

論文の内容の要旨

論文題目： Molecular Genetic Analysis of Microtubule-associated protein 1A
和訳： 微小管関連蛋白 1A (MAP1A) の分子遺伝学的研究

指導教官： 加我 君孝教授
東京大学医学部医学系研究科 外科学専攻
平成11年4月入学
医学博士課程
氏名： 吉川 弥生

概要

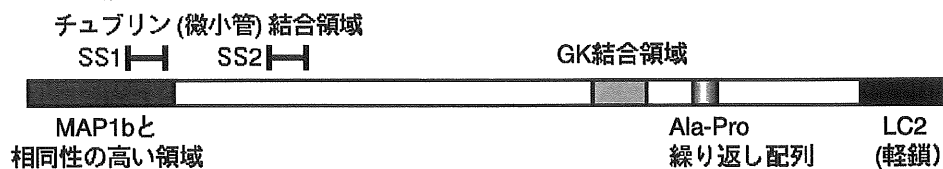
本研究では、微小管関連蛋白 1A microtubule-associated protein 1A (MAP1A) について、標的遺伝子組み替え法によりノックアウトマウス（遺伝子欠失マウス）を作成し、当該遺伝子の機能を研究した。

序論

神経細胞の細胞骨格は、微小管、アクチンフィラメント、中間径フィラメントの三者及びその関連蛋白から構成されるダイナミックな編み目構造である。これらは、神経細胞の特異な形態の形成・維持、および神経細胞内物質の輸送、また物質同士のコネクタとして重要な役割を果たしている。

微小管関連蛋白 microtubule-associated proteins (MAPs) は、生体組織や細胞の破碎液から、微小管に結合して分離される蛋白群である。脳に特有の MAPs として、MAP1a、MAP1b、MAP2、タウ蛋白があげられる。

MAP1a は高分子量MAPの一つで、分子量は約350kDa（ヒト）である。神経細胞内では主に樹状突起と細胞体に分布する。ヒトMAP1A cDNAは、2805 残基のアミノ酸からなる蛋白前駆体をコードしており¹、翻訳後に重鎖と軽鎖に分割される（図）。



(図) MAP1a 蛋白の一次構造

MAP1a重鎖部分の一次構造を見ると、2カ所のチューブリン（微小管）結合領域および1カ所のグアニル酸キナーゼguanylate kinase(GK)結合領域が存在している。GK結合領域はMAP1aに特徴的で、この部位は膜関連グアニル酸キナーゼmembrane-associated guanylate kinase (MAGUK) ファミリーに属する一群の分子に結合する。MAGUKは神経シナプスの後部に存在する蛋白で、神経伝達物質受容体などのシグナル伝達蛋白をシナプス後肥厚部（postsynaptic density; PSD）に効率よく集積させ、細胞骨格蛋白と結びつける足場蛋白scaffolding proteinである。一例としてPSD-95が挙げられるが、MAP1a は生体内でPSD-95と結合しており、NMDA型受容体（NR2B）、Kv1.4などのイオンチャンネル型受容体はMAP1aとPSD-95の結合を強めることが近年報告された²。

微小管関連蛋白 MAPs は、それぞれ発生の時期に応じた特有の発現パターンを持つ。MAP1a と MAP1b は軽鎖を共有するなど構造的に類似した蛋白であるが、MAP1b が胎児期と新生児期を通じて強く発現し生後 20 日にかけて漸減するのに対し、MAP1a は出生 48 時間前から検出されはじめ生後 20 日に最大濃度（胎児期の 10 倍）に達する³。従って、成体に多い MAP1a は樹状突起を中心とした神経細胞の形の安定化に関与していると考えられてきた。

MAP1a はこれまでに、遺伝性痙性対麻痺⁴、Fragile X 症候群⁵などの精神神経疾患との関連が指摘されてきた。2002 年には、マウスで難聴・視力低下・肥満を起こす遺伝子異常 *Tubby* の聴力障害を緩和する蛋白 modifier of *tubby* hearing gene (*moth1*) として MAP1a が同定された⁶。

以上の研究にもかかわらず、MAP1a の機能は未だ明確にされていない。二カ所の微小管結合部位の存在、成体で多いという発現パターンからは樹状突起の形の安定化への関与が考えられるが、MAGUK との結合能を持つことからシナプス後部で何らかの機能を果たしていることが示唆される。そこで、本研究では MAP1A 遺伝子を欠失させた遺伝子組み替えマウスを作成し、その解析を通じて MAP1a 蛋白の機能を明らかにしようとした。

材料と方法

MAP1A 遺伝子を ES 細胞ゲノムライブラリよりクローニングし、塩基配列を解読した。これをもとに、全長 17.2kb のターゲティングベクターを作成した。標的遺伝子組み替えにより、MAP1A 遺伝子を欠失させた MAP1A ノックアウト

