

神経ネットワーク形成の分子機構に関する研究

The molecular mechanisms of neuronal net work formation

代表研究者 大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター神経生化学教授

祖父江 憲 治

Prof., Biomed. Res. Center, Osaka Univ. Med. Sch.
Kenji SOBUE

協同研究者 大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター神経生化学助手

乾 誠

Res. Assoc., Biomed. Res. Center, Osaka Univ. Med. Sch.
Makoto INUI

大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター神経生化学助手

田 中 潤 也

Res. Assoc., Biomed. Res. Center, Osaka Univ. Med. Sch.
Junya TANAKA

大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター神経生化学助手

林 謙一郎

Res. Assoc., Biomed. Res. Center, Osaka Univ. Med. Sch.
Kenichirou HAYASHI

We have investigated the expressional changes and molecular constructions of cytoskeletal proteins, and the regulation mechanisms among these proteins regarding the synaptic formation. Further, we have also analysed the involvement of cytoskeletal proteins in the synaptic formation with the molecular biological methods. The results we have obtained are as follows.

1. We clarified the localization of calspectin, pp 60^{c-src} and Ca²⁺-insensitive α -actinin within the adhesive region (or the body) of the neuronal growth cone. By contrast, both Ca²⁺-sensitive α -actinin and F-actin were localized in the filopodia of the growth cone.

2. We demonstrated that the interaction between calspectin (spectrin), protein 4.1, and actin is regulated by Ca²⁺/calmodulin.

3. We determined the primary structure of low *Mr*(*l*-) caldesmon derived from chicken brain by cDNA cloning, and also examined the structural and functional relationship of this protein. As a result, we found the minimum essential domain of caldesmon resides in the 50 amino acid sequence located in the COOH-terminal portion. We also determined the primary structures of high *Mr* (*h*-) caldesmon derived from chicken smooth muscle and *l*-caldesmon from human cultured cell (He La). Furthermore, we examined the genomic structure of human caldesmon; the caldesmon gene is mapped to a single locus, 7q33-q34 and caldesmon isoforms are generated by alternative splicing.

4. The expressed amounts of both calspectin and α -actinin were increased in rat brains during the period of synaptic formation. Both proteins were localized in the Triton X-100 insoluble part of the P2 fraction enriched synapses.

5. We found that synapsin I could be a main element of short linkages between actin filaments and synaptic vesicles, and between microtubules and synaptic vesicles using the quick freeze and deep etching method and immuno-electromicroscopy. From these results, we hypothesize that synapsin I causes the storage of synaptic vesicles by linkage between synaptic vesicles

and pre-synaptic actin net work.

6. Using the quick freeze and deep etching method, we identified that calpactin I connected the chromaffin granules to plasma membranes of adrenal medulla cells during exocytosis.

研究目的

神経回路網形成の最も重要なステップはシナプス形成である。シナプスは神経突起伸長端の成長円錐を原基として形成されるため、神経ネットワーク形成は成長円錐の神経細胞選択性によって決定されるといっても過言ではない。最近の研究から、成長円錐は活発な運動性を伴い、神経細胞の選択性とシナプス形成に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。この活発な運動性は、主にアクチン系細胞骨格によってもたらされ、また、神経細胞間の認識は細胞接着因子と細胞膜骨格蛋白質によって制御されていると考えられる。

我々の研究室では、これまでCa²⁺による細胞内情報伝達系の研究を端緒として、細胞骨格系のCa²⁺依存性制御機構の解析を行ってきた。この中で、一連の細胞骨格制御蛋白質の発見あるいは同定を行い、細胞骨格のCa²⁺依存性制御機構の本態についての知見を集積してきた。このような研究の基盤に立ち、本研究ではシナプスの形成に関与する細胞膜骨格蛋白質の発現変化・分子構築並びに各骨格蛋白質間の制御機構を追究し、また収縮関連蛋白質のシナプス形成期における役割を分子生物学的手法を用いて解析することを目的とする。

研究経過

1. 神経成長円錐における膜骨格蛋白質と pp60^{c-src} の局在

神経回路網形成は、神経細胞の分化から始まり、神経突起伸展、神経突起間または突起-細胞体間の接合によるシナプス形成により完成される。我々は、神経突起が伸展しシナプス形成に至るまでの過程に注目し、膜骨格蛋白質（カルスベクチン・ α -アクチニン・アクチン）、src 遺伝子産物 (pp60^{c-src}) について PC12 細胞の成長円錐における局在を詳細に検討した。その結果、カルスベク

