

脊椎動物神経系の発生と分化の分子生物学的研究

Molecular genetic analysis on the development of the vertebrate nervous system

代表研究者	大阪大学蛋白質研究所蛋白質機能制御部門教授 Prof. Institute for Protein Research, Osaka Univ. Katsuhiko MIKOSHIBA	御子柴 克彦
協同研究者	大阪大学蛋白質研究所蛋白質機能制御部門 Institute for Protein Research, Osaka Univ. Nobuaki MAEDA	前 田 信 明
	大阪大学蛋白質研究所蛋白質機能制御部門 Institute for Protein Research, Osaka Univ. Michio NIINOBE	新 延 道 夫
	岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 行動制御研究部門 Institute for Protein Research, Osaka Univ. Teiichi FURUICHI	古 市 貞 一
	岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 行動制御研究部門 Institute for Protein Research, Osaka Univ. Shingo YOSHIKAWA	吉 川 真 悟
	岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 行動制御研究部門 Institute for Protein Research, Osaka Univ. Atsushi MIYAWAKI	宮 脇 敦 史

To analyse the development of the nervous system, cerebellum offers an unique model.

Cerebellum consists of only 5 types of neurons and cerebellar circuitry is well understood down to the synaptic level. In addition, there are many neuropathological mutants which have abnormality in the cerebellum. *Nervous* or *pcd* lacks Purkinje cells, *weaver* lacks granule cells. *staggerer* contains all types of neurons, however the dendritic arborization of the Purkinje cell is poor and no spines are formed, resulting the absence of synaptic contact between granule cell and Purkinje cell.

High molecular weight protein, P₄₀₀ protein is enriched in the isolated Purkinje cells. It is dramatically decreased in the Purkinje cell-deficient *nervous* and *pcd*, and also almost missing in *staggerer* even though Purkinje cell exists.

It is therefore presumed that P₄₀₀ plays an important role in Purkinje cell, especially on dendritic arborization or spine formation. We have characterized the properties of the protein. It is a glycoprotein and is found to be an ubiquitous protein existing in the cerebrum and also other tissues. In the cerebellum the protein increased dramatically from postnatal day 3 to day 21. This enhancement of the expression coincided with the growth of the dendritic arborization of Purkinje cell. Purkinje cells of *staggerer* proved to be incapable of enhanced P₄₀₀ expression but stay at the basal level. Immuno-electron microscopic study using monoclonal antibodies revealed that P₄₀₀ is present at the endoplasmic reticulum, cytoplasmic membrane and the postsynaptic

densities of Purkinje cells. Immunohistochemical analysis on the cultured Purkinje cell revealed that P_{400} is located also on the surface of Purkinje cell. It is highly phosphorylated and the phosphorylation is enhanced by cAMP but not by cGMP, and is also phosphorylated by calmodulin dependent protein kinase (kinase II), suggesting a role in signal transduction in a Purkinje cell. Pulse labelling study revealed that it is a metabolically active protein.

Recently, we have screened cDNA library constructed from mouse cerebellum, and cloned cDNA of P_{400} . *In situ* hybridization study revealed that transcript is enriched in the Purkinje cell soma but the transcript is detected not only in the cerebellum but also in other tissues.

We have found quite recently that P_{400} protein is identical to inositol tris phosphates (Ins P3) receptor.

研究目的

脳の機能発現や形態形成は、緊密な脳内の細胞間連絡および細胞内での特異的な機能制御のもとに初めて正常に遂行されるものである。この脳に特異的な制御は、脳内で特異的に発現している蛋白質が重要な役割を果たしているものと考えられる。小脳は中枢神経系のうちでも形態学的な構築が明瞭で、構成するニューロンの種類も5種と限られて、しかも相互のニューロンネットワークが明らかとなっている。そこで発生と分化において重要な役割を果たしていると考えられる小脳に特異的に発現しているプルキンエ細胞の蛋白質(P_{400} 蛋白質)に注目し、その蛋白質の性質を明らかにするとともにその機能解明を目標とした。

