

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名：植田 淳子

2. 養成カリキュラム名：中枢神経再生・維持促進材料の開発

3. 養成カリキュラムの達成状況

フェローらが独自に発見した神経再生促進材料の候補蛋白質 neurocrescin(NC)と MDP77 についての解析を行った。NC については、蛍光蛋白質との融合体の作成により、神経可塑性との関連を生きた状態で観察できるようにする一方、その生理活性にも影響をおよぼすと考えられる、特異的な分子内切断についての理解を深めた。MDP77 については、免疫組織化学的解析により、除神経後の顕著な発現の変動を明らかにし、Yeast two hybrid 法により、微小管モーター蛋白質との相互作用を見出した。NC, MDP77 いずれについても、ラット人工神経における神経再生促進効果(再生軸索の発芽)を明らかにした。いずれも、その作用機構の全貌を明らかにするには至っていないが、部分的な分子実態の把握には到達しており、当初の目標をほぼ達成できている。

4. 成果(A4版3枚程度)

脳・神経系は人間の高度な知的活動を担っているにもかかわらず、増殖、再生が困難である。損傷を受けた神経細胞機能を修復するための人工神経開発をめざし、神経再生促進材料の基盤となる分子を取得することを目的として、ヒヨコ除神経脚筋抽出液由来の蛋白質について解析した。

筋肉を支配する神経軸索が切断されると、その筋肉からある種の蛋白質が合成され、神経再生に働きかけることが知られている。このモデルシステムを用いて、ヒヨコの坐骨神経を切断した後の脚筋抽出液より、初代解離神経細胞培養系において、神経突起伸長を促進する分子を2つ単離し、neurocrescin (NC)、muscle derived protein with molecular mass of 77k (MDP77)と命名した。これらの分子の生体内での機能をより明らかにするための解析を進める一方、シリコンチューブ移植モデルによる、神経再生効果の評価を行った。また、これらの分子以外にも、Suppression Subtractive Hybridization 法により、脚筋において、除神経により発現量が増大する遺伝子群の取得を試みた。以下にこれらの概要について述べる。

1) Green fluorescent protein (GFP)誘導体を用いた NC の蛍光標識体の作成と培養細胞での局在解析

N 末端側に CFP(青緑色蛍光)、C 末端側に YFP(黄色蛍光)を融合した蛋白質“CFP-NC-YFP”を発現できる plasmid vector を構築し、NC の活動依存的な細胞内動態を海馬細胞初代解離培養系で観察した。CFP-NC-YFP は、核を除く細胞体全体に存在していたが、成熟した神経細胞では、特に spine head への局在が顕著であった。シナプス可塑性との関係を検討するため、長期抑圧をひきおこす N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)刺激をおこなったところ、樹状突起内のいくつかのスポットに凝集する現象が観察され、NC の局在変化が長期抑圧発現に関与することが示唆された。

2) NC の切断に関する生化学的解析

NC は除神経後の脚筋や、筋肉由来の初代解離培養系において活動依存的に切断され、その切断は、COS-7 細胞などの培養細胞での一過的発現においても検出できる。apoptosis 実行分子、caspase-3 の認識配列 DEVD に非常に類似した配列 DESD の C 末端側で切断がおり、アミノ酸配列の変異(DESDEESE, AESE)によって切断が阻害されるが、in vitro では caspase-3 が NC を直接には切断しない。

caspase-3 が遺伝的に欠損した MCF-7 細胞においても、NC を一過的に発現すると、有意に DESD 部位で切断され、さらに、NC を発現している MCF-7 細胞に活性型 caspase-3 を共発現させても、caspase-3 の認識配列 DEVD に変異した NC がほとんど切断されるのに対し、NC そのものは caspase-3 が存在しない場合と同程度にしか切断されないことがわかった。つまり、MCF-7 細胞にも、caspase-3 に依存しない、NC 切断活性が存在することを明らかにでき、これまでに見出した特異的切断が caspase-3 のみに依存せず、他の caspase-like な酵素活性によることを実証できた。切断によって蛍光を発するペプチド基質 Ac-DESD-AMC および Ac-DEVD-AMC

を用いて、定量的に切断効率を比較した結果、我々の見出した切断活性は、その基質特異性と pH 依存性において、caspase-3 と明らかに区別できることもわかった。

