

新しい神経細胞膜特異蛋白質の機能の解析

Analysis on the function of a new neuronal membrane specific-protein

代表研究者 杏林大学医学部生理学講座教授 赤川 公 朗
Assoc. Prof., Dept. of Physiology, School of Medicine, Kyorin Univ.
Kimio AKAGAWA

協同研究者 杏林大学医学部生理学講座助教授 山口 和 彦
Assoc. Prof., Dept. of Physiology, School of Medicine, Kyorin Univ.
Kazuhiko YAMAGUCHI

A novel neuronal membrane-specific protein, HPC-1, is present throughout the central and peripheral nervous systems in various species of vertebrates and invertebrates. We have already cloned and sequenced HPC-1. With electronmicroscopic studies, it was found that HPC-1 was present on the plasma membrane of neuronal axons and terminals, most of which molecule was extruded in the intracellular side. We also found that its deduced amino acid sequence was homologous to Epimorphin which was an essential factor for epithelial morphogenesis. In order to study the precise physiological function of HPC-1 in the nervous system, we investigated the effect of the antisense oligonucleotide (AS) to HPC-1 mRNA *in vitro*. It was well known that the antisense oligonucleotides were taken up into cultured cells to suppress synthesis of the target protein. Dissociated neurons from adult rat dorsal root ganglion were cultured with AS for this purpose. As they regenerate new processes during cultures for 2 days, they tended to make more branchings compared to those of control. These results suggested that sprouting phenomenon occurred *in vitro* by the addition of AS. Then, we studied the effect of microinjection of the antibody against HPC-1 into cultured neurons. When the antibody was injected into the cultured chick ganglion cells of retina, many new branchings, sprouting, occurred on the axons within 20 minutes after microinjection as well as the case of AS experiments. These results demonstrated that HPC-1 antigen which was present mainly on axons of neurons in adult animals might suppress the sprouting of processes under the physiological condition and that if HPC-1 could be suppressed, sprouting might begin. Accordingly, it is likely that HPC-1 antigen may be involved in the neuronal plasticity.

研究目的

神経系は他の組織に比較して多様性に富み高度に分化している。この特殊化した神経組織の機能や形態形成に関与する基本的原理を理解する上で、それを構成する各々の神経細胞種やグリア細胞の有する神経系特異的機能分子を知ることが必要であると思われる。この観点から、今までにも多くの機能分子が同定されてはきているが、まだ不十分と言わざるを得ない。その理由の一つは神経組織にあると予想される機能分子の多くが、その分子的多様性のゆえに、生化学的方法では分離

同定が困難であったためと考えられる。一方、モノクローン抗体法を利用すれば、特定の細胞種或いは組織に存在する微量、かつ、未知の特異的抗原分子を検出することが可能であり、我々も従来よりこの方法を用いて、多くの神経系特異抗原を見いだしてきた。その一つとしてモノクローン抗体 HPC-1 の認識する抗原 (以下 HPC-1) がある。HPC-1 抗原は、元来、ラット海馬の膜分画に対して作製されたモノクローン抗体の認識する神経特異的蛋白質として見いだされた。HPC とは海馬 hippocampus の頭文字である。免疫組織化学上



図1. HPC-1/syntaxin(p35s)/epimorphin ファミリーのエピモルフィンファミリーのモロロジー比較。

上から順にウシHPC-1, ラットHPC-1(p35A), p35B, epimorphinの推定アミノ酸配列を並べた。陰影部は保存されたアミノ酸, 点はウシHPC-1と同じアミノ酸からなることを示す。

は stratum radiatum が強く認識されていて、歯状回からの線維投射も染るので顆粒細胞軸索と強く反応していると思われた。SDS 電気泳動上では、分子量約 35 K を示し、膜分画に強く結合している蛋白質であると予想された。このモノクローン抗体は海馬特異的な抗原の探索を目的とした所謂ショットガン方式により得られたものであったが、認識する抗原蛋白質は海馬のみならず成熟ラットの神経系全体に広範に存在することが分かった。HPC-1 は多くの種の神経細胞形質膜に分布しているが、その分子の実体は不明であった。最近、分子生物学的研究から、これが神経細胞膜上に局在する全く新しい膜蛋白であり、神経組織の発生期における HPC-1 の出現時期から、神経組織の構築に関与する分子と予想されるに至った。本研究は、このような背景を有する HPC-1 の神経系における機能を、細胞生物学的、分子生物学的に解析することにより、統合された中枢神経におけるこの膜蛋白の有する生理的意義を明らかにしようとするものである。

