

## プロサポシン (スフィンゴ脂質活性化蛋白質前駆体) の神経細胞分化能

### Neurotrophic effect of sphingolipid activator precursor, prosaposin

代表研究者	愛媛大学医学部附属病院講師 Assist. Prof., School of Medicine, Ehime Univ. Hospital Akira SANO	佐野 輝
協同研究者	愛媛大学医学部助手 Assist. Prof., School of Medicine, Ehime Univ. Keiji KONDOH	近藤 啓次
	愛媛大学医学部教授 Prof., School of Medicine, Ehime Univ. Yasuo KAKIMOTO	柿本 泰男
	愛媛大学医学部助教授 Assoc. Prof., School of Medicine, Ehime Univ. Seiji MATSUDA	松田 正司
	愛媛大学医学部教授 Prof., School of Medicine, Ehime Univ. Masahiro SAKANAKA	阪中 雅広

Prosaposin is the precursor for saposins A, B, C and D, which are small lysosomal proteins required for the hydrolysis of sphingolipids by specific lysosomal hydrolases. With a mono-specific anti-saposin C antibody which crossreacts with prosaposin but not with saposin A, B or D, the present immunoblot experiments showed that the rat brain expresses an unprocessed ~72-kDa protein (possibly prosaposin) and little saposin C. Regional analysis demonstrated that prosaposin is abundant in the brainstem, hypothalamus, cerebellum, striatum and hippocampus, and less abundant in the cerebral cortex. Consistent with this finding, prosaposin-like immunoreactive neurons and fibers as revealed by immunohistochemistry were observed frequently in subcortical regions. The medial septum, diagonal bands, basal nucleus of Meynert, ventral striatum, medial habenular nucleus and motor nuclei of cranial nerve, which are known to contain cholinergic neurons, had significant numbers of immunoreactive neurons. There were also nerve fibers with prosaposin-like immunoreactivity in several projection fields of the above nuclei, suggesting that prosaposin is anterogradely transported in certain neuronal circuits. Other brain areas that contained prosaposin-like immunoreactive neurons and/or processes were several brain nuclei (nucleus caudate putamen, globus pallidus, substantia nigra, red nucleus) constituting the so-called extrapyramidal system, reticular thalamic nucleus, entopeduncular nucleus, mammillary nuclei, auditory relay nuclei, cerebellum, cranial nerve nuclei transmitting a variety of sensations and the reticular formation at different levels. These results, together with the previous finding that prosaposin is secreted from cells in the brain and present in the cerebrospinal fluid, suggest that prosaposin as a possible neurotransmitter or neuromodulator is involved in a variety of central events in discrete neuronal pathways as well as generating saposins by way of proteolysis in some peripheral tissues.

## 研究目的

細胞膜に存在する糖脂質は細胞周期、増殖、分化などに伴い量的質的に劇的に変化し、細胞表面での認識機構やレセプター機能に重要な役割を果たしている。この糖脂質の代謝にかかわる種々の水解酵素の活性制御には活性化蛋白質が関与している。これら活性化蛋白質の一種であるグルコセレブロシダーゼ活性化蛋白質 (Saposin C) は本研究代表者が世界に先駆けて単離し、アミノ酸配列を決定した蛋白質である。この蛋白質の前駆体 (Prosaposin) は、Saposin C をはじめ 4 種の活性化蛋白質をドメインとして持つ高分子蛋白質で、精巣における精子形成の分化過程に trophic factor としての作用を果たすと考えられる硫酸化糖蛋白質-1 (Sulfated Glycoprotein-1; SGP-1) と同一であろうと考えられている。最近、本研究者は Prosaposin が脳や筋肉そして各種分泌液に豊富に含まれることを発見し、Prosaposin が脳の分化の時期に一致して増加することを明らかにした。これらの事実から Prosaposin が神経組織で何らかの trophic factor として機能していることが考えられた。今回我々は、Prosaposin の神経系における機能に関する研究を進めるため、特異抗体を用いた免疫組織化学的手法で脳神経系における Prosaposin の分布を検討した。

## 研究経過

今回の研究に着手する前に、我々は材料として得やすいウシ脾臓を出発材料として Saposin C の精製を行った。得られた Saposin C の全アミノ酸配列は、ヒトおよびモルモットの Saposin C とそれぞれ 76%、65% のホモロジーを持っていた。3 種の Saposin C の疎水性プロフィールは酷似していた。部分水解実験から、アミノ酸残基 35 番付近の親水性の強い部位に近接する領域が酵素  $\beta$ -glucosidase との相互作用に重要な領域であることが示された。このアミノ酸配列上も均一な Saposin C を抗原として家兎に免疫し、得られた抗血清から Saposin C-抗原カラムを用いて monospecific 抗ウシ Saposin C IgG を得た。この抗体を用いて Western blotting による確認作業を指標としてヒト母乳から Prosaposin を精製