チンと Ca²⁺ 非感受性 α -アクチニンおよび pp60^{c-src} は成長円錐体部（基質接着部）に、Ca²⁺ 感受性 α -アクチニンとアクチンは filopodia に局在することを見いだした。したがって、成長円錐の細胞または基質接着性にカルスベクチン・Ca²⁺ 非感受性 α -アクチニン・pp60^{c-src} が、filopodia の運動性には Ca²⁺ 感受性 α -アクチニンとアクチンが関与しているものと考えられる。更に、v-src によって形質転換させた細胞が基質接着面に有する動的接着部の細胞膜骨格の分子構築が、成長円錐の基質接着部と認めて類似していることを明らかにした（図1）。

2. カルスベクチン（スペクトリン）・4.1 蛋白質・アクチン間相互作用の Ca²⁺/CaM 依存性制御

シナプス接合部に存在する膜骨格構成員として、カルスベクチン（スペクトリン）・4.1 蛋白質・ α -アクチニンとアクチンが同定されている。我々は、これらの蛋白質間の相互作用を検討し、カルスベクチン（スペクトリン）・4.1 蛋白質・アクチン間相互作用が Ca²⁺/CaM 依存性に制御されていることを見いだした。すなわち、低濃度の Ca²⁺ 条件下ではカルモデュリンは不活性型のままである。この時、4.1 蛋白質はカルスベクチン（スペクトリン）-アクチン相互作用を促進し、安定した細胞膜裏打ち構造を形成する。一方、Ca²⁺ が 10⁻⁶ M 以上に増加すると活性化型カルモデュリンは 4.1 蛋白質の機能を抑制し、カルスベクチン（スペクトリン）-アクチン相互作用が消失し、細胞膜裏打ち構造のダイナミクスが発揮される。膜骨格のこのような Ca²⁺ 制御が、いかなるシナプス機能に対応するかはいまのところ判然としていないが、シナプス後部レセプターの機能制御を行っている可能性が強い。

3. 脳由来の l-カルデスモンの 1 次構造と機能ドメインの決定及びカルデスモン遺伝子の構

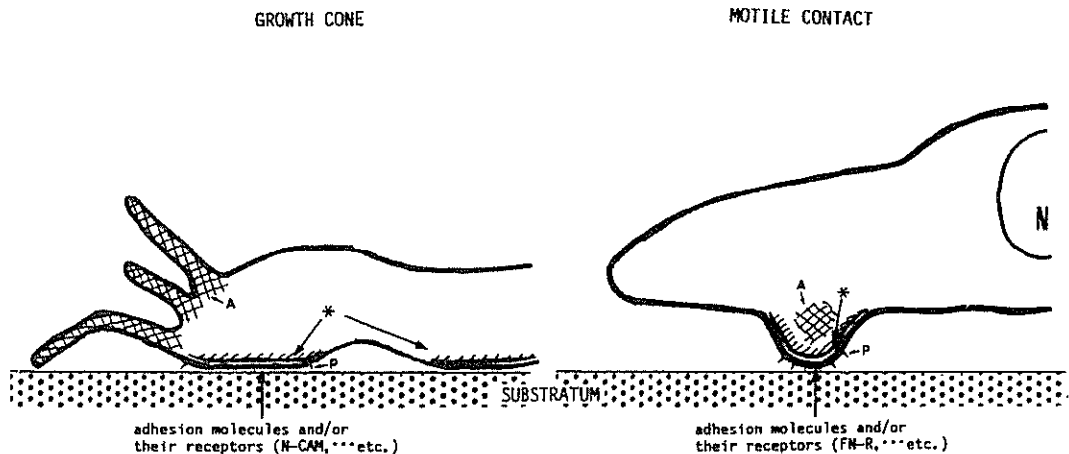


図1. 神経成長円錐 (growth cone) と形質転換細胞に出現する動的接着部 (motile contact) の分子構築の比較。両者はともに、豊富なアクチンフィラメントのネットワーク (A) を有し活発に運動する。接着部の膜骨格蛋白質 (*) として α -アクチニン、カルスベクチンや src 遺伝子産物が局在しており、蛋白質分解酵素 (P) を放出しながら基質に浸潤していく。