3) MDP77 抗体を用いた蛋白質レベルでの発現解析

NC と同様にヒヨコ除神経脚筋抽出液より cloning した蛋白質 chick MDP77 (cMDP77) は、分子量約 77 kDa で、骨格筋、心筋における特異的発現を大きな特徴とし、広範な coiled-coil 構造を有する。しかしながら、機能が明らかな相同性の高い配列は見出されておらず、生体内での本来の機能は不明のままである。chick MDP77 (cMDP77) の coiled-coil 領域を除く、N 末端断片 (約 16 kDa) と C 末端断片 (約 19 kDa) の大腸菌発現蛋白質を抗原として作成したウサギ抗血清を、抗原および GST の affinity column によって精製し、ヒヨコやニワトリ胚の種々の組織に対して western blotting および免疫組織化学を行った。Northern blotting の結果より予測されたように、骨格筋・心筋に特異的な発現を示し、平滑筋、末梢神経、血管および結合組織 (腱・筋膜を含む) は陰性であった。cMDP77 蛋白質の発現は胚齢 12 日目以降に上昇し、生後も発現は持続していた。骨格筋の初代解離培養系では、筋管形成後に発現を開始した。骨格筋内の陽性シグナルは A 帯と思われる部位に認められた。さらに、運動調節を行うためのセンサーである、筋紡錘も強陽性反応を示し、錘内筋線維の赤道部は核を除いた細胞質内が、辺縁部では錘外筋同様サルコメアの構造が認められる A 帯で陽性であった。骨格筋内の局在から、cMDP77 がサルコメアを構成する細胞内骨格と何らかの形で相互作用していることが予想された。一方、神経切断・挫滅した脚筋では、免疫組織化学法によって、術後 4 日目までに一部の筋線維でのみ MDP77 の強い免疫陽性シグナルが認められた。

4) hMDP77 と相互作用する蛋白質の Yeast two hybrid 法による探索

SDS-PAGE 上に展開した骨格筋 lysate に対して、cMDP77 の大腸菌発現産物や、COS-7 細胞での発現産物を結合させたところ、cMDP77 は分子量約 220 kDa の蛋白質をはじめとするいくつかの蛋白質と特異的に結合している可能性が示唆された。また、このことは、骨格筋 lysate 中の cMDP77 を BS³ で化学架橋すると、SDS-PAGE において移動度がより高分子側にシフトすることによっても確認した。

これらの生化学的データに基づき、cMDP77 と相互作用する蛋白質を Yeast two hybrid 法により網羅的に解析した。まず、近年同定された mouse homologue の配列 (Benson KF, Chada K., Genetics **160**, 279-287 (2002)) に基づき、MDP77 の human homologue の cDNA を取得した (DDBJ 登録 (AB085905))。Chick と同様に中央部に広範な coiled-coil 構造を有することが予測されたので、この構造を含む場合と含まない場合の合計 6 種類の bait (N 末 non-coil、C 末 non-coil、中央部 coiled-coil、N 末 noncoil + coiled-coil、C 末 noncoil + coiled-coil、全長) を作成し、human skeletal muscle cDNA library に対して small scale での screening を行った。Non-coil 領域を bait にした screening では陽性シグナルが全く得られなかったため、全長分子を bait にして約 5×10^6 clones を screening した結果、酵母での 3 種類の reporter 活性 (His 要求性、Ura 要求性、-gal 活性) のいずれをも強く示し、hMDP77 との強い相互作用が予測されるものとして 12 種類の cDNA を取得した。

これらのうち、

- TypeIIx myosin heavy chain 2 (MYH2), skeletal muscle
- dynactin, 50 kD isoform
- slow skeletal muscle troponin T
- laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)
- KIF1C (kinesin family member 1C)

の 5 種について、Yeast two hybrid 法において、hMDP77 のどの領域に結合しているのか、あるいは、COS-7 細胞で hMDP77 やその部分配列と共に発現させ、免疫沈降法により in vivo において相互作用しているかどうかを調べた。その結果、これらの 5 種の蛋白質はいずれも、hMDP77 の中央部の 2 番目、3 番目の coiled-coil 領域に結合することがわかった。5 種の候補分子の中でも、骨格筋・心筋で特異的に発現することや golgi に局在することなどで、MDP77 との類似性が予測された、KIF1C に着目し、KIF1C 側の結合サイトを検索した結果、KIF1C の 1, 2 番目の coiled-coil 領域が hMDP77 との結合に必須と考えられた。さらに、KIF1C には 2, 3 番目の coiled-coil 領域の間に、モーター活性に影響をおよぼす FHA domain が存在するが、この領域を含まなくても hMDP77 と結合することなどから、結合に必須とは考えられないことがわかった。これらの結合については、GST-pull down 法によって、直接結合していることを確認した。COS-7 細胞や HeLa 細胞に KIF1C と hMDP77 を共発現させたのち、免疫染色法によってこれらの蛋白質の局在を観察した結果、両者の局在はよく一致していた。これらの共局在は、報告されている golgi よりもむしろ微小管マーカールと部分的に一致しており、このことは、微小管安定化剤 Taxol の添加によって、hMDP77 の局在も変化することによって確認した。一方、多くのシグナル伝達分子で見出されている coiled-coil 領域は、分子の多量体化に寄与していることから、

異なる tag 配列を付加した cMDP77 やその部分配列を COS-7 細胞で共発現させ、同様に免疫沈降法により解析した結果、N 末端側の coiled-coil 部分で homopolymer を形成している可能性が示唆された。