研究経過

小脳の解析をする上で、突然変異マウス(ミュータント)を導入することは非常に有効な手段となる。これらの小脳ミュータントはいずれも小脳の低形成を示し、強い運動失調を示す。プルキンエ細胞のみ欠損するミュータント(nervous, pcd)、顆粒細胞のみ欠損するミュータント(weaver)などが知られている。蛋白質成分の変化に注目しながら各ミュータントをスクリーニングする過程で高分子蛋白質 P_{400} がプルキンエ細胞欠損マウスで著明に減少していることが明らかとなった。 P_{400} は代謝的にも活発に変動し、リン酸化を受ける膜蛋白質であった。この P_{400} 蛋白質は、プルキンエ細胞でCaスパイクが欠落している staggerer ミュータントでも著明に減少していることからCa代謝に重要な役割を果たしているものと考えられたが予想通り、 P_{400} 蛋白質はCaイ

オン動員に重要なレセプターそのものであることを明らかにすることが出来た。

研究成果

(1) P_{400} モノクローン抗体(18A10)を用いた免疫組織化学的反応

P_{400} に対するモノクローン抗体(18A10)を作製し、発達途上にあるマウス小脳で当蛋白質の発現をWestern blot法により解析した。図1に示すように、生後0日目(P0)の小脳において P_{400} の発現はほとんど見られないが、P3からP21にかけて著明な発現の増大が認められた。18A10による小脳切片の免疫組織化学の結果、P0の小脳においては染色される細胞は存在しなかったが、P5の小脳においてはプルキンエ細胞の伸長

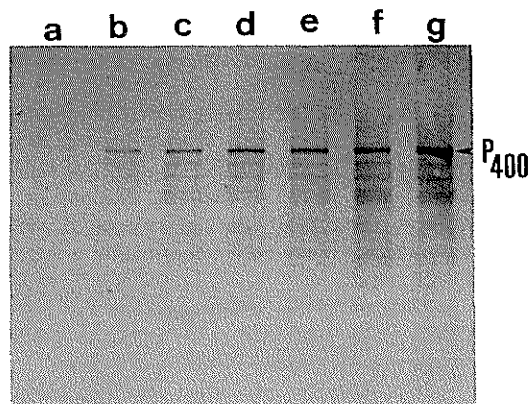


図1 小脳の各発達段階における P_{400} 蛋白質の発現パターン。

a: 出生日, b: 生後3日, c: 生後5日, d: 生後7日, e: 生後10日, f: 生後15日, g: 生後21日, P_{400} モノクローン抗体による Western blot 解析