トマウス (MAP1A^{-/-}マウス) を作成した。

作成したマウスは、サザン・ブロッティング、ウェスタン・ブロッティング、行動解析などを行い遺伝子型、表現型を解析した。組織学的には、光学顕微鏡 (HE 染色、Bodian 染色、凍結切片法による免疫染色) および電子顕微鏡による解析を行った。海馬初代培養細胞を用いて、種々の細胞骨格蛋白やシナプス蛋白の詳細分布を検討した。免疫沈降法により、MAP1a 蛋白と MAGUK 蛋白、細胞骨格蛋白などとの相互作用についても解析した。

結果

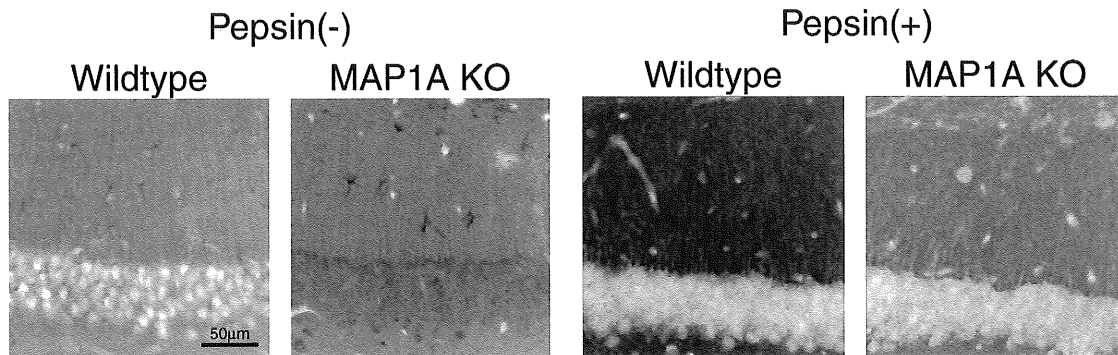
MAP1A ノックアウト(KO)マウスは、出生時には明らかな外表奇形などの異常を示さず、胎児期の死亡も見られなかった。しかし、生後1週より徐々に活動量の低下・哺乳不全・発育の遅れが認められ、3週齢では、同腹の野生型に比べ体重で平均 31%、脳重量は平均 14%の低下を示した。生後 14-17 日に行った行動学的検査では、MAP1A^{-/-}マウスは握力、温度知覚、運動能、空間探索行動の明らかな低下を示し、さらに、生後 19-25 日に限定して全体の 65% (20 匹中 13 匹) が死亡した。

しかし、脳組織標本を光学顕微鏡で観察したところ、脳の全般的な組織構築は保たれており、呼吸中枢や摂食中枢などを含め明らかな組織異常や部位欠損は見られなかった。また、電子顕微鏡下に脊髄前角・坐骨神経・海馬 CA1 領域での微小管の分布や密度を観察したが、顕著な異常は認められなかった。さらに、海馬 CA1 領域の非対称性シナプスで比較したところ、野生型マウスとノックアウトマウスとの間でシナプス密度、シナプス形態に明らかな差は見られなかった。

MAP1a 蛋白の欠失が他の蛋白の発現に影響を及ぼしているかどうかを調べるため、脳破砕物でのウェスタン・ブロッティングを行ったが、他の微小管関連蛋白 (MAP1b、MAP2、タウ蛋白)、細胞骨格蛋白 (チューブリン、アクチン)、MAGUK (PSD-93、PSD-95)、NMDA 型受容体 (NR2B、NR2A、NR1)、AMPA 型受容体 (GluR1)、前シナプス蛋白 (Synapsin I) の量に野生型マウスとノックアウトマウスとの間で有意な差は認められなかった。

野生型マウスと MAP1A ノックアウトマウスの差は、凍結脳組織切片を抗 NMDA 型受容体 (NR2B) 抗体で染色したときにあらわれた。海馬 CA1 領域において、野生型マウスではほとんど染色が認められないのに対し、MAP1A

-/-マウスでは錐体細胞の細胞体と尖側樹状突起に染色が認められた（下図左）。正常脳組織では、NMDA 型受容体がシナプス後膜表面に発現される時には PSD-95 などの足場蛋白や周囲の細胞骨格と結合して堅牢な構造物を作るため、抗原決定基がマスクされ、通常の方法で染色を行っても染色が認められない⁷。MAP1A^{-/-}マウスでは、NR2B の染色が野生型に比し強くなっており、細胞骨格と結合していない free population の割合が増えていると考えられた。



（図）海馬組織の免疫染色。（左）ペプシン処理なし、（右）ペプシン処理を行った後に染色。

抗原決定基がマスクされている場合、ペプシンなどの酵素で抗原賦活処理を行うことにより染色することができる。野生型マウスでペプシン処理を行うと、放線状層において NR2B が粒状に強く染色されるようになった。しかし、MAP1A^{-/-}マウスではペプシン処理後の染色は野生型に比べ薄くなっていた（上図右）。