造解析

我々は、中枢神経系のアクチン関連蛋白質がシナプス形成においていかなる意義を有しているかを明らかにするためにいくつかの研究を展開しているが、そのひとつとして脳カルデスモンの分子生物学的研究を開始した。ニワトリ脳由来の *l*-カルデスモン cDNA のヌクレオチド配列より *l*-カルデスモンの 1 次構造を推定した。*l*-カルデスモンは、571 アミノ酸残基からなり、分子量は 58,844 と計算された。ニワトリ平滑筋では蛋白質レベル *h*-および *l*-カルデスモンの 2 種類が発現している。一方、脳では *l*-カルデスモンが優先的に発現していた。ノーザンブロット法でも、脳においては *l*-カルデスモンをコードする 4.1 kb の mRNA のみが検出された。また、各種欠損カルデスモンを発現させ、*l*-カルデスモン分子中の機能ドメインを検討した。その結果、*l*-カルデスモンの C 末端近辺の約 50 アミノ酸が、*l*-カルデスモンの最少機能ドメインであることを見いだした。またニワトリ平滑筋由来の *h*-カルデスモンは中間部にグルタミン酸に富んだ配列を基本構造とする繰り返しの構造が存在するが、カルデスモンの機能に直接関与する C 末端側の構造は *l*-カルデスモンと同等であった。またヒト培養細胞

(HeLa) 由来の *l*-カルデスモンの cDNA クローニングを行い、その構造を解析した。さらに *h*-及び *l*-カルデスモン異性体がどのような機作で発現制御されているかを解析するため、まずカルデスモン遺伝子構造の解析を行った。この結果、ヒトカルデスモン遺伝子は少なくとも 14 の exon から構成され、alternative splicing により *h*-及び *l*-カルデスモン mRNA が生合成されることが判明した。またヒトカルデスモン遺伝子は 7q33-q34 に局在することも明らかにした。

4. ラット脳膜骨格蛋白質の成長に伴う変動

我々はシナプス形成期における膜骨格蛋白質の発現変化を検討した。膜骨格蛋白質として、カルスベクチン・ α -アクチニンとアクチンを対象とした。胎生 18 日目から 6 カ月齢までのラット脳総ホモジネートを調製した各蛋白質の発現量を検討し、カルスベクチン、 α -アクチニンは発達に伴い著明に増加することを見いだした。一方、アクチンは脳発達の各時期を通じほとんど変化がみられなかった。さらに、カルスベクチンと α -アクチニンについて細胞下分画における分布を検討した。両者が豊富に存在する P2 分画を Triton X-100 可溶性および不溶性分画に分けて検討した。その結果、カルスベクチンと α -アクチニンは P2-

Triton X-100 不溶性分画 (膜骨格分画) に大部分が存在していた。またこの分画においても、両蛋白質とアクチンは生後 1-3 週目の時期に著増していた。

5. 神経伝達物質放出過程におけるシナプシン I の関与

我々は、シナプス前部に特異的に存在するシナプシン I がアクチン、チュブリン、スペクトリン (カルスペクチン) と結合することを見いだしていた。更に、我々はシナプシン I がどのような様式でシナプス小胞放出に関わっているかを明らかにするために、急速凍結ディープエッチング法による電子顕微鏡と免疫電子顕微鏡法を組み合わせ、シナプス前部におけるシナプシン I の存在様式について検討した。その結果、シナプス前部に存在するアクチンバリアーとシナプス小胞とを架橋する蛋白質がシナプシン I であることを明らかにした。また、生化学的知見と一致するようにシナプシン I は、シナプス小胞と微小管との架橋にも関与していた。これらのことから、シナプス小胞の貯留は、主にシナプス前部のアクチンネットワーク (一部微小管を含む) とシナプス小胞がシナプシン I を介して結合するためであることを判明した。

6. カルパクチン I のエクソサイトーシスにおける役割

アネキシンファミリーに属する蛋白質 (シネキシンやカルエレクトリン) が Ca^{2+} 濃度に依存して副腎髄質の分泌顆粒であるクロマフィン顆粒間の融合を促進することが知られていた。我々は、同じアネキシンファミリーに属するカルパクチン I に着目し、培養副腎髄質細胞のエクソサイトーシスにおける役割を急速凍結エッチング法や免疫電顕法、あるいは *in vitro* で再構成実験を行い検討した。その結果、カルパクチン I はクロマフィン顆粒と副腎髄質細胞膜間を架橋していることを見いだした。すなわち、エクソサイトーシスにおける分泌顆粒と細胞膜の結合・融合・開口放出のうち、結合のステップにカルパクチン I が関わっていることになる。更に、最近中枢神経系において同じアネキシンファミリーに属する 68 kDa 蛋