研究経過

HPC-1 の構造とそのホモログの存在

我々はこの HPC-1 をラット海馬 cDNA ライブラリーよりクローニングしてその構造を推定した(図1)。当初、既知の蛋白質とのホモロジーは見いだされなかった。ところが、我々の論文(2)が発表されるとほぼ同時に発表されたエピモルフィン(EPN)という蛋白質が類似性を有することが明らかとなった(図1)。EPN がマウス胎児の未分化上皮組織に働きかけるのに比して、HPC-1 は成熟した神経系にだけ存在する。免疫電顕の結果、HPC-1 は神経細胞体、軸索およびシナプス前膜に局限して存在し、樹状突起膜には全く認められなかった(論文印刷中)。HPC-1 と EPN は各々、異なる遺伝子から発現された新しいファミリーに属すると考えられた。HPC-1 は細胞内蛋白質として神経細胞の形質膜直下に存在することが金コロイドを用いた免疫電顕の結果明らかとなった。やや遅れて Bennett らは神経細胞のシナプス前膜に多く存在する膜蛋白質 syntaxin(p35)を報告したがこのアイソフォームの1種が HPC-1

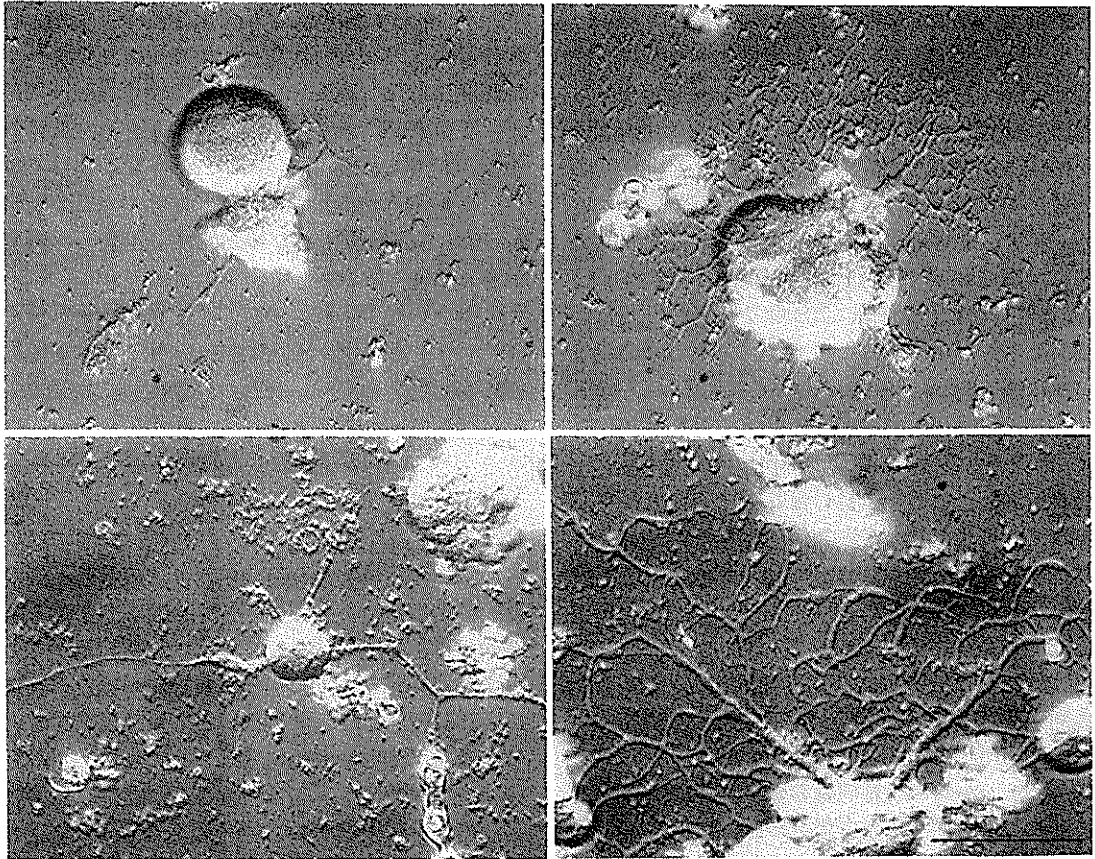


図2. アンチセンスオリゴヌクレオチド(AS)による発芽様現象の促進。

2ヵ月齢ラットより得た脊髄後根神経節細胞の培養系に HPC-1 mRNA の翻訳開始領域付近に対する合成 AS を添加した。左上: コントロール (培養 24 時間後), タウ蛋白の SS (RT18) 添加, 左下: コントロール (48 時間後), 右上: 15 μ M AS 投与 (24 時間後), 右下: AS (48 時間後) AS 添加培養細胞では細かい分岐が増えている。バー=50 μ m。

と同一であることが判明した (図 1)。HPC-1 分子の神経系における機能は不明であったが, 上皮形態形成促進因子と構造類似性を有する特異蛋白質が成熟した神経系に存在していることは発生生物学的に興味を呼んだ。そこで我々は HPC-1 が神経系の形態形成に何らかの関連をもつものではないかと予想して以下の実験を行うこととなった。

実験結果

(I) アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドによる HPC-1 の合成阻害実験

上記の目的のために, 我々は培養神経細胞を用いて HPC-1 の合成阻害を試みて細胞の形態学的

