

Studies on Neurite Outgrowth Factor that Acts on Parasympathetic Neurons

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7707

副交感神経節ニューロンに働く神経突起伸展因子に関する研究

—砂のう筋抽出液よりの部分精製と諸性質、およびその抗血清作製について—

金沢大学がん研究所薬理部 (主任：三木直正教授)

林 要 喜 知

(昭和59年1月26日受付)

ニワトリ砂のう抽出液には、ニワトリ胚毛様体神経節 (ciliary ganglion, 以下 CG と略) 細胞に働き、神経突起伸展を促進させる高分子物質が含まれている。この促進因子 (神経突起伸展因子, neurite outgrowth factor, 以下 NOF と略) を砂のう抽出液より、硫酸塩析 (0-35%), 温度処理 (56°C, 30 分間), DEAE cellulose, DEAE Sepharose CL-6B および Sepharose CL-6B などにより、約 2000 倍部分精製した。回収率は 3% で、148 ng protein/ml で CG ニューロンの最大突起伸展をひきおこした。砂のう NOF は、680 Kダルトン以上の分子量を持つ酸性糖蛋白質あるいはプロテオグリカンと推定された。砂のう NOF に対する CG ニューロンの応答性は、胚の日齢に厳密に依存した。10 日齢以前の胚から得た CG ニューロンは、NOF によく応答し、最大突起伸展反応を示した。11 日齢以降のニワトリ胚では、CG ニューロンの応答性は急激に低下し、14 日齢胚では、ほとんど認められなかった。次に、DEAE cellulose イオン交換クロマトグラフィーにより得られた NOF 標品に対する抗血清を作製した。この抗血清は、NOF による CG ニューロンの突起伸展反応を用量依存的に抑制したが、ニューロンの生存率には無影響であり、また、ニューロンに不可逆的損傷を与えなかった。種々の動物組織由来の NOF 作用に及ぼす抗血清の阻害効果を調べたところ、ニワトリ各組織由来の NOF に対して強い抑制作用を示したが、げっ歯類の NOF に対する抗血清阻害は、100-1000 倍程低かった。NOF は、交感・知覚両神経節細胞のみならず、網膜や脊髄由来の神経細胞にも働き、突起伸展をひきおこした。これらの神経細胞による突起伸展は、すべて NOF の抗血清により阻害された。以上、NOF は、中枢および末梢神経の発生・分化、さらには、神経の再生過程において、ニューロンの神経突起伸展に不可欠な栄養因子と考えられる。また、NOF 分子の抗原性には、すくなくともニワトリとげっ歯類との間で種差が存在することが示唆された。

Key words ciliary ganglion neurons, neurite outgrowth factor, gizzard extract.

脊椎動物の発生において、細胞の外側に存在する細胞間隙基質 (extracellular substrate, 以下 ES と略) は、隣接する細胞の分化・成長に重要な役割を演じていることが知られている¹⁾²⁾。神経系の ES の中には、神経細胞や非神経細胞で生産されるいくつかの神経栄養因子が含まれており、神経細胞は、これらの因子の作用を受けながら、標的組織と正確にシナプスを形成するものと考えられている³⁾⁴⁾。しかしながら、これら栄養因子の実体については、未だに不明な点が多い。

現在、化学構造が明らかにされている唯一の栄養因子として、交感神経や知覚神経節細胞に働く神経成長因子 (nerve growth factor, 以下 NGF と略) がある⁵⁾⁶⁾。NGF は、これらの神経節細胞に作用して、神経突起の伸展、生存維持効果、ドーパミン β -水酸化酵素の誘導、さらには、細胞体積の増加などの促進効果を示すが、副交感神経や運動神経、あるいは多くの中枢神経系の細胞には、作用を示さない。

即ち、後者に属する神経系の発生過程には、NGF と

Studies on Neurite Outgrowth Factor that Acts on Parasympathetic Neurons: Partial Purification from Gizzard Extract, its Properties and Preparation of Antiserum. **Yokichi Hayashi**, Department of Pharmacology, (Director: Prof. N. Miki) Cancer Research Institute, Kanazawa University.

は異なる栄養因子の関与が示唆されている⁷⁾。

一方、副交感神経節細胞に作用する栄養因子の存在は、最初に、培養心筋細胞により生産されることが報告された⁸⁾⁹⁾。その後、同様な活性因子が種々の組織で報告され、また、中枢や末梢神経系に作用する新たな栄養因子の存在も報告されている¹⁰⁾。

そこで、著者らは、副交感神経節細胞に作用する栄養因子を詳細に調べる目的で、まず、神経突起伸展に促進効果を持つ栄養因子(神経突起伸展因子, neurite outgrowth factor, 以下 NOF と略)に注目した。ニワトリ胚毛様体神経節細胞を培養し、in vitro の神経突起伸展反応を指標に NOF の組織分布を調べたところ、砂のう平滑筋組織に多量の NOF が存在することを見出した¹¹⁾¹²⁾。

本研究では、砂のう組織からの NOF の部分精製、および、部分精製した NOF に対する抗血清を用いて、NOF の諸性質、さらには、培養ニューロンの神経突起伸展反応に及ぼす効果を検討したので報告する。

材料および方法

1. 試薬類

トリプシン、 β -galactosidase, neuramidase および hyaluronidase (以上 4 種, Sigma chemical Co.) ; heparinase (生化学工業) ; dithiothreitol (以下 DTT と略) (半井化学) ; ラウリル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, 以下 SDS と略) (和光純薬) ; フロイント完全アジュバント (DIFCO Lab.) ; penicillin-streptomycin 混合液, ウシ胎児血清, Dulbecco's Modified Eagle Medium (以下 DMEM と略) (以上 3 種, GIBCO Lab.) ; DEAE Sepharose CL-6B, Sepharose-CL-6B, Concanavalin A Sepharose (以上 3 種, Pharmacia Fine Chemicals)。これらの試薬類はそれぞれ括弧内に記入した市販品を用いた。

2. ニューロンの調整

ニワトリ胚 (6~14 日齢) あるいはマウス新生児より毛様体神経節 (ciliary ganglion, 以下 CG と略), 交感神経節 (sympathetic ganglion, 以下 SG と略), 知覚神経節 (dorsal root ganglion, 以下 DRG と略), 脊髄 (spinal cord, 以下 SC と略) あるいは網膜 (retina, 以下 RE と略) をとり出し、リン酸緩衝化生理食塩水 (phosphate buffered saline without Ca^{2+} and Mg^{2+} , 以下 PBS(-) と略) に加えた。各神経節や神経組織片にトリプシン処理 (0.05%, 37°C, 20 分間) し、培養液で洗った。その後、新たな培養液中に神経節や組織片を移し、ピペット操作にて細胞を分散させ、ニューロンの懸濁液 (約 7000 ニューロン/ml) を得た。

神経組織小片の調整は、加藤らの方法に従った¹³⁾。即ち、RE, SC あるいは DRG を切り出し、培養液中で眼科用剪刀を用いて組織小片 (約 1 mm² 以下) にきざんだ。その後、パスツールピペットですいあげ、培養皿に移した。