単離した。精製法としては遠心による脂質除去、硫酸塩析、イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーの後、抗ウシ Saposin C IgG を固定化したアフィニティークロマトグラフィーで最終精製とした。得られた Prosaposin は電気泳動上も単一で N 端からのアミノ酸配列分析で cDNA から予想される配列が確認された。Prosaposin には酵素  $\beta$ -glucosidase に対する活性化能 (Saposin C 活性) は認められなかったが、Prosaposin をトリプシンで消化すると Western blot で確認される Saposin C に相当するバンドが生じると比例して  $\beta$ -glucosidase に対する活性化能 (Saposin C 活性) が出現した。これらの結果 Prosaposin は 4 種の Saposin をドメインとする高次構造を維持しているが、Saposin C ドメインを外表に露出していない構造を持っていることが示唆された。また 4 種の Saposin を Gaucher 病患者の脾臓から精製し、ヒト保護蛋白質の carboxypeptidase 活性に対する影響を検討した結果、Saposin B が活性を安定化することを見いだした。

次に今回我々は中枢神経系における Prosaposin の生理的機能を明らかにする目的で、免疫組織化学的検討を行った。

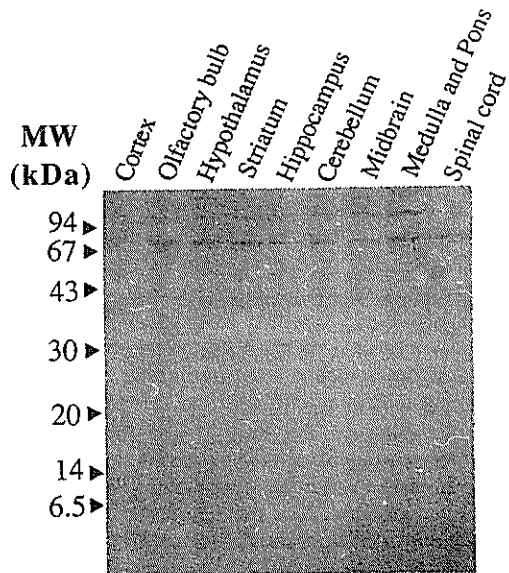


図1. ラット脳部位別 Western blot (20  $\mu$ g/lane).

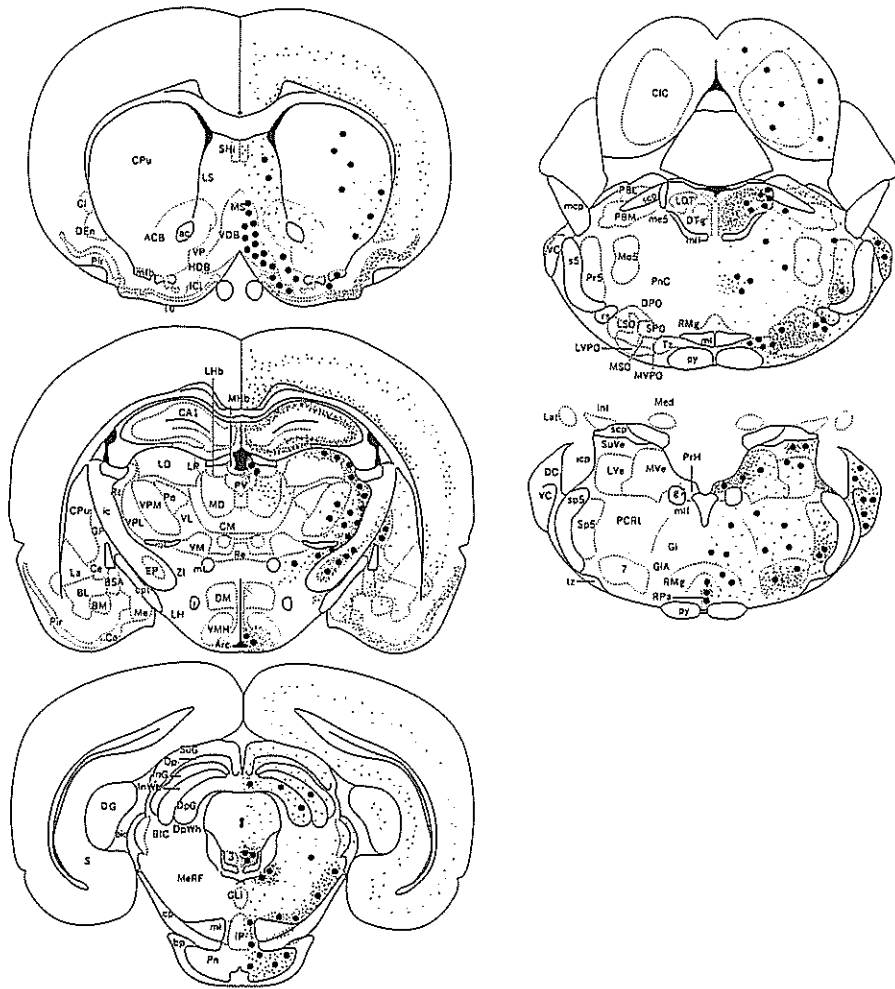


図2. Prosaposin-like immunoreactivity のラット脳内分布。

## 研究成果

[方法] 1) **Western blot** 法: ラット能は, Glowinski and Iversen の方法により分割した後, 10 mM リン酸緩衝液でホモジナイズし, 10000 g×30 min で遠心後の上清を Western blot のサンプルとした。抗体は, 既報のとおりウシ脾臓から精製されたサポシン C を免疫原として家兎に注射して得られた抗血清を抗原カラムを用いて, 精製した。