海馬初代培養細胞では NMDA 受容体が斑点状に染色されるが、MAP1A^{-/-}マウス由来の海馬細胞では斑点が樹状突起本幹に分布し、シナプスが存在する樹状突起棘への分布が減少していた（下図）。統計的には、シナプスに分布している NMDA 受容体の割合が平均で野生型 94%、ノックアウト 79%となり、有意な差が認められた。



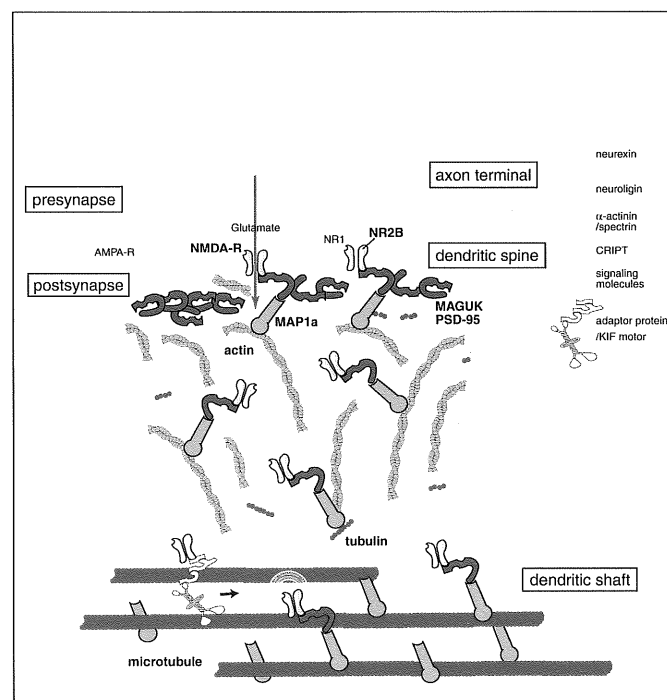
（図）海馬初代培養細胞の前シナプス蛋白（Synaptophysin：赤）、NMDA 型受容体（NR2B：緑）による染色

抗 MAP1a 抗体を用いた免疫沈降実験では、MAP1a の他に PSD-95、NR2B、チューブリン、アクチンが共沈し、これらの分子が生体内で結合していることが明らかになった。さらに、抗 PSD-95 抗体、抗 NR2B 抗体で免疫沈降反応を行ったところ、MAP1A^{-/-}マウスでは野生型マウスに比しアクチン、チューブリンの沈降量が明らかに減少していた。

考察及び結論

本研究では、MAP1a が NMDA 型受容体のシナプスへの分布に重要な役割を果たしていることが示された。MAP1A ノックアウトマウスでは PSD-95 を介した NR2B の細胞骨格への結合が減少しており、そのため NR2B が樹状突起棘に分布しにくくなっているものと考えられた。

MAP1a 蛋白の発現量が生後 20 日に最大となること、マウス脳において神経突起同士のネットワークがこの時期にほぼ完成すること⁸、および MAP1a ノックアウトマウスの死亡例がこの時期に集中することを考えると、MAP1a 蛋白は NMDA 型受容体の樹状突起棘への分布作用を通じて神経シナプスの形成に関わっている可能性がある。



(図)本研究から予想される神経細胞シナプス構造の模式図。

参考文献

1. Fink JK, Jones SM, Esposito C, and Wilkowski J: Human microtubule-associated protein 1a (MAP1A) gene: Genomic organization, cDNA sequence, and developmental- and tissue-specific expression. *Genomics* 35: 577-585, 1996.
2. Brenman JE, Topinka JR, Cooper EC, McGee AW, Rosen J, Milroy T, Ralston HJ, and Bredt DS: Localization of postsynaptic density-93 to dendritic microtubules and interaction with microtubule-associated protein 1A. *J Neurosci* 18: 8805-8813, 1998.
3. Schoenfeld TA, McKerracher L, Obar R, and Vallee RB: MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J Neurosci* 9: 1712-1730, 1989.
4. Martinez Murillo F, Kobayashi H, Pegoraro E, Galluzzi G, Creel G, Mariani C, Farina E, Ricci E, Alfonso G, Pauli RM, and Hoffman EP: Genetic localization of a new locus for recessive familial spastic paraparesis to 15q13-15. *Neurology* 53: 50-56, 1999.
5. Zhang YQ, Bailey AM, Matthies HJ, Renden RB, Smith MA, Speese SD, Rubin GM, and Broadie K: *Drosophila* fragile X-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. *Cell* 107: 591-603, 2001.
6. Ikeda A, Zheng QY, Zuberi AR, Johnson KR, Naggert JK, and Nishina PM: Microtubule-associated protein 1A is a modifier of tubby hearing (*moth1*). *Nat Genet* 30: 401-405, 2002.
7. Fukaya M and Watanabe M: Improved immunohistochemical detection of postsynaptically located PSD-95/*sap90* protein family by protease section pretreatment: A study in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* 426: 572-586, 2000.
8. Matus A: Microtubule-associated proteins: Their potential role in determining neuronal morphology. *Annu Rev Neurosci* 11: 29-44, 1988.