3. ニューロンの培養

ニューロンの培養には、ほう酸緩衝液 (150 mM, pH8.4) に溶かしたポリオルニチン (0.1 mg/ml, M. W. 10⁴ daltons) で 24 時間以上塗布した培養皿 (ポリオルニチン塗布皿, polyornithine-coated culture well, 以下 POR-well と略) を用いた。培養液は、DMEM に 10% ウシ胎児血清, 100 U/ml ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンからなる溶液を用い、10% CO₂ を含む空气中、37°C で培養した。

4. ニューロンの生存活性と神経突起伸展活性の測定

CG ニューロンの懸濁液 (300 μl) と同量の種々の組織抽出液 (PBS(-) で透析したもの) あるいは種々の組織細胞の conditioned medium を POR-well (ϕ 16 mm) に同時添加して、培養を開始した。ニューロンの生存活性は、培養開始直後のニューロン数に対する生存ニューロン数の割合を、各培養時間ごとに算出して求めた。神経突起伸展活性は、通常、培養 16 時間目に、生存ニューロン数に対する神経突起伸展ニューロン数の割合で算出して求めた。ニューロンの観察は、培養開始後、位相差顕微鏡 (200 倍) を用いて経時的に行った。

5. 砂のう NOF の定量

POR-well (ϕ 6 mm) に、各精製段階の NOF 標品を PBS(-) で連続的に希釈して、40 μl ずつ加えてプレコートした。24 時間 (37°C) 後、各 well の上清を除去し、80 μl の蒸留水で 2 度水洗し、PBS(-) を 36 μl 加えた。次に、CG ニューロン (8 日齢胚) の懸濁液 (40 μl) と、眼球抽出液 (4 μl) とを加えて、培養を開始した。培養 16 時間および 24 時間目に、それぞれ神経突起伸展活性および生存活性を算出した。その後、プレコートした NOF 標品の蛋白質量を横軸に、それぞれの突起伸展活性を縦軸にプロットした。

このグラフより、最大突起伸展活性 (約 90% のニューロンが神経突起を伸展させている状態) の半値の反応を与えるタンパク質量を求め、その逆数を用いて NOF 活性の比活性を表示した。蛋白質定量は Lowry らの方法に従い¹⁴⁾、また、NOF 標品を用いた SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (以下 SDS-PAGE と略) は、Laemmli の方法に従った¹⁵⁾。電気泳動後のタンパク質染色は、Coomassie Brilliant Blue G250 を用いておこなった。

6. 組織抽出液の調整

成体ニワトリより心臓、肝臓、大脳あるいは砂のうをとり出し、脂肪組織や結合組織を除去した後、組織重量の5倍量のPBS(-)中でホモゲナイゼした。また、ニワトリ胚抽出液は、12日齢胚をPBS(-)中でホモゲナイゼすることで調整した。40000×g、1時間の遠心操作を施し、その上清を回収した。その後、滅菌フィルター(0.45 μ m, ミリポア社)により滅菌し、これを組織抽出液として用いた。生存因子を含む眼球抽出液は、Adlerらの方法に従い調整した¹⁶⁾。

7. Conditioned mediumの調整

ニワトリ胚(10-14日齢)およびマウスやラットの新生児よりとり出した心臓、骨格筋、大脳、砂のうあるいは紅彩をトリプシン処理(0.2%, 20分間, 37°C)し、培養液で洗った。その後、ピペット操作で単離細胞懸濁液を得、培養皿(直径35mm)に移し、培養を開始した。培養細胞で培養皿基壁面が完全に覆われた後、48時間毎に培養液を交換し、回収した培養液をconditioned medium(以下CMと略)として用いた。ニューロブラストーマやグリオーマなどのクローン細胞CM

の調整は、三木らの方法に従った¹¹⁾。

8. 抗血清の作製

砂のうNOFの部分精製標品(DEAE cellulose 分画)を蒸留水で透析した後、凍結乾燥をおこなった。この乾燥標品(2mg蛋白質)に、PBS(-)とフロイント完全アジュバントを1mlずつ加えて乳化し、免疫原とした。これをニュージーランド白ウサギの足蹠および背部皮下に分割注射した。その後、1週間毎に3回注射(乳化液, 1ml/回)し、最終注射後1週間目に採血した。血清の非動化(56°C, 30分間)後、ミリポアフィルターで滅菌し、使用時まで-80°Cで貯蔵した。

抗血清中のIgGは、Godingらの方法に従い分画した¹⁷⁾。また、Sephacrose CL-6BフラクションのNOF標品に対する抗血清作製には、凍結乾燥標品50 μ g蛋白質にPBS(-)とフロイント完全アジュバントを1mlずつ加えて乳化後、免疫原として用いた。

9. 抗血清によるNOF活性の阻害実験

CGニューロンの最大突起伸展活性(反応)をひきおこすのに充分な量の砂のうNOF標品(DEAE cellulose 分画, 60 μ g protein/ml)40 μ lを、あるいは各組

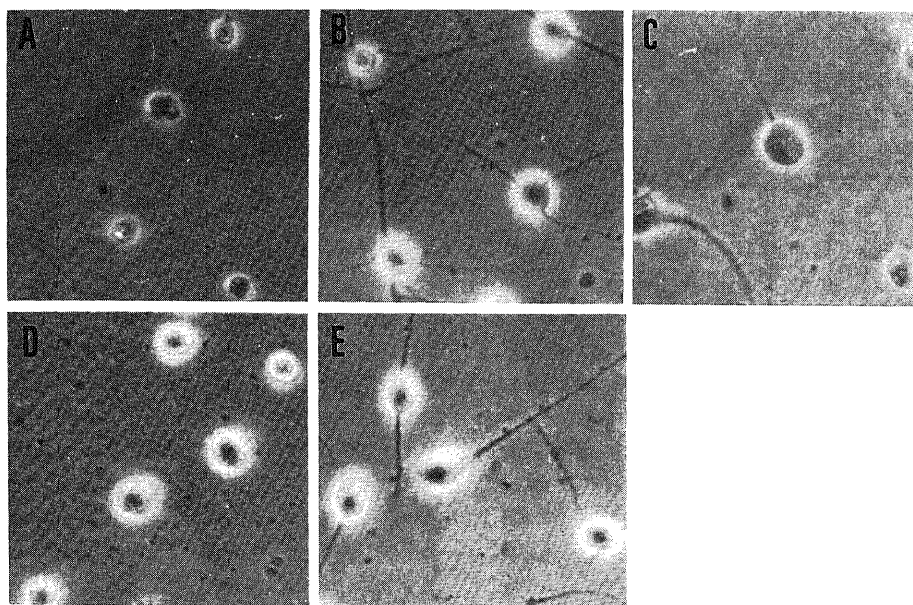


Fig. 1. Phase contrast microphotographs of ciliary ganglion (CG) neurons cultured for 24 hr in various conditions. Three hundred μ l of CG neurons suspended in the culture medium was dispensed into each culture well (ϕ 16 mm). Then, each well received the same volume of PBS(-) (A) or partially purified gizzard extracts at each purification step (B-E): (B), 0-35% ammonium sulfate fraction (100 μ g protein/ml); (C), eluent (40 μ g protein/ml) with 1.5 M NaCl from DEAE cellulose column chromatography presented in Fig. 3; (D), flow through fraction (53 μ g protein/ml) of DEAE cellulose column chromatography; (E), 1 to 1 mixture samples of 1.5 M NaCl eluent and flow through fraction. After a 24-hr incubation at 37°C in 10% CO₂ in air, CG neurons in each well were observed and photographed on phase contrast microscope.