4) シリコンチューブを用いた神経欠損部架橋実験による神経再生効果

NC, cMDP77 の蛋白質溶液をシリコンチューブ内に充填、ゲル化した後、ラット坐骨神経欠損部に架橋移植し、肉眼的架橋形成率、チューブ中央部における再生神経の軸索密度（軸索発芽の指標）、軸索直径（再生軸索の成熟の指標）、% axon area（神経再生の総合的指標）による神経再生効果について検討した。その結果、架橋形成率においては NC, MDP77 とともに濃度依存的に神経再生が促進された。MDP77 は再生神経の組織像や軸索の直径分布に相違はなく、軸索の成熟化には影響しないと考えられ、一方、軸索密度と軸索占有率は濃度依存的に増加し、MDP は再生軸索の発芽を促進することが示唆された。

5) 除神経によって発現量の変動する遺伝子の取得

坐骨神経を切断して 4 日後のヒヨコ下腿部脚筋と正常脚筋を用い、Suppression Subtractive Hybridization 法を行い、除神経により発現量の変動した遺伝子の取得を試みた。この方法は cDNA 集団中コピー数の多い cDNA 種ほど自分自身でハイブリッドを形成する速度が速いことを利用して、self subtraction を行い、cDNA を均一化するもので、擬陽性シグナルが少なく、確実に発現量の変動した遺伝子の取得が期待できる。得られた候補クローンについて、発現量の変動を Northern blot 法により検定し、その部分塩基配列を解析した。その結果、除神経後に顕著に発現量が増加する新規遺伝子 pd284 を取得できた。分子量約 8.6 kDa の親水性蛋白質で、一部は核にも局在している。免疫組織化学的解析により、除神経によって、筋線維のうち、遅筋線維でのみ特異的に発現が上昇することを明らかにした。

5 . 成果の対外的発表等

(1) 論文発表（論文掲載済、または査読済を対象。）

Kawasaki, T., Kunisato, A., Hazama, K., Uyeda, A. and Taguchi, T. (2001)

Identification of active regions for neurite outgrowth activity of NC.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **281**, 761-765.

Ishimoto T, Ninomiya K, Miyaji K, Uyeda A, Kasai M, and Taguchi T. (2002)

Cloning and characterization of a novel synaptosome-enriched mRNA that encodes 31 kDa protein.

Biochim Biophys Acta **1579**, 189-95

Fujimori KE, Uyeda A. and Taguchi T.

Regulatory expression of MDP77 protein in the skeletal and cardiac muscles.

FEBS Lett **529**, 303-308 (2002).

Nagai, R., Uyeda, A., Kawasaki, T. and Taguchi, T. (2004)

Neurorescisin is specifically cleaved after the sequence DESD in a caspase-3-independent manner.

Molecular and cellular neurobiology (in press)

Itoh, S., Uyeda, A., Matsuda, A., Ichinose, S., Kobayashi, H., Shinomiya, K., Tanaka, J. and Taguchi, T. (2004)

Muscle-specific Protein MDP77 Specifically Promotes Motor-nerve Regeneration in Rats.

Neuroscience Letters (in press)

(2) 口頭発表（発表済を対象。）

若林良明、伊藤聡一郎、高久田和夫、四宮謙一、山口勇、田中順三、植田淳子、

田口隆久 末梢神経の再生と人工神経の開発

第 12 回日本末梢神経学会学術集会(2001)

藤森一浩、植田淳子、田口隆久

免疫組織化学を用いた MDP-77 タンパク質の発現解析

第 107 回日本解剖学会総会・全国学術集会解剖学会(2001)

藤森一浩、植田淳子、田口隆久

免疫組織化学法による MDP77 タンパク質の発現解析

平成 13 年度 ライフサイエンス分野融合会議・生命工学会バイオテクノロジー研究会合同

研究発表会・講演会(2001)

清末和之、植田淳子、川崎隆史、田口隆久

Neurorescisin の活動依存的細胞内動態

第 25 回日本神経科学大会(2002)

植田淳子、藤森一浩、田口隆久

骨格筋、心筋で特異的に発現する MDP77 蛋白質の免疫組織化学解析

第 75 回日本生化学大会(2002)

永井里奈、植田淳子、川崎隆史、田口隆久

神経突起伸長蛋白質 Neurorescisin は caspase-3 とは異なる酵素によって切断される

第 75 回日本生化学大会(2002)

ヒヨコ坐骨神経除神経脚筋における MDP77 の経時的発現変化の解析,

藤森 一浩、植田 淳子、田口 隆久

第 108 回日本解剖学会全国学術集会 (2003)

Imaging of GFP-tagged Neurorescisin in living neuron during synaptic plasticity.

清末和之、植田淳子、川崎隆史、田口隆久

第 26 回 日本神経科学大会 (2003)

Neuro-tubes conjugated with the neurite promoting proteins, Neurorescisin and MDP77. Fujimori KE, Kawasaki T, Uyeda A, Wakabayashi Y and Taguchi T. The 8th IUMRS International Conference on Advanced Materials (2003)

(3) 特許等 : 2 件