2) **免疫組織化学**: ラットをペントバルビタール麻酔下, 経心臓的に, Zamboni 液で固定し, 2 日後マイクロスライサーを用いて 50 μm の厚さ

にスライスした。5% normal swine serum (NSS) and 5% BSA in PBS 中にて blocking しさらに, 5% BSA, 1% NSS and 0.25% carrageenan in PBS 中に浸透させた後, 1 μg/ml の濃度の抗体と 1 昼夜 4°C にて反応させ, その後は cobalt-glucose oxidase-diaminobenzidine 法を用いた。

[結果] 1) **Western blot**: ラット脳のどの部位においても Saposin C は検出されなかった (図 1)。約 72 kDa の主なバンドと約 100 kDa のバンドがいくつかの部位に検出された。脳幹, 視床下部, 小脳, 線状体, そして海馬に豊富に見られ,

大脳皮質には、ほとんど見られなかった。

2) 免疫組織化学: 図2に, prosaposin-like immunoreactivity (PS-IR) の分布を示した(ニューロンは●で, 線維は・で示す。)皮質下に多くの反応が見られ, Western blotの結果と一致した。またPS-IRは, 神経細胞体や線維に検出され, グリア細胞には, ほとんど観察されなかった。コリン作動性ニューロンとされる神経核(マイネルトの基底核, 脳神経核など)にはほぼ一致して反応が見られ, 他に網状視床核が特に強く, 小脳Purkinje細胞は細胞体やその突起に陽性の反応が観察された。それらの神経核が投射する部位において, 神経線維が陽性に染色された。聴覚系では, 2次または, 3次ニューロンまでの神経細胞体, 線維が陽性に観察された。

[考察] 約72 kDaのバンドは, ヒト母乳のProsaposinとその分子量は一致し, SGP-1ともほぼ一致しProsaposinと考えられた。約100 kDaのバンドもいくつかの部位で検出されたが, 糖鎖の違いと考えた。ラット脳では, Saposinは検出されない程度の量しか存在せず, そのほとんどが, 前駆体のProsaposinとして存在していた。また, 大脳皮質は他の領域に比べ, 含有量が少なかった。Prosaposinはある種の特定の神経核にのみ存在し, その投射している領域にProsaposin免疫陽性な顆粒が観察されるという免疫組織化学の結果から, 軸索内を細胞体から, ターミナルへと輸送されていることが強く示唆された。また, 海馬でCA 1, 2, 3領域の錐体細胞層の周囲にProsaposin免疫陽性のターミナルが多数検出されたことから, シナプスにおいてProsaposinが分泌される可能性が考えられた。すでに報告したように, 生後ラット脳でProsaposinは増加し, 各種の分泌液, 特に脳脊髄液に多く含

まれている。以上の結果から, 前駆体であるProsaposin自身が生体内とりわけ中枢神経系において, 何らかの生理活性を有すると考えられた。

#### 今後の課題と発展

今回の研究でProsaposinは中枢神経系の特定の神経核の神経細胞に存在し, その投射先に向かって輸送される可能性, また海馬でCA 1, 2, 3領域の錐体細胞層の周囲にProsaposin免疫陽性のターミナルが多数検出されたことから, シナプスで分泌される可能性が考えられた。これらの事実からProsaposinは「特定の細胞で作られ分泌されてターゲットとなる神経細胞に分化・生存のシグナルを与える」という神経栄養因子の定義の前半を満たすことが示された。今後神経栄養因子活性という点から培養系もしくは*in vivo*の実験でProsaposinの神経細胞分化能を検討したい。

#### 発表論文リスト

- 1) Kondoh, K., Sano, A., Kakimoto, Y., Matsuda, S. and Sakanaka, M. (1993): The distribution of neuronal elements with prosaposin-like immunoreactivity in rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **334**, 590-602.
- 2) Kondoh, K., Hineno, T., Sano, A. and Kakimoto, Y. (1991): Isolation and characterization of prosaposin from human milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 286-292.
- 3) Sano, A., Mizuno, T., Kondoh, K., Hineno, T., Ueno, S., Kakimoto, Y. and Morita, N. (1992): Saposin-C from bovine spleen; complete amino acid sequence and relation between the structure and its biological activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1120**, 75-80.
- 4) Itoh, K., Takiyama, N., Kase, R., Kondoh, K., Sano, A., Oshima, A., Sakuraba, H. and Suzuki, Y. (1993): Purification and characterization of human lysosomal protective protein expressed in stably transformed Chinese Hamster Ovary cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 1180-1186.