白質が神経伝達物質放出に関わっていることを証明しつつある。

研究成果

1. 神経成長円錐の基質接着部にはカルスペクチン、pp60^{c-src} および Ca^{2+} 非感受性 α -アクチニンが、filopodia には Ca^{2+} 感受性 α -アクチニンとアクチンが局在していた。

2. カルスペクチンあるいはその近縁蛋白質であるスペクトリン・4.1 蛋白質・アクチン間相互作用が、 Ca^{2+}/CaM により制御されていることを見いだした。

3. ニワトリ脳由来の cDNA ライブラリーから、アクトミオシン系調節因子である *l*-カルデスモンの 1 次構造解析と機能ドメインの決定を行った。その結果、*l*-カルデスモンは、571 アミノ酸残基からなる分子量 58,844 と計算される蛋白質であり、C 末端側の約 50 アミノ酸が最小機能ドメインであることを明らかにした。またニワトリ平滑筋由来の *h*-カルデスモン及びヒト培養細胞 (HeLe) 由来の *l*-カルデスモンの cDNA クローニングを行い、その構造を解析した。さらにヒトカルデスモン遺伝子は 7q33-q34 に局在し、*h*-及び *l*-カルデスモン異性体は同一遺伝子由来の転写物が alternative splicing を受けることによって生成されることを明らかにした。

4. ラット脳発達過程において、カルスペクチンと α -アクチニンがシナプス形成期に一致して発現量が増大し、両蛋白質は細胞下分画法によりシナプスを含む P2 分画の膜骨格に優先的に移行することを明らかにした。

5. シナプス前部におけるシナプス小胞の貯留は、シナプシン I がシナプス小胞をアクチンネットワークまたは微小管に架橋させることによってもたらされていることを明らかにした。

6. 培養副腎髄質細胞の急速凍結ディープエッチング像から、カルパクチン I がクロム親和性顆粒と副腎髄質細胞膜間の架橋蛋白質であることを見いだした。

今後の課題と発展

我々の当面の目標は、シナプス形成におけるアクチン関連蛋白質ならびに膜骨格蛋白質の意義を

明らかにすることである。そのために以下のような研究を計画または進行させている。

①成長円錐の活発な運動性や接着性に関わっているとみられる膜骨格および収縮系蛋白質の分子構築と制御機作を、生化学・形態学・分子生物学的手法により検討する。

②シナプス構成蛋白質のうち主要なもののいくつかは確認されているが、なお未知なものが存在している。それらの蛋白質の分離精製とその機能解析をめざす。

③神経伝達物質放出を含めたエクソサイトーシスにおける分子機作の解明をめざす。エクソサイトーシスに参与する新たな蛋白質の発見と、エクソサイトーシスへの細胞骨格系の関与を生化学および細胞生物学的に追究する。

