

神経細胞の形態形成機構へのアプローチ

An approach to the mechanisms for the morphogenesis of neuron.

群馬大学医学部行動分析学部門助手

林 謙介

Research associate. Department of Neurobiology and Behavior

Gunma University School of Medicine

Kensuke Hayashi

The morphological change of dendritic spine of neuron is thought to participate in the mechanisms of synaptic plasticity. We studied in this paper the molecular mechanisms for the change of spine morphology, focusing on a neuron-enriched F-actin binding protein, drebrin. Drebrin was localized at the dendritic spines in telencephalon in rat. It bound to the postsynaptic cytoskeleton. Drebrin-bound cytoskeletal complex was isolated with immunoprecipitation. It contained myosins and gelsolin as well as drebrin and actin. The presence of drebrin reduced the sliding velocity of F-actin on immobilized myosin. It also inhibited the actin-dependent ATPase activity of myosin. These results suggest that drebrin modulates acto-myosin activity within spines and plays a role in structure-based plasticity of synapses.

研究目的

興奮性シナプスの後部構造であるスパインは様々な要因によって形を変える動的な構造である。特に興味深いのは、記憶のメカニズムのモデルとなっているシナプス伝達の長期増強が発生した際に、スパインは大きな形態変化を起こすことである。また、コンピューターシミュレーションによって、スパインの形態変化はスパイン内のカルシウムなどのセカンドメッセンジャーの動態に大きく影響することがわかっている。アクチンフィラメントがスパインの主要な細胞骨格であり、アクチン-ミオシンの相互作用がスパインの形態変化の原動力であると考えられているが、スパインの形態を制御する分子機構はよくわかっていない。

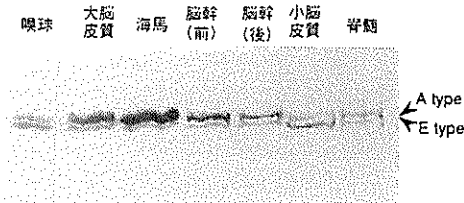
ところで発生過程に脳で一過性に現われ

る蛋白として同定されたドレブリンは、主に次の3つの理由から神経細胞の形態の変化に重要と考えられている。1、神経発生過程で遊走中の神経細胞や樹状突起形成中の樹状突起に、つまり形態変化の激しい時期と場所で強く発現している。2、F-アクチンと強く結合し、トロポミオシン、 α -アクチニンと競合する。3、非神経細胞への強制発現は細胞骨格の動態に大きく影響し、樹状突起様の形態が形成される。

ドレブリンは alternative splicing によって embryo 型から adult 型への isoform 変換を起こす。adult 型は神経細胞特異的と考えられシナプス後部に強く局在している。今研究はスパインの形態制御機構へのドレブリンAの関与を探ることを目的とする。

研究経過

(1) 成体ラットの脳を矢状断に薄切片し抗ドレブリン抗体で染めると、ドレブリンは終脳（嗅球、大脳皮質、海馬、線条体）に多く存在し、他の部域、特に小脳皮質では少なかった。ウェスタンブロットでもその局在性は確認された。

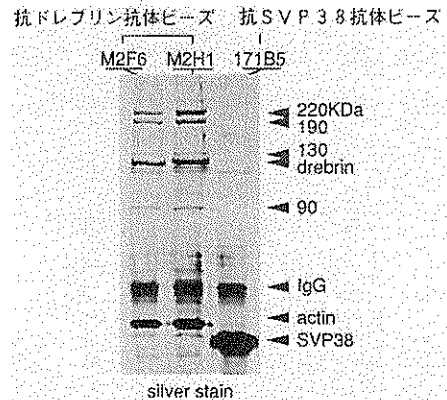


大脳皮質では抗ドレブリン抗体による組織染色像は抗シナプトフィシン抗体による染色と極めて類似し、シナプスの分布を思わせる顆粒状を呈する。共焦点レーザー顕微鏡によるシナプトフィシンとの重染色の観察およびポストエンベディング法による免疫電顕により、ドレブリンはシナプスの後部側、つまりスパイン中に局在していることがわかった。

(2) ドレブリンは成体の脳からは界面活性剤で溶出されなかったため、生体内で細胞骨格に結合しているものと考えられた。シナプトソームを蔗糖密度勾配により調製しアガロースゲルに包埋した後、抗ドレブリン抗体で染色し電子顕微鏡で観察したところ、ドレブリンがシナプス後部の細胞骨格に結合しているらしい像がみられた。

(3) ドレブリンの結合している細胞骨格の構成成分を知るために、大脳皮質の1%

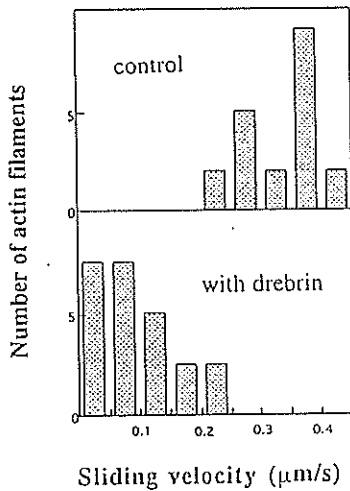
N P-40抽出物より抗ドレブリン抗体-アフィニティーゲルに結合する蛋白を調整した。アフィニティーゲルは proteinA-Sepharose にモノクロン抗体を架橋したものをを用いた。電気泳動によってその成分を調べると、ドレブリン、アクチンの他に 220K、190K、130K、90K のバンドが見られた。