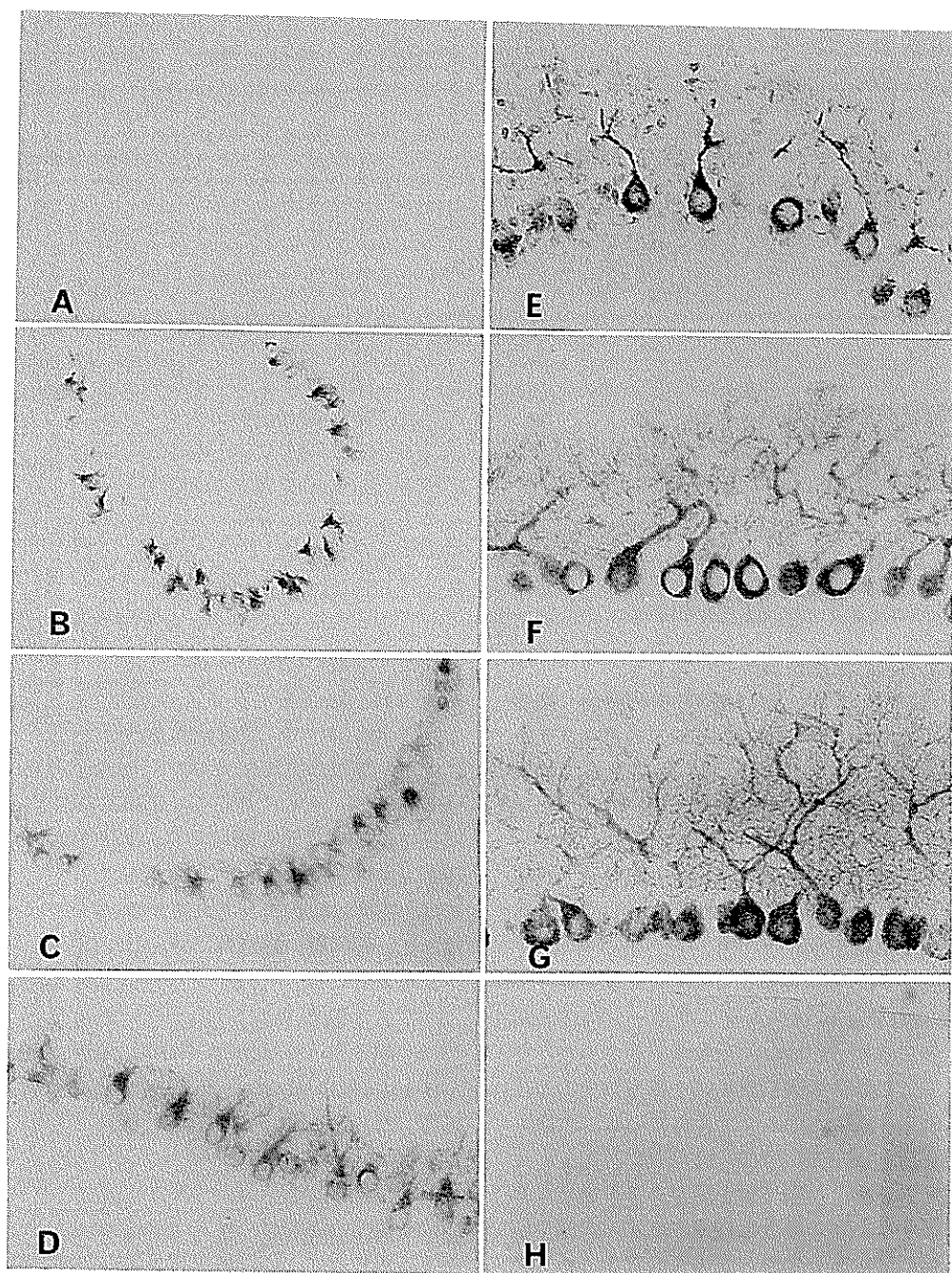


図2 免疫組織化学的な P_{400} 蛋白質の小脳皮質における発現パターン。
 生後0日(A), 3日(B), 5日(C), 7日(D), 10
 日(E), 15日(F), 20日(G)

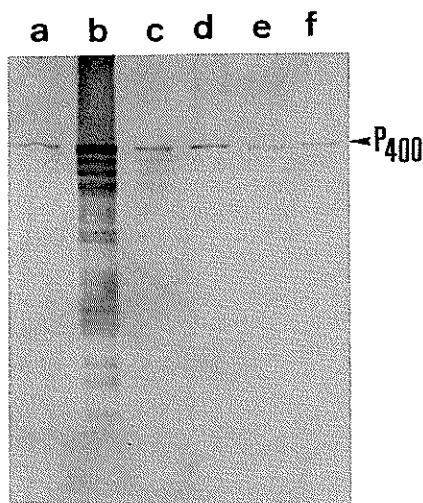


図3. Western blot 法による P_{400} 蛋白質の検出。
正常マウス (23 日目) の大脳 (a), 小脳 (b), 脳
幹部 (c), と staggerer マウスの大脳 (d), 小脳
(e), 脳幹部 (f) のホモジネートを用いた。