織より得た CM 300 μ l をそれぞれ POR-well (ϕ 6 mm) に加えた。37°C で 12 時間静置した後、上清をとりのぞき、PBS(-) で連続的に稀釈した抗血清 200 μ l を加えた。12 時間以上反応させた後、抗血清をのぞき、PBS(-) で 2 回洗った。34 μ l の PBS(-)、ニューロンの懸濁液 40 μ l、および眼球抽出液 4 μ l を加えて、CG ニューロンの培養を開始した。培養 16 時間後に、ニューロンの突起伸張活性と生存活性を求めた。抗血清による突起伸張阻害効果は、最大突起伸張反応を 50% 阻害するのに必要な抗血清量で表示した。

成 績

1. 砂のう抽出液による CG ニューロンの神経突起伸張

ニワトリ胚 (8 日齢) より調整した CG ニューロンを培養液のみで培養すると、培養 24 時間でほとんどのニューロンが死滅した (図 1, A)。ニワトリ成体砂のう抽出液やニワトリ胚 (14 日齢) 砂のう CM の存在下で培養すると、ニューロンの生存は良好になり、しかも著明な神経突起の伸張が観察された (図 1, B)。砂のう抽出液による神経突起の伸張は、培養 24 時間でニューロン細胞体の数十倍から数百倍にも達し、ニューロン間に突起によるネットワークを形成した。最大効果の抽出液で、ほぼ 90% のニューロンに突起伸張が認められた。

次に、砂のう抽出液による突起伸張反応が、ニューロンの加齢により、どのように変化するかを調べたところ、9 日齢胚までの CG ニューロンはよく反応するが、10 日齢胚以後の CG ニューロンでは突起伸張能が急激に低下消失していった (図 2, A)。一方、砂のう抽出液中に含まれる、神経突起伸張に促進効果をもつ活性因子 (NOF) の組織含有量を加齢を追って調べた (図 2, B)。11 日齢胚までの砂のうではほとんど認められないが、12 日齢胚より急激に上昇し、16 日齢胚の砂のうで最大の活性を示した。以後、成体組織でも NOF の高い活性が認められた。

種々の組織抽出液や CM 中の NOF 活性を表 1 にまとめた。

2. 砂のう抽出液中の NOF と生存因子の分離

砂のう抽出液添加により認められる CG ニューロンの生存維持と神経突起伸張が同一因子による作用か否かを調べた。まず、砂のう抽出液に硫酸塩析 (0-35%) を施し、塩析沈澱物をトリス緩衝食塩水 (20 mM Tris-HCl pH7.4+140mM NaCl) で溶かし、同じ溶液で透析した。その後、DEAE cellulose カラムにのせ、ステップワイズ法にて分画した (図 3)。各三分画の NOF 活性を調べたところ、1.5 M 分画には弱い活性が認められたが、ニューロンは死滅して行った (図 1, C)。素通り分画 (0.14 M NaCl 分画) では、ニューロンの生存は良好だが、突起伸張は全く観察されな

Table 1. Effect of conditioned media and tissue extracts on neurite outgrowth of cultured ciliary ganglion (CG) neurons

Sources	Relative neurite outgrowth*
Conditioned Medium :	
Chick embryo heart	卄
Chick embryo skeletal muscle	++
Chick embryo iris muscle	++
Chick embryo gizzard	卄
Chick embryo brain	++
Chick embryo liver	—
Tissue extract :	
Chick embryo whole tissue	+
Chicken heart	— **
Chicken skeletal muscle	— **
Chicken gizzard	卄
Chicken brain	—
Chicken liver	— **

The experiment was repeated four times with the same results.

* : Activity for neurite outgrowth was assayed by determining a percentage of neurons with neurites to the total surviving neurons after 16 hr in the culture: —, 0%; +, 20%; ++, 40%; 卄, 60%; 卄, more than 80%.

** : Fine precipitates were formed and covered all the culture dish substratum.

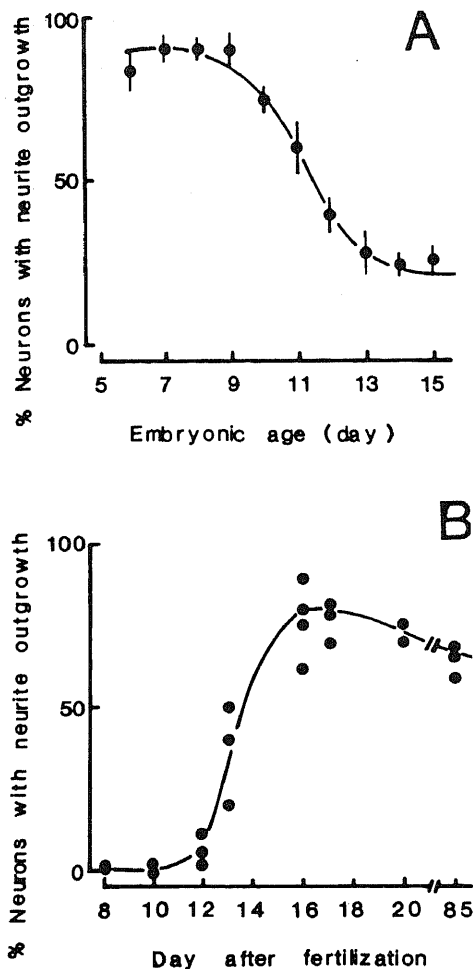


Fig. 2. Effects of embryonal ages on neurite outgrowth of CG neurons (A) and on the amounts of neurite outgrowth factor (NOF) in the gizzard extracts (B). (A) CG neurons were prepared from chick embryos from 6- to 15-day old. 300 μ l of CG neurons suspension from each age was added to each culture well (ϕ 16 mm) that previously received 300 μ l of gizzard tissue extract (2 mg protein/ml) suspended in PBS(-). (B) Several to 100 gizzards were collected from either chick embryos or chicken of each age, and homogenized with 5 volumes PBS(-). 300 μ l of gizzard extract (0.4 mg protein/ml) from each age and of CG neurons suspension from 8 day embryos were added to each culture well. In both experiments, CG neurons were cultured for 16 hr and then the ratio of the neurons with neurite outgrowth to the total surviving neurons was determined. Each point is the mean of duplicate numbers obtained from separate experiments. Variation from the mean was less than 6%.

かった (図 1, D). これら両分画を共存させると, ニューロンの良好な生存と著しい突起伸展が回復した (図 1, E). 近年, Adler らは, 眼球抽出液に多量の生存維持因子 (survival factor, 以下 SF と略) が存在することを報告している¹⁰⁾. そこで, この SF を 1.5 M 分画と共存させたところ, ニューロンの良好な生存と著明な突起伸展が認められた. 以上, 砂のう抽出液には, すくなくとも NOF と SF の 2 種の栄養因子が存在すると考えられた. 表 2 に, これら 2 種の因子と眼球抽出液中の SF の諸性質を比較した.

3. NOF の定量と部分精製

表 2 に示すように, NOF は培養皿基壁塗布剤として用いたポリオルニチンに吸着した.