発表文献リスト

- 1) Sobue, K., Fujio, Y. and Kanda, K.: A tumor promoter induces a reorganization of actin filaments and caldesmon (fodrin or nonerythroid spectrin) in 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 482-486 (1988).
- 2) Minowa, O., Yazawa, M., Sobue, K., Itoh, K. and Yagi, K.: Calmodulin fragments can not activate target enzymes. *J. Biochem.*, 103, 531-536 (1988).
- 3) Sobue, K., Kanda, K., Tanaka, T. and Ueki, N.: Caldesmon: A common actin-linked regulatory protein in the smooth muscle and non-muscle contractile system. *J. Cell. Biochem.*, 37, 317-325 (1988).
- 4) Tsumoto, T., Sato, H. and Sobue, K.: Immunohistochemical localization of a membrane-associated, 4.1-like protein in the rat visual cortex during postnatal development. *J. Comp. Neurol.* 271, 30-43 (1988).
- 5) Sobue, K. and Kanda, K.: Localization of pp 60^{src} in growth cone of PC12 cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 157, 1383-1389 (1988).
- 6) Tsumoto, T., Kimura, F., Hagihara, K., Sato, H. and Sobue, K.: A role of NMDA receptors and membrane-associated, Ca²⁺/calmodulin-binding proteins in synaptic plasticity in the developing visual cortex. *Biomed. Res.*, 9, 43-52 (1988).
- 7) Hirokawa, N., Sobue, K., Kanda, K., Harada, A. and Yorifuji, H.: The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin I. *J. Cell Biol.* 108, 111-126 (1989).
- 8) Sobue, K., Kanda, K., Miyamoto, I., Iida, K., Yahara, I., Hirai, R. and Hiragun, A.: Comparison of the regional distribution of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin), α -actinin, vinculin nonerythroid protein 4.1, and calpactin in normal and avian sarcoma virus- or rous sarcoma virus-induced transformed cells. *Exp. Cell Res.*, 181, 256-262 (1989).
- 9) Yorifuji, H., Kanda, K., Sobue, K. and Hirokawa, N.: Localization of 4.1 related proteins in cerebellar neurons. *Eur. J. Cell Biol.*, 48, 104-115 (1989).
- 10) Hayashi, K., Yamada, S., Kanda, K., Kimizuka, F., Kato, I. and Sobue, K.: 35 kDa fragment of h-caldesmon conserves two consensus sequences of the tropomyosin-binding domain in troponin T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 161, 38-45 (1989).
- 11) Hoshimaru, M., Fujio, Y., Sobue, K., Sugimoto, T. and Nakanishi, S.: Immunochemical evidence that myosin I heavy chain-like protein is identical to the 110-kilodalton brushborder protein. *J. Biochem.*, 106, 455-459 (1989).
- 12) Sobue, K. and Kanda, K.: α -Actinins, caldesmon (brain spectrin or fodrin) and actin participate in adhesion and movement of growth cones. *Neuron* 3, 311-319 (1989).
- 13) Senda, T., Fujita, H., Ban, T., Zhong, C., Ishimura, K., Kanda, K. and Sobue, K.: Ultrastructural and immunocytochemical studies on the cytoskeleton in the anterior pituitary of rats, with special regard to the relationship between actin filaments and secretory granules. *Cell Tissue Res.*, 258, 25-30 (1989).
- 14) Hayashi, K., Kanda, K., Kimizuka, F., Kato, I. and Sobue, K.: Primary structure and functional expression of h-caldesmon complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164, 503-511 (1989).
- 15) Sobue, K. and Fujio, Y.: Significance of two different Mr caldesmons. in Calcium Protein Signaling (Adv. Exp. Med. Biol. vol. 255) (Hidaka, H., Carafoli, E., Means, A. R., and Tanaka, T. eds.) Plenum Publishing Corporation, pp. 325-335 (1989).
- 16) Tanaka, T., Ohta, H., Kanda, K., Tanaka, T., Hidaka, H. and Sobue, K.: Phosphorylation of high-Mr caldesmons by protein kinase C modulates the regulatory function of this protein on the interaction between actin and myosin. *Eur. J. Biochem.*, 188, 495-500 (1990).
- 17) Nakata, T., Sobue, K. and Hirokawa, N.: Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as rev-

- ealed by quick-freeze, deep-etch, electron microscopy and immunocytochemistry. *J. Cell Biol.*, **110**, 13-25 (1990).
- 18) Sobue, K.: Involvement of the membrane cytoskeletal proteins and the src gene product in growth cone adhesion and movement. *Neurosci. Res. Suppl.*, **13**, S80-S91 (1990).
 - 19) Harada, A., Sobue, K. and Hirokawa, N.: Developmental changes of synapsin I subcellular localization in rat cerebellar neurons. *Cell Struc. Func.*, **15**, 329-342 (1990).
 - 20) Hayashi, K., Fujio, Y., Kato, I. and Sobue, K.: Structural and functional relationships between h- and l-caldesmons. *J. Biol. Chem.*, **266**, 355-361 (1991).
 - 21) Tanaka, T., Kadowaki, K., Lazarides, E. and Sobue, K.: Ca^{2+} -Dependent of the spectrin/actin interaction by calmodulin and protein 4.1. *J. Biol. Chem.*, **266**, 1134-1140 (1991).
 - 22) Sobue, K. and James R. Sellers: A novel-regulatory protein of smooth muscle and non-muscle actin-myosin interaction. *J. Biol. Chem.*, **266**, 12115-12118 (1991).
 - 23) Kitagawa, K., Matsumoto, M., Sobue, K., Tagawa, M., Okabe, T., Niinobe, M., Ohtsuki, T., Handa, N., Kimura, K., Mikoshiba, K. and Kamada, T.: The synapsin I brain distribution in ischemia. *Neuroscience*, **46**, 287-299 (1992).
 - 24) Hayasi, K., Yano, H., Hashida, T., Takeuchi, R., Takebe, O., Asada, K., Takahashi, E., Kato, I. and Sobue, K.: Unique genomic structure of human caldesmon gene. *Proc. Natl. Acad. Prec. USA* (1992).
 - 25) Tanaka, J., Watanabe, T., Nakamura, N. and Sobue, K.: Morphological and biochemical analyses of contractile proteins (actin, myosin, caldesmon and tropomyosin) in normal and transformed cell. *J. cell Sci.* (1993) (in press).