しつ々ある樹状突起が濃染された (図 2, A, B)。P 21 の小脳ではプルキンエ細胞の樹状突起、細胞体および軸索が著明に染色され、このような染色性は成熟マウス小脳においても保持されていた (図 2, G)。生後マウスの大脳および脳幹部においては調べた限り、染色される細胞は存在しなかったが、Western blot 法によると大脳部および脳幹部においても、ごく少量ながら、18A10 に反応する蛋白質が検出された (図 3)。当蛋白質は、小脳の P_{400} と同じ電気泳動度を示し、18A10 以外の 2 種類の P_{400} に対するモノクローン抗体とも反応することが Western blot 法で示された。したがって、これらの蛋白質は同一のものであると考えられる。staggerer マウスにおいては、大脳および脳幹部では正常マウスと同程度の P_{400} の発現が見られるが、小脳では正常マウスで見られるような著明な発現の増大は観察されず、大脳や脳幹部とほぼ同程度の発現しか見られなかった (図 2)。以上のように P_{400} は、小脳のみならず脳全体に少量ながら存在するが、プルキンエ細胞においてはその樹上突起形成期に一致して発現が著明に増大すること、また staggerer マウスにおいては、このプルキンエ細胞による発現増大が起こら

ないことが示された。このことは、 P_{400} がプルキンエ細胞の形態形成に重要な役割を果たしていることを強く示唆している。

(2) 3 種の P_{400} モノクローン抗体を利用した P_{400} の解析

我々は、18A10 以外に 4C11, 10A6 のモノクローン抗体を得ることに成功しているが、これら 3 種のモノクローン抗体を用いて P_{400} の局在の解析を進めた。 P_{400} 蛋白質に対する 3 種類のモノクローン抗体 (4C11, 10A6, 18A10 抗体) は精製した P_{400} 蛋白質と強く反応する。しかしながら、 P_{400} 蛋白質を *Staphylococcus aureus* V8 プロテアーゼで部分分解し、分解産物に対する抗体の反応を immunoblot 法で分析すると、それぞれ異なったペプチドに反応することが明らかとなった。このことから、これらの抗体は P_{400} 蛋白質上の異なった抗原決定部位を認識することが明らかである。

次に、小脳の初代培養系を用いて免疫組織化学を行った。細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、Triton X-100 で細胞膜を透過性にした場合には、3 種類の抗体はプルキンエ細胞を濃染した (図 4, A, B)。それに対して、未固定の生きた細胞と抗体を反応させた場合には、18A10 のみがプルキンエ細胞に結合した (図 4, C, D)。この条件では、抗体は細胞膜を透過できないため、18A10 は、 P_{400} 蛋白質の細胞外に突出した部分を認識すると考えられる。

マウス小脳からミクロソーム画分を調製し、1.0 M KCl, 0.5% Triton X-100 を含む緩衝液または pH 2.5 の glycine-HCl 緩衝液中で 60 分間、処理した。遠心後、上清および沈殿中の P_{400} 蛋白質を immunoblot 法で検出したところ、Triton X-100 処理の場合には、一部が可溶化されていたが、その他の場合は、全く可溶化されていなかった。このことは、 P_{400} 蛋白質が、内在性の膜蛋白質であることを示唆する。

次に、細胞分画法によって P_{400} 蛋白質の細胞内局在を検討した。immunoblot 法により、マウス小脳より調製した各画分中の P_{400} 蛋白質を検出したところミクロソーム画分、シナプトソーム画