NOF 分子が基壁に吸着することのみ, その作用が発揮されるものかどうかを調べたところ, 吸着および未吸着 NOF の両方を含む培養皿と, 吸着 NOF のみを含む培養皿では, CG ニューロンの突起伸展反応には全く差異が認められなかった (図 4). また, 吸着した NOF による CG ニューロンの突起伸展反応は用量依存的反応であることも明らかとなった. 従って, NOF 活性は, 基壁に吸着した NOF による神経突起伸展反応により定量が可能であると考えられた.

次に, 砂のう抽出液より, NOF の部分精製を試みた. 砂のう抽出液の硫酸分画を熱処理 (56°C, 30 分間) し, その上清に, DEAE-cellulose, DEAE Sepharose CL-6B (図 5), および Sepharose CL-6B (図 6, A) を用いたカラムクロマトグラフィーを行った. この精製過程の結果を表 3 にまとめた.

最終標品の NOF 標品は約 2000 倍の比活性を示し, 148 μ g protein/ml で著明な突起伸展反応が誘導された. この標品を SDS-PAGE (3-15%) で分析したところ, 数本の蛋白バンドが認められた.

そこで, NOF 活性をもつ蛋白質分子の同定をめざし, ゲルろ過で得られた NOF 標品 (図 6, A) を, さらに Concanavalin A Sepharose カラムクロマトグラフィーおよび, 2 度目の Sepharose CL-6B ゲルろ過法を用いて分画した (図 6, B). この段階では, NOF の回収率が 0.3% 以下となり, 極めて低かった. しかし, カラムクロマトグラフィーでの蛋白溶出ピークと NOF 活性ピークがほぼ対応した. この活性ピークを SDS-PAGE で分析すると, 2 本の蛋白バンド (M. W. 90 K ダルトンと 700 K ダルトン) を認めた (図 7).

また, DTT 処理による還元状態では, 230 K ダルトンの主蛋白バンドの他に, いくつかの微量のバンドが検出された.

4. 砂のう抽出液中の NOF の性質

砂のう抽出液 (DEAE cellulose 分画) に含まれる NOF の諸性質を調べた。砂のう NOF は、トリプシン処理 ($100 \mu\text{g protein/ml}$, 37°C , 1 時間) や 80°C , 5 分間の熱処理で失活し、 $\text{pH}1.5$ や $\text{pH}12$ (37°C , 2 時間) では不安定であった。 $\text{pH}4.8\sim10.6$ では、NOF 活性は比較的安定であり、 56°C の熱処理 (30 分間) で失活しなかった。分子量は、ゲルろ過法で 680 K ダルトン以上と推定された (図 6)。5–20% 蔗糖密度勾配法 (SW 27 ローター, $2.5 \times 10^4 \text{ rpm}$, 16 時間) では 12 S の沈降係数を示した。また、NOF は、heparinase (50 U/ml), neuramidase (5 U/ml), β -galactosidase (0.3 U/ml) および hyaluronidase (100 U/ml) などの酵素処理 (37°C , 24 時間, PBS(–) 中) により全く失活しなかったが、Concanavalin A Sepharose に結合 (表 2) し、 α -methyl mannoside で溶出した。

砂のう NOF が他の単離した神経細胞に作用するか否かを調べたところ、交感神経や知覚神経節細胞にも働き、神経突起をひきおこした。さらに、中枢の網膜や脊髄からの神経細胞にも作用し、突起伸張をひきおこした。

5. NOF 活性に及ぼす抗血清の抑制作用

砂のう NOF の部分精製標品 (DEAE cellulose 分画) に対する抗血清をウサギで作製し、CG ニューロン

の突起伸張および生存活性に及ぼす効果を調べた。抗血清量の増加とともに、NOF 活性は抑制されたが、生存活性には無影響であった (図 8 ; 図 9, A, B)。また、抗血清より調整した IgG 分画や、Sepharese CL-6B 分画を抗原とした抗血清を用いた実験でも、ほぼ上記と同様な抑制効果が確かめられた。更に、抗血清によりニューロン自体が障害されていないことを示すために、図 8 で、 300 nl/well の抗血清あるいは免疫前血清で処理した培養 CG ニューロンを、培養 16 時間目にトリプシン処理 (0.02% , 37°C , 5 分間) により回収した。これらの回収ニューロンを用いて、NOF に対する用量依存曲線を描いて調べたところ、新たに調整した CG ニューロンと全く同じ反応性を示した。

次に、ニワトリやげっ歯類の種々の組織由来の NOF 活性に及ぼす阻害効果を検討した。

各組織由来の NOF による最大突起伸張反応を 50% 阻害する抗血清量を比較した (表 4)。抗血清は、ニワトリ各組織由来の NOF に対しては、砂のう NOF と同じように強い抑制作用を示したが、げっ歯類の NOF に対する阻害作用は、100–1000 倍程弱かった。

6. 神経組織片による神経突起の伸張と抗血清による阻害作用

ニワトリ胚 DRG や SC は組織小片として培養する

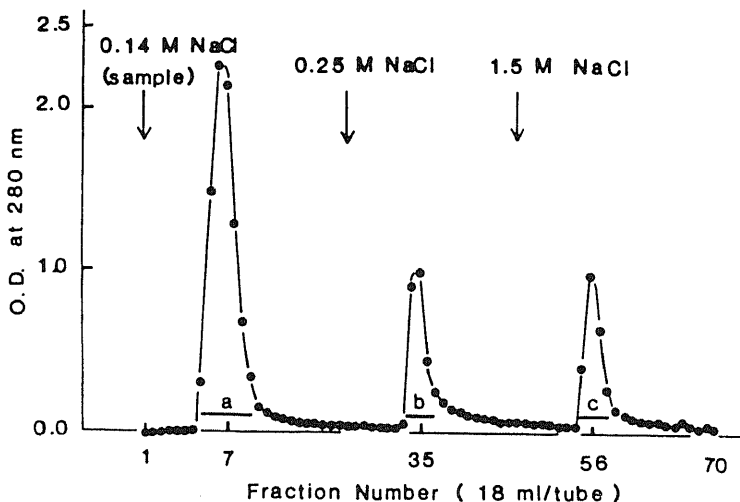


Fig. 3. DEAE cellulose column chromatography of ammonium sulfate fraction of gizzard extract. Sixty ml of ammonium sulfate fraction (15 mg protein/ml) of gizzard extract was dialyzed against 20 mM Tris-HCl ($\text{pH}7.4$) containing 0.14 M NaCl and applied on a DEAE cellulose column ($\phi 4 \text{ cm} \times 32 \text{ cm}$). Proteins were eluted with stepwise increase of 0.14 , 0.25 and 1.5 M NaCl in 20 mM Tris-HCl buffer. These fractions underlined with a, b and c were collected and dialyzed against PBS(–). The NOF activity in each fraction was assayed using the culture system of CG neurons.