な変化の観察を行うこととした。このために HPC-1 mRNA に対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド (AS) 法が用いられた。培養細胞では特定の蛋白質の mRNA に対する AS を高濃度に外液中に加えることにより細胞内に AS が浸透し, 特異的に mRNA と結合して, その蛋白質の De Novo 合成が抑えられるとする報告が多く出されている。我々は HPC-1 でもこの方法を取ることにした。このためには HPC-1 を発現している成熟した神経系を培養しなければならなかった。しかも AS を投与するためには無血清培養液中での分散培養が可能であるという条件が要求された。2ヵ月齢ラットの脊髄後根神経節細胞でこ

れに合う培養法が確立されていたので、その系を利用した。この結果、ASを与えた培養神経細胞群ではコントロール群に比べて、培養24~36時間後には多くの非常に細い分岐を有する neurite が形成されてきた(図2)。我々はこれをさらに定量化して測定するために画像処理装置を使用した。多数の培養細胞像を画像処理装置に取り込ませ、画像上に見られる神経突起の長さを測定して、統計処理した結果、AS群では2倍以上の全長があることが分かった。特記すべきことはASが単に個々の neurite 長を伸すのではなく、細胞体、神経線維からの細突起の分岐を促していること、言い換えると neurite の sprouting (発芽)を引き起こしたために全長の合計が増加したと考えられた。この結果は HPC-1 の蛋白質合成阻害は脊髄後根神経節細胞において発芽現象を促進させることが示された。

(2) 特異抗体の軸索内投与

次に我々は抗 HPC-1 抗体の細胞内投与による機能阻害実験を試みた。ニワトリ胚の網膜 explant culture 系では axotomy を行うと1時間以内に断端からの成長円錐の再生と突起伸長を観察することができるので再生の研究には有用な系である。HPC-1 は主に軸索から神経終末にかけての形質膜上に存在するので、この系を利用して抗体の軸索内投与を行い、その再生に及ぼす効果を検討した。このために次のような方法を我々は考案した。①先端径0.2~3 μ mほどの微小ガラスピペットに高濃度の抗体を詰めておき、連続的に少量ずつ先端より圧放出しておく。②顕微鏡下でそのピペット先端で神経節細胞の axotomy を行うと、断端周囲には高濃度の抗体が充満しているので、少量の抗体は切断端より軸索内に入ると考えられる。③その後、タイムラプスビデオで連続して顕微鏡撮影して再生した軸索を観察した。抗体が実際に軸索内に流入したか否かは抗体とともに蛍光ラベルした BSA を混ぜておき、後でその細胞が蛍光ラベルされているか否かで判断した。その結果、ポリクロン抗体(ウサギ抗血清)を軸索内投与した場合、通常は見られる成長円錐の再生が見られないこと、切断端より近位側の軸索では