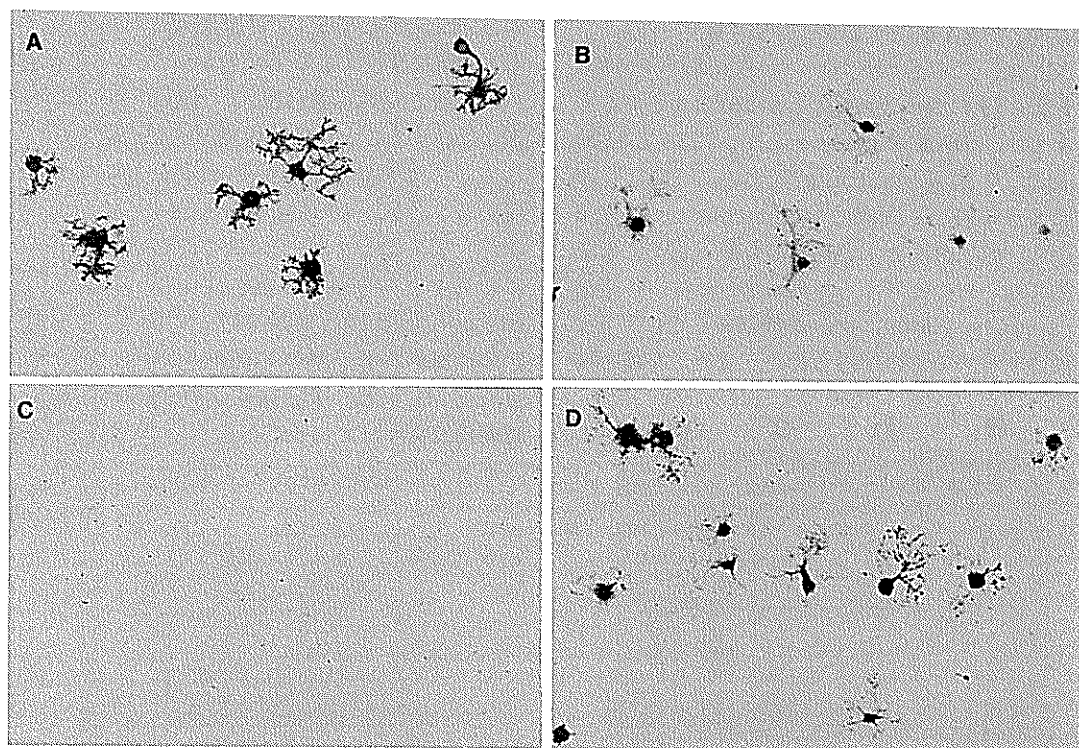


図4. 小脳の初代培養系を用いて行なった免疫組織化学。

A(4C11), B(18A10): 固定後免疫反応を行った。C(4C11), D(18A10) は、未固定の状態では抗体と反応させて免疫組織反応を行った。

分、シナプス膜画分、シナプス結合部画分にその存在が確認された(図5)。

中でもシナプス結合部画分に最も濃縮されていた。プルキンエ細胞の細胞膜上に存在する P_{400} 蛋白質は、ミクロソーム画分に回収されと考えられるが、それに加えてシナプス部位にも P_{400} 蛋白質が豊富に存在することが明らかである。以上のように P_{400} 蛋白質は、プルキンエ細胞の細胞膜およびシナプス部位に局在し、その一部が細胞外に突出した膜内在性の糖蛋白質であると考えられる。このことは、 P_{400} 蛋白質がプルキンエ細胞のシナプス形成に重要な役割を演じているという仮説を支持するが、その機能については依然、不明である。今後、遺伝子工学的な手法を用いた P_{400} 蛋白質の機能解析が必要となると考えられる。

(3) マウス小脳の Purkinje 細胞に特異的な蛋白質 P_{400} の cDNA クローニング

P_{400} の構造の特徴を明らかにするため P_{400} に対するモノクローン抗体を用いて、 P_{400} cDNA のクローニングとその解析を行った。

3種類の抗体 (mAb18A10, 4C11, 10A6) を用い、 λ 23S library を immunoscreening して、多数の陽性クローンを得た。そのうち9種類のクローンから β -gal fusion protein を調整し、抗体との反応を再度検定した。fusion protein を SDS-PAGE で分画後、Western blot 解析をした。強く反応するクローンを以後の実験に使用した (mAb18A10 はクローン 23-2, -9, 4C11 は 23-5, -15, 10A6 23-12)。これらのクローンの cDNA 部分を probe にして Northern blot 解析をしたところ、23-2, -5, -12S, および -15 いずれも約 9.5 kb の RNA と hybridize することから、これらのクローンは同じ mRNA から reverse transcribe されたものと考えられた。したがって、

