノアミン、および酸化酵素 (MAO) の関係を調べることは、めまい疾患の病態解明に役立つと考えられる。MAO は 2 種類存在し中枢神経ではモノアミンを失活させる作用を持つ。細胞レベルで見ると mRNA、蛋白、活性が一様に認められない部位が存在する。本研究では、下オリーブ核の神経細胞の MAOB の存在と活性の有無を検討した。手法として免疫組織化学染色法、酵素組織化学染色法、免疫電子顕微鏡法を用いた。下オリーブ核の神経細胞体に MAOB 蛋白は存在するが、活性は持っていない。神経突起では MAOB 蛋白は存在し、活性をもつことが証明された。</p> <p>本研究は、下オリーブ核の神経細胞内での MAOB 活性の特異性を示すもので、興味深い現象である。よって、博士 (医学) 授与に値するものと認められる。</p>			
(平成18年 2月 1日)			