と、外来の NOF を添加しなくとも、培養 48 時間までには組織片周囲より著しい突起伸展を示した (図 9, E; DRG). RE や CG の組織小片の突起伸展反応には、外来の NOF を必要とした (図 9, C; RE)¹³⁾. これらの神経組織小片の培養開始時に砂のう NOF の抗血清を共存させたところ、それぞれの伸展反応が完全に阻害された (図 9, D, F). また、培養開始後 24 時間目に抗血清を加えると、それまで続いていた突起伸展が停止し、すくなくとも 72 時間は、ニューロンや神経突起は変性することがなかった。

考 察

本実験により、ニワトリ砂のうに多量存在する NOF と同様な因子が、様々なニワトリ組織にも存在

しており、CG ニューロンのみならず、多くの末梢および中枢神経系のニューロンに作用することが明らかとなった。

砂のう抽出液存在下で CG ニューロンを培養すると、抽出液中に存在する、すくなくとも 2 種の栄養因子、即ち生存因子 (SF) と突起伸展因子 (NOF) がニューロンに作用し、著しい突起伸展と良好な生存状態を維持すると考えられた。砂のう中の SF は、眼球由来の SF と極めて似た性質を示すが、これらは明らかに NOF とは異なっていた (表 2). NOF のみで培養した CG ニューロンは、NOF と SF の共存下で培養したニューロンと、培養開始より数時間までは全く同じような突起伸展反応を示したが、ニューロンの生存率が急激に低下する 10 時間以後では、突起伸展反応に大き

Table 2. Comparison of neurite outgrowth factor (NOF) and survival factors (SF)

Properties and treatment	NOF from gizzard*	SF from gizzard**	SF from eye ball***
Effect on CG neurons	Neurite outgrowth promotion	Ensuring neuronal survival	Ensuring neuronal survival
M. W. (daltons)	$>680 \times 10^3$	30×10^3	$35-40 \times 10^3$
Trypsine (100 μ g/ml, at 37°C for 1 hr)	activity lost	activity lost	activity lost
Heart (at 56°C for 30 min)	stable	labile	labile
Affinity to concanavalin-A sepharose	bound	unbound	unbound
Attachment to polyornithine-coated culture dish	bound	unbound	unbound
Elution from DEAE-cellulose column in 20mM Tris-HCl at pH 7.4	0.42 NaCl	0.14 NaCl	<0.25 NaCl

* : A fraction eluted with 1.5 M NaCl from a DEAE cellulose column was dialyzed against PBS (-) before using as gizzard NOF samples.

** : A flow through fraction of a DEAE-cellulose column was dialyzed against PBS (-) before using as gizzard SF samples.

*** : Crude eye extract suspended in distilled water was dialyzed against PBS (-) before using as eye ball SF samples.

Table 3. Summary of partial purification of NOF from chicken gizzard

Purification step	Half maximal neurite outgrowth* (μ g protein/ml)	Recovery (%)	Purification fold
Tissue extract	74	100	1
Ammonium sulfate	18.50	80	4
Heart treatment	5.09	60	15
DEAE cellulose	0.60	25	123
DEAE Sepharose CL-6B	0.139	11	523
Sepharose CL-6B	0.037	3	2000

* : Protein amounts which induce 45% CG neurons to extend neurites were determined.

な差が認められた(未発表)。これらのことは、すくなくとも、突起伸展の開始は、NOF の作用にのみ依存していることを示唆する。

砂のう NOF に対するニューロンの応答性は、10 日齢胚以後のニューロンで急激に減少消失した(図 2, A)。しかし、逆に、砂のう組織に含まれる NOF 活性は、丁度逆相関をなして増加し(図 2, B)、しかも *in ovo* における CG ニューロンのシナプス形成率と一致した¹⁸⁾。即ち、神経・筋シナプス形成にあずかるニューロンとその標的組織に認められる相互作用に NOF が介在している可能性が示唆される。事実、三木ら¹¹⁾は、ラット骨格筋と併置培養を行った CG ニューロンでは、砂のう NOF の添加により、神経・筋シナプスの形成を高めたと報告している。NOF に対するニューロンの応答性の変化は、ニューロンの細胞膜の状態の変化(例えば NOF を認識する細胞受容体の数の減少や作用効率の低下など)が加齢により進行するためかもしれないが、現在のところは全く不明である。

砂のう NOF は、680 Kダルトンより大きな分子量

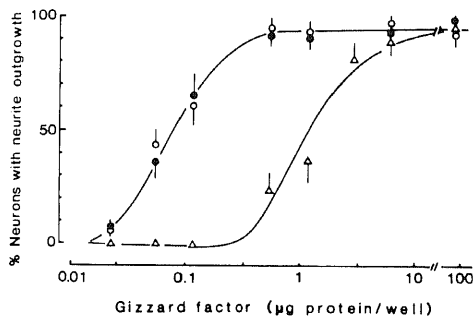


Fig. 4. Dependence of neurite outgrowth from CG neurons on the amounts of gizzard NOF bound to polyornithine-coated wells (ϕ 6 mm). Samples of 40 μ l of gizzard NOF (DEAE cellulose fraction of gizzard extract) were serially diluted with PBS(-) and then added to two groups of POR wells (group A, $\circ$; group B, $\bullet$). The third group of wells (Δ) received the same volume of PBS(-). After 24 hr of incubation at 37°C, the gizzard NOF samples of group A wells were transferred to group C wells from which the initial PBS(-) had been removed, and group A wells received 36 μ l of fresh PBS(-). The contents of group B wells were not changed. Three groups of wells were incubated for another 24 hr. Then, 40 μ l of CG neurons in culture medium and 4 μ l of eye extract were added to each well and cultured in 10% CO₂ in air at 37°C. Neurite outgrowth activity was scored after 16 hr of incubation. Each value is the mean of five different experiments with duplicate samples. Vertical bars show S. D.

を示すが、沈降定数は 12 S と小さい。また、Concanavalin A と結合する性質をもつことより、NOF は線状構造をもつ糖蛋白質と考えられる。分子の pH 安定性や分子サイズより、NOF は、マウス NGF とは全く異なる栄養因子と考えられる。また、NOF にヘパリン、レンチルレクチン、あるいは wheat germ レクチンなどをリガンドとしたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを施したところ、これらに吸着する分画および非吸着分画の両方に NOF 活性が検出された(未発表)。このことは、NOF 自身が多様な糖蛋白質の集団から成るものか、あるいは、NOF の糖鎖成分にのみ多様性が求められるものと考えられる。

Sephacrose CL-6B カラムクロマトグラフィーの活性フラクションに Concanavalin A Sepharose カラムクロマトグラフィーを施した後に、再度 Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーを行うと NOF 回収率は 0.3% 以下となった。しかし、分画操作によって得られた蛋白ピークと NOF 活性ピークがほぼ対応していることより(図 6, B)、活性ピークに存在している主な蛋白質が NOF 活性を保持している可能性が高い。しかしながら、SDS-PAGE で 2 本の主なタンパク

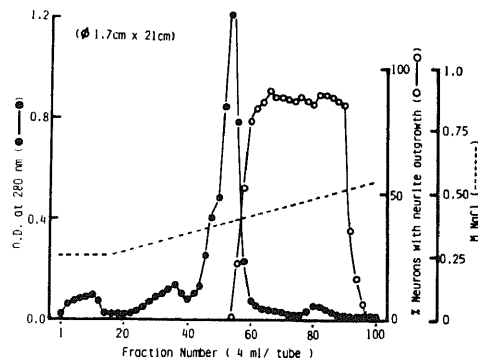


Fig. 5. Pattern of DEAE Sepharose CL-6B column chromatography. Heat treatment fraction of gizzard extract which was eluted with 1.5 M NaCl from a DEAE cellulose column and dialyzed against 20 mM Tris-HCl containing 0.25 M NaCl. The samples (1 mg protein/ml, 50 ml) was applied onto a DEAE Sepharose CL-6B column (ϕ 1.7 cm $\times$ 21 cm), and proteins were eluted from the column with a linear gradient from 0.25 to 1 M NaCl. Serially diluted samples of each fraction were applied to the culture system of CG neurons, and the NOF activity in each fraction was examined. The NOF activity of each fraction that was diluted to 300 fold with PBS(-) was depicted as ($\circ$) in the figure. Fractions (fraction numbers 65-95) were collected as a DEAE Sepharose CL-6B fraction to apply on the next step.