P₄₀₀ の mRNA 約 9.5 kb とかなり長いものと示唆された。これらのクローンから cDNA を pUC 118 と 119 に subcloning し sequencing するとともに、cDNA を probe として、λ23S と λCbl library を再度 screening して、ほぼ全長の cDNA を単離し、同様に sequencing した。図 6 は、得られた cDNA の制限酵素切断地図で、ほぼ全長に近いものと考えられる。cDNA は、3' 末端の polyadenylation site が異なることによる 2 種類のサイズのものが得られた。また、3 種の抗

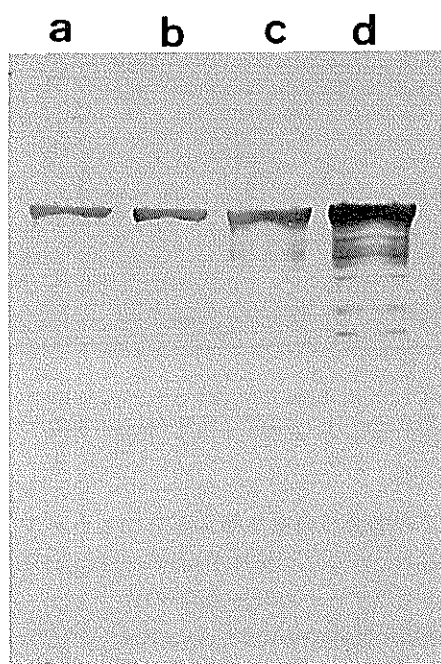


図 5. 小脳の各画分における Western blot による反応。

a: ミクロソーム, b: シナプトソーム, c: シナプス膜, d: 後シナプス膜。

体の epitope となるアミノ酸配列は、図 6 の点で示す領域に存在することが分かった。

ところで、P₄₀₀ 蛋白質は、小脳の Purkinje 細胞に局在することが免疫組織学的に確認されている。そこで P₄₀₀ 遺伝子が Purkinje 細胞でのみ発現することが、その局在性と一致するのかわかってみた。図 7 は、クローン 23-2 の cDNA を probe にしてマウス小脳の組織切片中の mRNA と *in situ* hybridization 実験を行ったものである。強い陽性反応が分子層の Purkinje 細胞にのみ検出された。これは、P₄₀₀ 遺伝子が Purkinje 細胞で特異的に発現していることを示している。

