

神経特異的プロテオグリカン; ニューログリカンCによるシナプス形成調節

The study on function of a brain specific chondroitin sulfate proteoglycan, neuroglycan C in synaptogenesis

研究代表者 愛知県コロニー発達障害研究所周生期学部 研究員 時田義人
Research Associate, Department of Perinatology, Institute for
Developmental Research, Aichi Human Service Center
Yoshihito TOKITA

Abstract

Neuroglycan C (NGC) is a neuron-specific, membrane-spanning chondroitin sulfate proteoglycan with an EGF module. In this report, we investigated the expression pattern of this molecule on cultured neuronal cells. Immunocytochemical studies with anti-NGC and anti-synaptophysin antibodies showed that the synaptic sites were surrounded with NGC proteins. This observation suggested that NGC blocked the redundant expansion of synapses to preserve appropriate inputs. Then, we studied the effects of chondroitin sulfate glycosaminoglycan on neurite extension of cultured hippocampal neurons. Neurites were could not invade the chondroitin sulfate-coating region on culture dish. These findings suggest that NGC may serve as a modulator of neuronal network formation in brains.

1. 研究目的

はじめに

シナプス形成は神経の機能獲得において重要な段階の一つである。入力に応じて必要なシナプスが新たに形成され、不要なシナプスが排除されていくことにより機能を持った神経回路が徐々に構築されてゆくと考えられている。

また齧歯類顔面のヒゲの根本にある末梢感覚神経細胞で受容した感覚刺激は視床の中継核を経て大脳皮質の一次体性感覚野に投射する。この入力信号を処理するバレル構造の形成には末梢からの感覚情報が不可欠であることが知られている。バレル構造は視床などから投射した多くの軸索がシナプスを形成している。

Rat EGF	WVRNSNTGCP-PSYDGYCLNGGVCMY-----VESVDRYVNCVIGY----IGERCQHRDLRWWK
Rat TGF- α	VVSHFNKCP-DSHTQYCF-HGTCRF-----LVQEEKPACVCHSGY----VGVRCEHADLLA
Human Neuregulin-b	LVKCA-EKEKTFCVNGGECFM-----VKDLSNPSRYLCKCPNEF----TGDRQCQNY
Rat NGC	GSCRSVCD--LFPSYCHNGGQCY-----LVENIGAFRCRCNTQDYIWHKGMRCESIIIT
Drosophyla ARGOS	RYLFACS-PLTRLRCQRKQPKLFTVRKRQEFLEVNINSLCQCP-----KGHRCP5
Drosophyla Spitz	ITFPTYKCPETFDAWYCLNDAHCF-----AVKIADLPVYSCECA----IGFMGRCEYKEIDNT

図1. EGFファミリー分子の活性ドメインのアミノ酸配列の比較

6個のシステインが3個のS-S結合により活性ドメインであるループ構造を形成する。

これらのシナプスの集合は末梢のヒゲ一本、一本に対応している。以上のことからバレル構造の形成過程を観察することは神経の高次機能獲得過程を形態で観察できる非常に良い実験系であると考えられる。

目的

ニューログリカンC (NeuroglycanC; NGC) は我々が神経組織から膜貫通型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンのコア蛋白質の遺伝子として単離した分子である。また、この分子は神経伝達分子受容体の発現を誘導するニューレグリン (Neuregulin) によく似たEGFドメインを膜貫通部近くにもつ分子である(図1)。また我々はラットのヒゲからの感覚情報処理を行う大脳皮質のバレル構造の隔壁部にニューログリカンCが発現していることを見いだしている(図2)。

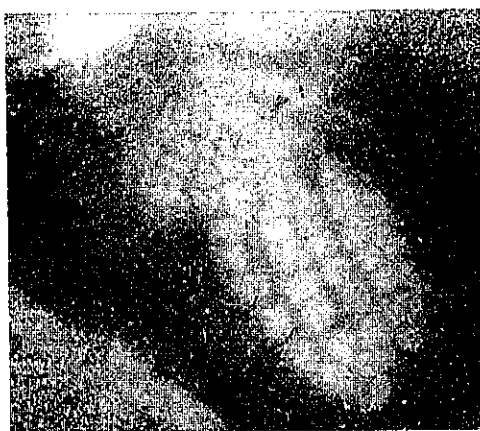


図2 ニューログリカンCのバレル領域での発現
白く抜けた構造がバレル構造と呼ばれており、顔面の各ヒゲからの投射を受けている。ニューログリカンCは各バレルの内側で発現が低下していることがわかる。

これらをふまえ本研究は培養神経細胞を用いてニューログリカンCのシナプス形成の調節についての可能性について解析することを目的とする。

2. 研究経過

2.1. 方法

バレル構造は体性感覚野の中でも特に広い面積を占め、シナプスの投射密度も高い。機能的な回路形成を行うには、適切な位置にシナプスを形成し、不適切なシナプスは排除する事が重要であると考えられる。

まず、培養20-30日目のラット大脳初代培養細胞を用いニューログリカンCの発現と形成されたシナプスの関係を解析した。ウサギ抗-ニューログリカンC抗体とマウス-抗シナプトフィジン抗体により二重免疫染色し蛍光標識抗体により可視化した。シナプトフィジンは前シナプスのマーカー蛋白質である。

次に、ニューログリカンCに付加される硫酸化糖鎖の一種であるコンドロイチン硫酸の機能について検討した。コンドロイチン硫酸を効率よくプラスチック培養皿にコートするため脂質であるdi-palmitoyl-phosphatidyl-ethanolamine (PE) をコンドロイチン硫酸と人工的に結合させた複合糖質 (CS-PE) を用いて以下の実験を行った。CS-PEをプラスチック培養皿にコートし、その上でラット胎仔由来の海馬神経細胞を培養した。神経突起が十分伸展した5日目にコンドロイチナーゼを培養液に添加しコントロールとした。