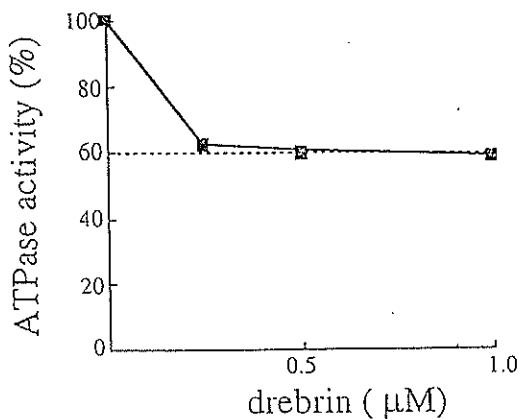
前者3本はATPにより溶出されることと分子量とからそれぞれ、ミオシンII, ミオシンV, ミオシンIであると考えられる。90Kのバンドは抗ゲルゾリン-モノクロン抗体によってゲルゾリンであると同定された。MAP2、フォドリン、カルデスモン、 α -アクチニン、ファシン、トロポミオシンは、抗体によっても検出されなかった。

(4) ドレブリンのアクトミオシンへの影響を調べるために、motility assayをおこなった。カバーガラス上に固定したミオシンの上をローダミンファロイジンで標識したF-アクチンを滑らせ、平均速度を精製ドレブリン存在下、非存在下で測定した。ドレブリンのアクチンに対するモル比2倍量存在下ではF-アクチンの

ミオシンに対する滑り速度は減少した。



さらに、ミオシンのATPase活性にたいする影響を調べた。リン酸化したミオシンと、アクチン、ATPを精製ドレブリンの存在、非存在条件で反応させ、遊離したリン酸をマラカイトグリーンで定量した。ドレブリンは、その活性を60%にまで阻害した。



研究成果

(1) ドレブリンAは終脳に発現が多いことがわかった。この部域は哺乳動物において記憶や学習といった機能に深く関わりとされる場所で、ここのシナプスは

長期増強などの可塑的性質を示すことが知られている。また、ドレブリンはその領域のシナプスの後部側、つまりスパインに局在していた。

(2) ドレブリンはスパインの細胞骨格に結合していることがわかった。そしてその細胞骨格の成分はアクチン、ミオシン、ゲルゾリンの複合体であった。ドレブリンはアクチン架橋因子がアクチンに結合するのを阻害する作用を持つことが知られている。ドレブリンはスパインのアクチン繊維に結合することによって、その束化を阻止し三次元的編み目構造を保つのに役立っていると考えられる。ゲルゾリンはカルシウム依存的にアクチン繊維を断片化する蛋白で、スパインの細胞骨格にゲルゾリンが含まれていることは、スパイン中でアクチンの動態がカルシウムによって制御されていることを示している。

(3) ドレブリンはアクチンとミオシンの相互作用を阻害した。このことはドレブリンがスパイン中の張力発生機構を制御し、スパインの形態変化をコントロールする役割を果たしている可能性を示唆している。

今後の課題と発展

(1) ドレブリンAは終脳に発現が多かった。このことはドレブリン遺伝子の発現が終脳に多いことと、スプライシングの機構が終脳ではAタイプ型が主となっていることによる。このような部域特異的な遺伝子発現、及びスプライシングの

分子機構もまた興味深い今後の研究課題であり、ドレブリンは新たな研究材料を提供することとなった。

(2) ドレブリンはスパインに強く局在していた。スパインに多く存在する他の蛋白、たとえば神経伝達物質受容体、Ca^mキナーゼ1、フォドリン等は、そのほとんどは樹静突起上のスパイン以外の場所にも存在している。つまりスパインにドレブリンほど強く局在する蛋白は珍しい。ドレブリンのスパインへの局在のメカニズムを調べることは、神経細胞内での蛋白のソーティングや、スパイン形成の仕組みを知る上でも興味深い課題である。また、スパインの形成、代謝、退縮を研究する上でドレブリンは有用な分子マーカーとなる。

(3) ドレブリンはアクチン-ミオシンの相互作用を阻害した。このことはドレブリンがスパインの中でアクトミオシンによる張力発生を制御している可能性を示唆するが、その制御様式は不明である。カルシウムイオン、ドレブリンのリン酸化、更に他の蛋白の介在などによる、ドレブリンの阻害作用への影響を調べていく必要がある。

発表論文リスト

林謙介、石川良樹、何曉玲、白尾智明 (1994) ラット大脳シナプス後部におけるドレブリン-アクチン複合体、神経化学、33:488-489。

Yamamoto,H., Mizuno,Y., Hayashi,K., Nonaka,I., Yoshida,M. and Ozawa,E. (1994) Expression of dystrophin-associated protein 35DAG(A4) and 50DAG(A2) is confined to striated

muscles. J. Biochem. 115:162-167

Suzuki,A., Yoshida,M., Hayashi,K., Mizuno,Y., Hagiwara,Y. and Ozawa,E. (1994) Molecular organization at the glycoprotein complex-binding site of dystrophin. Eur. J. Biochem. 220:283-292

Shirao,T., Hayashi,K., Ishikawa,R., Taketomi,A., Asada,H., Ikeda,K., and Uemura,K. (1994) Formation of thick, curving bundles of actin by drebrin A expressed in fibroblasts, Exp.Cell Res.215:145-153

Ishikawa R., Hayashi,K., Shirao,T., Xue,Y., Takagi,T., Sasaki.Y., and Kohama,K. (1994) Drebrin, a development-associated brain protein from rat embryo, causes the dissociation of tropomyosin from actin filaments. J.Biol.Chem. 47:29928-29933

Hayashi,K. and Ozawa,E. (1995) Myogenic cell migration from somites is induced by tissue contact with the medial region of the presumptive limb mesoderm in chicken embryos. Development. 121:661-669.