質バンドが認められたことより(図7), この2本のタンパク質から活性NOFが構成されているのか, あるいはどちらか一方にNOF活性があるのかについては明らかではない。また, 微量なタンパク質が分子量800 Kダルトンに相当する位置にも認められ, これがNOF分子である可能性も考えられる。還元状態での電気泳動により, 230 Kダルトンのタンパク質バンドの他に, 数本のバンドが認められた(図7)。最近, ラミニンやフィブロネクチンなどの細胞外膜高分子糖蛋白質が, NOFと類似の活性を持つことが明らかとなった¹⁹⁾²⁰⁾が, 今回のSDS-PAGEの結果より, 砂のうNOFはこれら糖蛋白質とは異なるものと考えられた。しかしながら, NOFがこれら糖蛋白質と同じグループに属する糖蛋白質であれば, NOFが, ニューロンの細胞膜や伸長しつつある神経突起の成長錐と物理的に接触でき, 標的組織まで神経突起をガイドするこ

とが可能である。

砂のうNOF標品に対する抗血清は, ニューロンの生存活性低下や不可逆的損傷を与えることなく, 突起伸長を阻害した。また, ニューロンを抗血清と共に37°C, 60分間反応させた後, 抗血清をとりのぞき, ニューロンのNOFに対する反応性を調べたところ, 全く正常な反応性を示した。これらのことより, 抗血清による突起伸長阻害は, 抗血清とNOF分子との直接的な抗原抗体反応によるものであり, 抗血清の非特異的反応によるものではないと結論される。

抗血清による阻害効果は, ニワトリとげっ歯類とで約100-1000倍の差異が認められた(表4)。これは, NOFタンパク質の抗原性に動物種差が存在するためと考えられる。一方, 同じ動物では, 異なる組織由来のNOFの中には多少阻害度に差があるが, 互いにかなり分子構造や抗原性が類似していると考えられる。

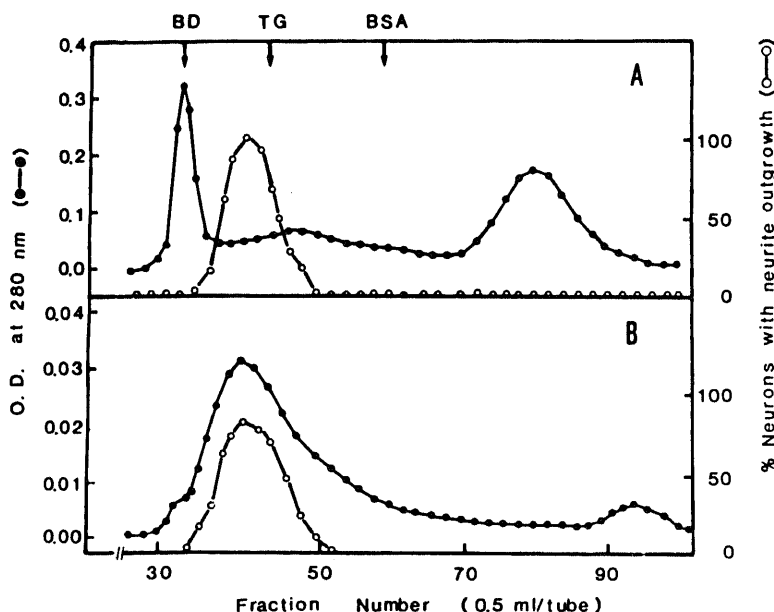


Fig. 6. Patterns of Sepharose CL-6B column chromatography (A) and a re-chromatography of the NOF active fraction from a Sepharose CL-6B column chromatography (B). (A) NOF rich fraction of DEAE Sepharose CL-6B column chromatography were concentrated to 3-5 mg protein/ml by ultrafiltration through amicon XM 300 membrane. A half ml of the concentrate was applied on a Sepharose CL-6B column (ϕ 1 cm $\times$ 60 cm), and proteins were eluted with 20 mM Tris-HCl containing 0.42 M NaCl. (B) Samples of Sepharose CL-6B column chromatography (fraction numbers 38-44) were challenged to Concanavalin A Sepharose (ϕ 1 cm $\times$ 2 cm) affinity column chromatography with a flow rate of 4 ml/hr/cm². Proteins were eluted with 1M α -methyl mannoside and then concentrated through ultrafiltration. A half ml of the concentrate was subjected to the second Sepharose CL-6B column chromatography. NOF activity of each fraction in both column chromatographies was assayed as described in the legend of Fig. 5.

わずかな阻害度の差異は、各組織細胞により産生された NOF の存在状態に差異があるためか、あるいは NOF 分子の多様性によるものと推察される。

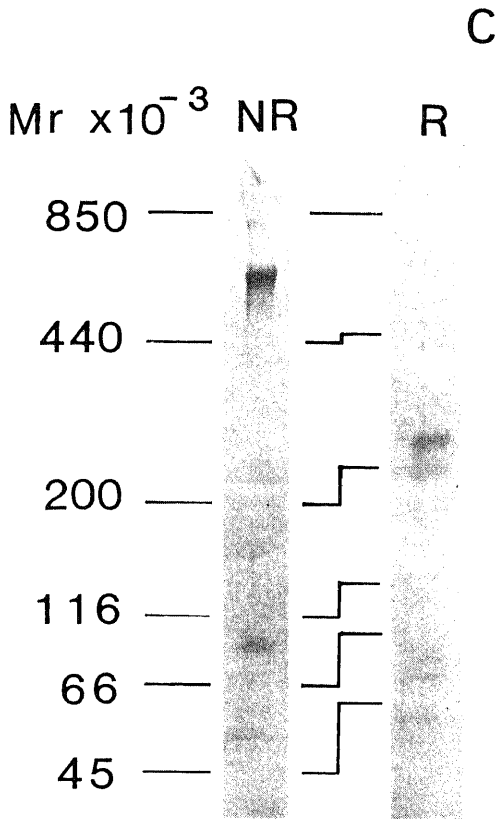


Fig. 7. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. NOF active fractions eluted with re-chromatography of Sepharose CL-6B (fraction numbers 38-44) were dialyzed against 0.1 mM Tris-HCl (pH7.4) and lyophilized. The dried protein (300 μ g protein) was dissolved with 1 ml of 42 mM Tris-HCl (pH6.8) containing 2% SDS, 15% glycerol and 0.0016% bromophenol blue and applied to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). 3–15% linear gradient acrylamide gel was used. Proteins on SDS-PAGE was stained with Coomassie blue. Some samples were run with-out reduction of disulfide bonds (NR). In reducing condition (R), the samples were treated with 80 mM dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 3 min before application on SDS-PAGE. Numbers on the right represent molecular weight. The following proteins were used for standard of molecular weight: mouse laminin (850 kd), a larger subunit of laminin (440 kd), myosin (200 kd), β -galactosidase (116 kd), bovine serum albumin (66 kd) and ovalbumin (45 kd).