活発な sprouting が生ずることが観察された。この現象は投与後20分ぐらいから観察され始め、数時間にわたり認められた。非免疫正常血清或いは、合成部分ペプチドに対するモノクロン抗体単独投与ではこのような現象を認めることはできず、成長円錐も再生した。したがって、この現象は HPC-1 抗血清により特異的に引き起こされていると考えられた。

これらの結果より、少なくとも脊髄後根神経節細胞および網膜神経節細胞では HPC-1 の機能的阻害が形態的な変化、とりわけ細胞体や軸索での神経発芽様現象を引き起こすことが分かった。つまり HPC-1 分子は成熟した神経細胞内での発芽を抑制的に制御しているものと推定された。

今後の課題と発展

以上に述べたように、成熟ラットの脊髄後根神経節細胞を用いた実験で、神経発芽を引き起こす機構が存在しているらしいことは注目に値する。従来は、発育過程では神経成長を促す種々の機構により線維の分岐、伸張が起こるが、成熟するとこの能力が小さくなると考えられていた。しかし我々の実験結果から言えることは、成熟した動物より得た神経細胞でも神経線維の再生、発芽能力は失われておらず、むしろ新たな神経発芽を細胞内より抑制している機構があるらしいことが示唆された。細胞外から働きかけて神経線維の成長や突起形成を促進させる因子群がたくさん報告されているが、それらがどのような細胞内機構を介して作用しているのかほとんど知られていない。細胞外からのシグナルが細胞膜受容体を経て、最終的にこの形質膜蛋白質 HPC-1 に関係した抑制機構に伝達され脱抑制が生じていることも十分に考えられ得る。現在、この突起形成抑制機構の実体については全く不明であるが、最近 HPC-1 がカルシウムチャンネルと結合しているという報告が他の研究グループより出されており興味を引く。また HPC-1 と EPN が非常に似た分子であることを考えると、両者は形態形成に関して同じような機序により作用している可能性が高い。これらに関しては今後の検討が必要とされよう。

一般に神経系における形態変化, とくに発芽 (sprouting) とそれに引き続く新しいシナプス形成は神経系の可塑性変化の基盤をなすと想像されている。神経可塑性が学習や記憶の分子機構を担っているとする考え方があるのは衆知のとおりである。したがって, 今まで述べたように HPC-1 が神経細胞の発芽現象に関与しているということは, 言い換えるとこれがある種の神経可塑性制御機構に関わっている可能性を示唆する。この意味で海馬長期増強やキンドリング現象のような記憶のモデルシステムにおける可塑的变化と HPC-1 の関連を調べることは興味もたれる。HPC-1 分子の解析はつい最近始まったばかりであるが, 神経発芽や形態形成に関連して急速に興味ある知見が蓄積されつつあり, 近い将来の発展が期待される。

発表論文リスト

- 1) 赤川公朗, 山口和彦, 中山 孝ほか: 神経細胞形質膜蛋白質 HPC-1 の機能解析, *神経化学*, **31**, 150-151 (1992).
- 2) Inoue, A., Obata, K. and Akagawa, K.: Cloning and sequence analysis of cDNA for a neuronal cell membrane antigen, HPC-1. *J. Biol. Chem.*, **267**, 10613-10619 (1992).
- 3) Inoue, A. and Akagawa, K.: Neuron-specific antigen HPC-1 from bovine brain reveals strong homology to epimorphin, an essential factor involved in epithelial morphogenesis: Identification of a novel protein family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **187**, 1144-1150 (1992).
- 4) Inoue, A. and Akagawa K.: Neuron-specific expression of a membrane protein, HPC-1: tissue distribution, and cellular and subcellular localization of immunoreactivity and mRNA. *Mol. Brain Res.*, **19**, 121-128 (1993).
- 5) 赤川公朗: 神経細胞の形態変化を制御する神経特異的蛋白質 HPC-1. *神経精神薬理*, **15**, 93-98 (1993).
- 6) 赤川公朗, 山口和彦, 中山 孝, 井上明宏: 神経特異抗原 HPC-1 は神経発芽に関係する. *生体の科学*, **44**, 166-168 (1993).
- 7) 赤川公朗: 神経発芽を制御する蛋白質 HPC-1. 実験医学「神経系の発生・分化と可塑性」特集号, **11**, 1259-1264 (1993).