現在、得られた cDNA の塩基配列から推定さ

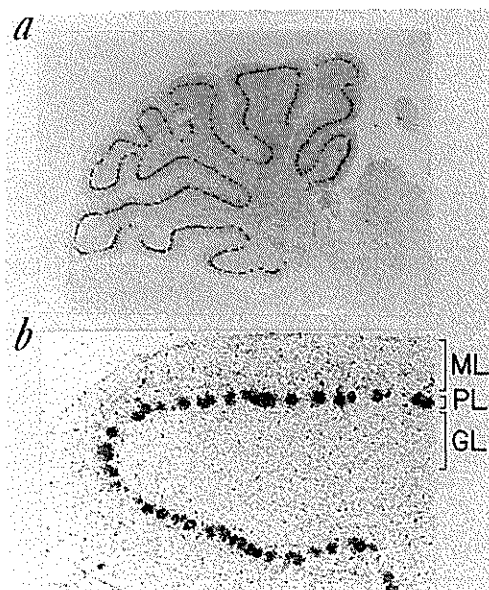


図 7. 小脳での蛋白質 cDNA をプローブにして行った *in situ* hybridization

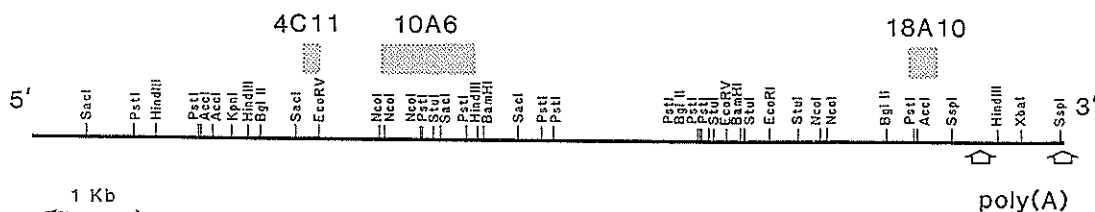


図 6. P₄₀₀ cDNA の制限酵素地図。

4C11, 10A6, 18A10 で示した部分は各モノクローン抗体を用いてクローニングされた部分。

れる P_{400} 蛋白質のアミノ酸配列の解析などを行うことにより、 P_{400} の構造上の特徴を研究中である。

(4) イノシトール 3 リン酸レセプターとしての P_{400} 蛋白質

Supattapone らは最近、 IP_3 受容体が小脳に多量に存在し、その分子量は 26 万であると報告している。我々はマウス小脳より IP_3 受容体を精製し、 P_{400} 蛋白質との同一性およびその性質について検討した。Lentil Lectin Sepharose においては IP_3 結合活性は非吸着画分にも溶出されているが、これは糖鎖の heterogeneity の結果であると考えられる。その他のクロマトグラフィーでは、 IP_3 結合活性は、単一ピークとして回収された。 IP_3 受容体は最終的に分子量 25 万の単一蛋白質として精製された。精製 IP_3 受容体を Scatchard 解析した結果、 K_d および B_{max} は、それぞれ 83 nM, 2.1 pmol/ μ g protein であった。クロマトグラフィーの各分画を抗 P_{400} モノクローン抗体、4C11 で immunoblot 解析したところ、 P_{400} 蛋白質と IP_3 結合活性の溶出位置は完全に一致した。さらに、精製 IP_3 受容体はその他の 2 種類の抗 P_{400} モノクローン抗体とも反応した。このことは、 P_{400} 蛋白質が IP_3 受容体であることを示すものと考えられる。次に精製 IP_3 受容体を bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS3) で架橋し、agarose PAGE で解析したところ、2, 3, 4 量体の産生が認められた。架橋剤濃度を上げて 5 量体以上の産生は認められない。このことは native な受容体は 4 量体として存在することを示している。

今後の課題と発展

P_{400} 蛋白質は、小脳プルキンエ細胞に豊富に存在する分子量 25 万の糖蛋白質である。我々は、当蛋白質が、(1) プルキンエ細胞に例外的に多量

に発現しているが、他の組織にも少量ながら存在するかなり不偏的な成分であること。(2) プルキンエ細胞の小胞体、細胞膜、シナプス後肥厚部に局在性を示すこと、(3) プルキンエ細胞の樹状突起およびシナプス形成期に一致して当蛋白質の発現は増大するが樹状突起の低形成と平行線維とのシナプス欠損を示す staggerer マウスのプルキンエ細胞においては当蛋白質の発現増大がみられないこと。(4) P_{400} 蛋白質は、A キナーゼの良い基質となり、培養プルキンエ細胞においても当蛋白質のリン酸化が観察されることなどを明らかにしてきた。しかも、staggerer マウスのプルキンエ細胞は Ca スパイクがみられないという電気生理学的所見が得られている。そのため P_{400} は、Ca 代謝と密接な関連のある蛋白質と考えられていたが、今回 P_{400} が IP_3 レセプターであるという結果を得た。 IP_3 が細胞内貯蔵部位 (小胞体) から Ca イオンを放出させることは多くの細胞で確認されている。また T リンパ球においては IP_3 が細胞外から Ca イオン流入にも関与していることが示唆されている。 P_{400}/IP_3 受容体はプルキンエ細胞の小胞体および細胞膜に局在しておりプルキンエ細胞における Ca イオンの移動に直接、関与していることが考えられる。現在、阪大基礎工葛西教授との共同で精製 P_{400}/IP_3 受容体を脂質平面膜に組み込むことによって、イオンチャンネル活性を測定しているところである。最近、プルキンエ細胞における non-NMDA 型のグルタミン酸受容体がイノシトールリン脂質代謝を上昇させることにより作用する可能性が示唆されており、 P_{400}/IP_3 受容体とプルキンエ細胞の機能との関連に興味をもたれる。

今後小脳のみならず広く神経系全体、または他臓器も含めて基本的な情報伝達のメカニズムを明らかにするものとして大きな発展が期待される。