NOF 標品に対する抗血清は、中枢神経である脊髄や網膜、あるいは、NGF に感受性のある交感・知覚両神経節ニューロンの突起伸展をも阻害することより、これらの神経細胞にも NOF が関与していることが示唆された。しかし、in ovo の神経系の発生過程に、同様な因子が実際に作用しているか否かについては、全く知られていない。

今後は、NOF の精製を通して、生体内の局在や生合成、あるいは生理作用や作用機作の解明が期待される。

結 論

1) ニワトリ胚 CG ニューロンに働く NOF が、砂のう組織中に多量存在した。砂のう中の NOF 含有量は、

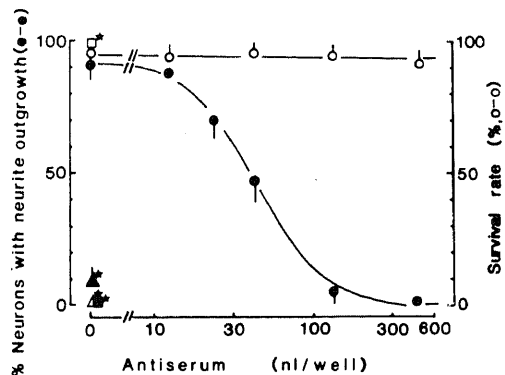


Fig. 8. Effect of antiserum concentration on the survival and neurite outgrowth of CG neurons. Polyornithine-coated wells (POR wells) were first exposed to 40 μ l of gizzard NOF (DEAE cellulose fraction, 60 μ g protein/ml) and washed. Then, the wells (NOF-bound POR wells) received 40 μ l of antiserum serially diluted with PBS(-). Each well was incubated for 12 hr at 37°C. After antisera were washed out, 40 μ l of CG neurons were suspended in the culture medium and 36 μ l of PBS(-) and 4 μ l of eye extract were added to each well. CG neurons were cultured for 24 hr, and the number of surviving CG neurons (○) and neurons with neurite outgrowth (●) were determined. Points marked with an asterisk signify values of both survival rate and neurite outgrowth rate of CG neurons cultured on POR wells that were not preincubated with gizzard NOF. □ and ■, survival rate of the CG neurons cultured in the presence and absence of eye extract, respectively; △ and ▲, rate of the CG neurons possessing neurite outgrowth which were cultured with and without eye extract, respectively. Each value is the mean of three different experiments with duplicate samples. Vertical bars show S. D.

孵卵 16 日齢胚までは加齢に伴い上昇し、その後はそのレベルを維持した。

2) 砂のう抽出液による CG ニューロンの著明な突起伸展には、NOF と、NOF とは性質のことなる生存因子 (SF) が必要であった。

3) NOF に対する CG ニューロンの感受性は、孵卵 10 日齢胚までは良好だが、その後、加齢とともに急速に低下していった。

4) 砂のう NOF を組織抽出液より約 2000 倍部分精製した。回収率は 3 % であり、148 ng/ml の NOF 標品で最大突起伸展反応が誘導された。

5) 砂のう NOF 分子は、680 Kダルトン以上の分子量をもつ酸性糖蛋白質あるいはプロテオグリカンで、線状構造をもつと考えられた。

6) NOF 標品に対する抗血清は、NOF 活性を特異的に抑制したが、これはニューロンへの非特異的損傷

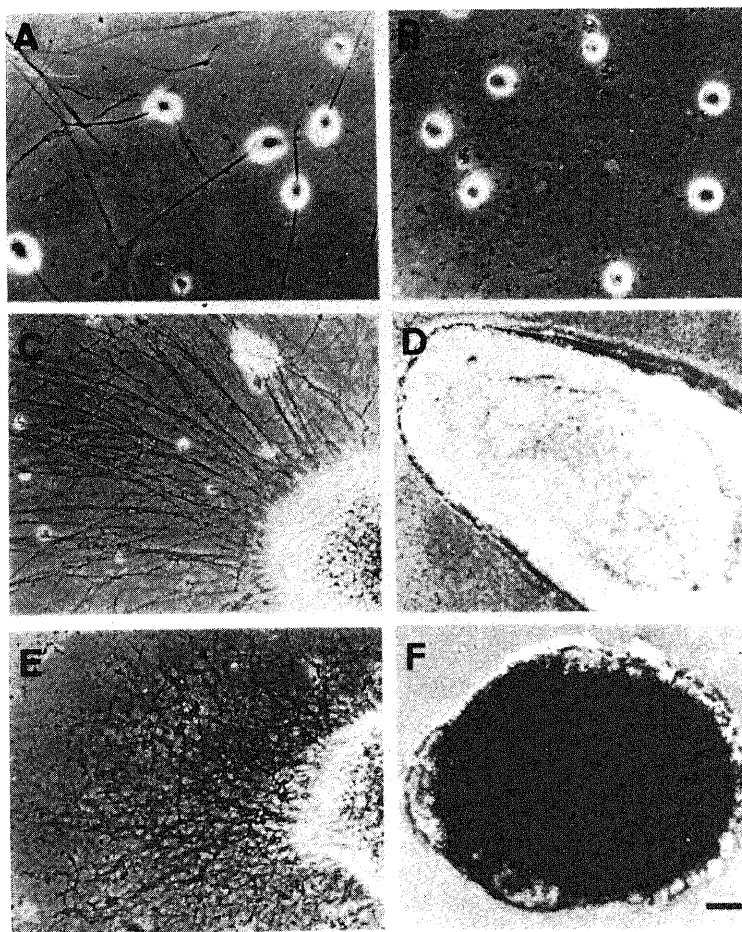


Fig. 9. Phase contrast microphotographs of CG neurons (A, B), and neuronal explants from retina (C, D) and dorsal root ganglia (E, F) cultured in the absence or presence of the antiserum. Ciliary ganglion (CG), retina (RE) and dorsal root ganglia (DRG) were dissected from chick embryos of 8-, 8- and 9-day, respectively. CG neurons were separated and cultured for 16 hr on NOF-bound POR-wells which were exposed to either preimmune serum (A) or antiserum (B). RE and DRG were cut into pieces less than 1 mm square with scissors. Two groups of explants from each tissue were cultured on POR wells ($\varnothing$ 16 mm) with 600 μ l of the culture medium with gizzard NOF (DEAE cellulose fraction, 30 μ g protein/ml) for RE (C, D) and without gizzard NOF for DRG (E, F). At the beginning of incubation, one of each group received 3 μ l of preimmune serum (C, E) or the other 3 μ l of antiserum (D, F). Each group of explants was further cultured up to 48 hr. CG neurons (A and B) and explants (C, D, E and F) were photographed on a phase contrast microscope at 16 and 48 hr, respectively. Scale, 40 μ m.