2.2. 結果及び考察

まず培養神経細胞の免疫染色からNGCは神経突起に粒子状に存在していることがわかった。この粒子はシナプスの大きさとほぼ同じであった。しかし強拡大での観察から、この粒子状の構造はシナプトフィジンと共存することなく、むしろシナプス構造の間に存在することが明らかになった(図3)。つまりNGCは膜上に粒子状の構造を作って存在しているが、前シナプスからの入力を受けているシナプス部の膜上には存在しないことが明らかになった。

この結果はNGCの存在が前シナプス膜の接着を阻害しシナプス構造の肥大を抑制している可能性を示唆する。

また、人工的にコンドロイチン硫酸を培養基質にコートした場合、コンドロイチン硫酸をコートした領域には神経突起が侵入せず、突起の伸長方向が著しく変化することが明らかになった。この変化はコンドロイチナーゼ消化により消失したことからコンドロイチン硫酸鎖による効果であると考えられる(図4)。

以上の結果からニューログリカンCはコンドロイチン硫酸鎖によって神経突起

の先端の伸展を阻害しシナプス構造の肥大を阻害している可能性が示唆された。

2.3. まとめ

ニューログリカンCの培養神経細胞における発現の解析結果から、ニューログリカンCはシナプスの周囲を囲むよう発現していることが明らかになった。

さらに培養海馬神経細胞の神経突起はコンドロイチン硫酸のコートしてある培養基質上には入り込めず、接触すると伸展方向を変えることを見いだした。

前シナプス部がニューログリカンCと共存しないことからニューログリカンCに結合しているコンドロイチン硫酸鎖が神経突起の接着を抑制しシナプス形成を調節している可能性を示唆する。

3. 研究成果

ニューログリカンCの糖鎖であるコンドロイチン硫酸鎖が前シナプスの接着を阻害し、シナプス形成の調節をおこなっている可能性を示した。この結果は、はじめてプロテオグリカンがシナプス形成の抑制因子として機能する可能性を示唆した研究である。



図3、Aはシナプトフィジン、BはニューログリカンC、Cは2つを重ね合わせた写真
シナプスを囲むようにニューログリカンCが発現している。

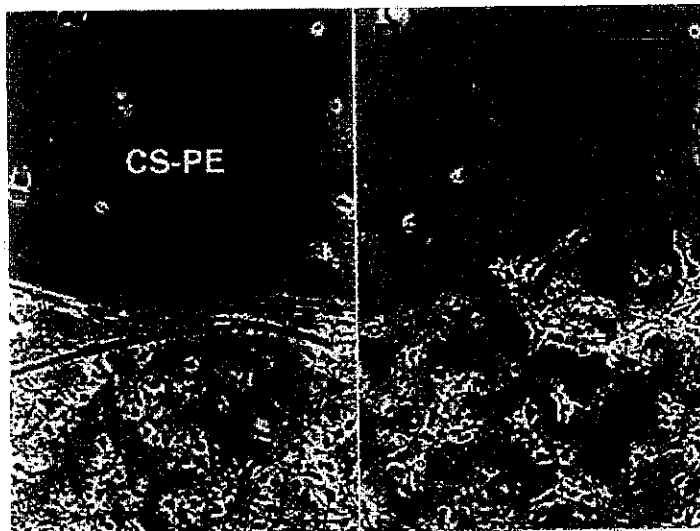


図4、CS-PEコート培養皿
上でのラット海馬神経細胞の神経突起伸長

A、CS-PEコートした培養皿

B、Aと同じ処理した培養皿で神経細胞を培養し5日目にコンドロイチナーゼを培地中に添加したのも。神経突起がCS-PEコートされていた領域に侵入してくることがわかる。

4. 今後の課題と発展

今後は入力依存的な機能的神経回路形成の分子機構を明らかにするためラットの培養神経細胞を用いてニューログリカンCによる各種神経伝達分子受容体の発現調節の可能性について検討したい。

5. 発表論文リスト

1. Aono, S., Keino, H., Tokita, Y., Yamauchi, S., Oohira, A. (2000) Neuroglycan C, a Part-time proteoglycan, in the Central Nervous System. *Connect. Tissue* 32: 45-48.
2. Oohira, A., Matsui, F., Tokita, Y., Yamauchi, S., Aono, S. (2000) Molecular Interactions of Neural Chondroitin Sulfate Proteoglycans in the Brain Development. *Arch. Biochem. Biophys.* 374: 24-34.
3. Aono, S., Keino, H., Ono, T., Yasuda, Y., Tokita, Y., Matsui, F., Taniguchi, M., Sonta, S., Oohira, A. (2000) Genomic Organization and Expression Pattern of Mouse Neuroglycan C in the Cerebellar Development. *J. Biol. Chem.* 275: 337-342.
4. Oohira A., Kushima Y., Tokita Y., Sugiura N., Sakurai K., Suzuki S., Kimata K. (2000) Effects of Lipid-Derivatized Glycosaminoglycans (GAGs), a Novel Probe for Functional Analyses of GAGs, on Cell-to-Substratum Adhesion and Neurite Elongation in Primary Cultures of Fetal Rat Hippocampal Neurons. *Arch. Biochem. Biophys.* (in press)
5. Tokita Y., Keino H., Matsui F., Aono S., Ishiguro H., Higashiyama S., and Oohira A. Regulation of Neuregulin Expression in the Injured Rat Brain and Cultured Astrocytes. *J. Neurosci.* (under revision)