Table 4. Comparison of amounts of antiserum that cause 50% inhibition of the neurite outgrowth of CG neurons maximally induced by NOFs from various sources

Factor source		Amounts of serum to exert 50% inhibition (μ l/well)	Relative susceptibility of antiserum-inhibition
Chicken gizzard extract:		0.044	1.0
Chick embryo:			
Gizzard	CM	0.120	2.7
Heart	CM	0.140	3.2
Skeletal muscle	CM	0.150	3.4
Brain	CM	0.400	9.1
Retina	CM	0.130	3.0
CG derived glia	CM	0.180	4.1
Newborn mouse:			
Heart	CM	70	1,590
Skeletal muscle	CM	32	727
Brain	CM	55	1,250
Newborn rat:			
Heart	CM	150	3,409
Skeletal muscle	CM	65	1,477
Brain	CM	75	1,705
Clonal cells:			
Glioma (Rat, C6)	CM	85	1,932
Neuroblastoma (Mouse, N18TG-2)	CM	45	1,023
Their hybridoma (NG108-15)	CM	43	977

CM: conditioned medium

The amount of antiserum required for 50% inhibition was determined from inhibition curves as shown in Fig. 8. Each value is the mean of 3 different experiments.

作用ではなかった。

7) 種々の組織由来の NOF に対する抗血清の阻害効率、ニワトリとげっ歯の間で約 100-1000 倍の差異が認められた。NOF 分子に異種動物間での種差が存在すると考えられた。

8) DRG, SG, CG, RE および SC の各神経細胞による突起伸展反応も抗血清により阻害された。NOF 因子が中枢および末梢の神経系に作用している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った三木直正教授に深く感謝いたします。また、終始、御指導、御教示を頂きました東田陽博助教授ならびに薬理部各位に深く感謝いたします。

文 献

1) Hay, E. D.: Interaction between the cell surface and extracellular matrix in corneal development, p115-137. In J. W. Lash & M. M. Burger

(ed.), Cell and Tissue Interactions, Raven Press, New York, 1977.

2) Lofberg, J., Ahlfors, K. & Fallstrom, C.: Neural crest cell migration in relation to extracellular matrix organization in the embryonic axolotl trunk. Dev. Biol., 75, 148-167 (1980).

3) Black, I. B.: Regulation of autonomic development. Annu. Rev. Neurosci., 65, 50-56 (1978).

4) Varon, S. & Bunge, R. P.: Trophic mechanisms in the peripheral nervous system. Annu. Rev. Neurosci., 1, 327-361 (1978).

5) Green, L. A. & Shooter, E. M.: The nerve growth factor. Biochemistry synthesis, and mechanism of action. Annu. Rev. Neurosci., 3, 353-402 (1980).

6) Thoenen, H. & Barde, Y. A.: Physiology of nerve growth factor. Physiol. Rev., 60, 1284-1355 (1980).

7) Black, I. B., Coughlin, M. D. & Cochard, P.:

Factors regulating neuronal differentiation. Soc. Neurosci. Symp., 4, 184-204 (1979).

8) Helfand, L. S., Riopelle, R. J. & Wessells, N. K.: Nonequivalence of conditioned medium and nerve growth factor for sympathetic, parasympathetic, and sensory neurons. Exp. Cell Res., 113, 39-45 (1978).

9) Collins, F.: Induction of neurite outgrowth by a conditioned medium factor bound to the culture substratum, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5210-5213 (1978).

10) Varon, S. & Adler, R.: Trophic and specifying factors directed to neuronal cells. Adv. Cell. Neurobiol., 2, 115-163 (1981).

11) Miki, N., Hayashi, Y. & Higashida, H.: Characterization of chick gizzard extract that promotes neurite outgrowth in cultured ciliary neurons. J. Neurochem., 37, 627-633 (1981).

12) 林要喜知・東田陽博・三木直正: 単離細胞を用いた医化学研究の諸方法. 4. 脳・神経——神経細胞の栄養因子とシナプス形成. 代謝, 19, 407-416 (1982).

13) Kato, S., Negishi, K., Hayashi, Y. & Miki, N.: Enhancement of neurite outgrowth and aspartate-glutamate uptake system in retinal explants cultured with chick gizzard extract. J. Neurochem., 40, 929-938 (1983).

14) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.

L. & Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951).

15) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685 (1970).

16) Adler, R., Landa, K. B., Manthorpe, M. & Varon, S.: Cholinergic neuronotrophic factor. Intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. Science, 204, 1434-1436 (1979).

17) Goding, J. W.: Conjugation of antibodies with fluorochromes. Modifications to the standard methods. J. Immunol. Methods, 13, 215-226 (1976).

18) Landmesser, L. & Pilar, G.: Interactions between neurons and their targets during in vivo synaptogenesis. Fed. Proc., 37, 2016-2022 (1978).

19) Rogers, S. L., Letourneau, P. C., Palm, S. L., McCarthy, J. & Furcht, L. T.: Neurite extension by peripheral and central nervous system neurons in response to substratum-bound fibronectin and laminin. Develop. Biol., 98, 212-220 (1983).

20) Wewer, U., Albrechten, R., Manthorpe, M., Varon, S., Engvall, E. & Ruoslahti, E.: Human laminin isolated in a nearly intact, biologically active form from placenta by limited proteolysis. J. Biol. Chem., 258, 12654-12660 (1983).

Studies on Neurite Outgrowth Factor that Acts on Parasympathetic Neurons: Partial Purification from Gizzard Extract, its Properties and Preparation of Antiserum Yokichi Hayashi, Department of Pharmacology (Director: Prof. N. Miki), Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Jusen Med. Soc., 93, 98-111 (1984)

Key words: Ciliary ganglion neurons, Neurite outgrowth factor, Gizzard extract

Abstract

Chicken gizzard extract contains a macromolecule that promotes the neurite outgrowth of dissociated neurons from the ciliary ganglia (CG) of chick embryos. The factor (neurite outgrowth factor, NOF) in gizzard extract was partially purified to 2000 fold by a combination of 0-35% ammonium sulfate fractionation, heat treatment (56°C, 30 min), DEAE cellulose and DEAE Sepharose CL-6B column chromatography, and finally Sepharose CL-6B gel filtration column chromatography. The recovery of NOF activity during these purification steps was about 3%. Only 148 ng protein/ml of the final step fraction was enough to exert the maximal neuritic response of the cultured CG neurons obtained from 8-day old chick embryos. The NOF was an acidic glycoprotein or proteoglycan whose molecular weight in the native state was

estimated to be more than 680 k-daltons. The neurite outgrowth of CG neurons by gizzard NOF strictly depends on the embryonal age. The maximal neurite outgrowth was observed when CG neurons were dissociated from the embryo younger than 10 days. After that time the response of CG neurons to the NOF rapidly declined and was almost lost at day 14. When the rabbit antiserum prepared against DEAE cellulose fraction of gizzard NOF was introduced to the culture system of CG neurons, the neuritic response induced by NOF was completely blocked in a dose-dependent manner. The antiserum caused neither cell death nor irreversible damage to CG neurons. Although the activities of NOFs separated from various chick embryo tissues were suppressed by almost the same and small amount of antiserum, a large dose of antiserum (about 100-1000 fold more than the above) was required to inhibit the activities of NOFs obtained from murine sources. The gizzard NOF could promote neurite outgrowth of cultured neurons not only from the sympathetic and dorsal root ganglia but also from the retina and spinal cord. The antiserum against gizzard NOF inhibited the neuritic responses of all these neurons. The present data suggest that NOF is absolutely required for neurite outgrowth from the neurons which are developing and regenerating in both central and peripheral nervous systems, and that there exists species difference in NOFs at least between the chick and the murine.