

論文の内容の要旨

論文題目 神経栄養因子の分泌に関わる新規遺伝子 CAPS2 の解析

指導教官 御子柴克彦教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 定方哲史

小脳皮質への主要な入力、橋核などからの苔状線維と下オリーブ核からの登上線維の二系統である（図1）。苔状線維は顆粒細胞に興奮性の入力をする。顆粒細胞の軸索は分子層へ伸び、そこで平行線維となり多くのプルキンエ細胞に興奮性シナプスを形成する。一方、登上線維はプルキンエ細胞に直接興奮性の入力をする。マウス小脳においてはプルキンエ細胞は15万以上の平行線維入力と1本の登上線維入力を受ける。プルキンエ細胞は小脳皮質から出力する唯一のニューロンであり、小脳皮質での情報処理の結果はプルキンエ細胞の活動電位発火頻度として表現されている。一つのプルキンエ細胞への登上線維入力は一本だけであるが、この興奮性シナプスは非常に強力で、プルキンエ細胞に大きな脱分極をもたらす。ただし、登上線維の活動電位発火頻度は毎秒一回程度に過ぎない。一方、一つの顆粒細胞によって生じるプルキンエ細胞の興奮性シナプス後電位（EPSP）は小さなものである。しかしながら、プルキンエ細胞は無数の顆粒細胞により興奮性入力を受けているため、プルキンエ細胞の活動電位発火は主に平行線維の活動により決められる。つまり、小脳皮質での主な情報の流れは、苔状線維→顆粒細胞（平行線維）→プルキンエ細胞である。

小脳は小脳溝による前後方向の区別のほかに、内外方向の区分がある（図2）。小脳顆粒細胞軸索（平行線維）のプルキンエ細胞への投射および顆粒細胞の外顆粒層から内

顆粒層への移動は小脳の虫部、小脳半球、片葉において異なったタイミングで行われることが知られている。このため、顆粒細胞の移動に関わる遺伝子発現の経時変化も虫部、左右半球、片葉において異なることが想定される。顆粒細胞の移動と平行線維の投射は小脳の形成において最も重要なイベントである。これに関与する遺伝子は小脳の形成に重要な役割を果たすと考えられる。この遺伝子（群）の発現のタイミングが小脳の解剖学的区分間で時間差があるという仮定のもと、私は蛍光ディファレンシャル・ディスプレイ法にて、虫部、左右半球、片葉の各区分において発現に差異がある遺伝子の探索を行った。

その結果得られたクローン a1803 は小脳においては P12 をピークとする一過性の発現上昇が見られ、組織特異性としては小脳において最も強い発現が見られた。この a1803 について全長 cDNA クローニングを行い、塩基配列を決定した結果、既知の分子である CAPS (Ca²⁺-dependent activator protein for secretion) にアミノ酸レベルで 70.4% の相同性が見られた。CAPS は分泌顆粒の Ca²⁺ 依存的な分泌に関与することが知られている分子である。またモチーフ検索の結果、C2 ドメイン、PH (pleckstrin homology) ドメインを持つことが分かった。これにより a1803 を CAPS2 と命名した。

脳切片における観察を行ったところ、P21 においては、CAPS2 の mRNA は内顆粒層に (図 3A)、タンパク質は分子層に (図 3B) それぞれ局在している。これは内顆粒層の顆粒細胞で作られた CAPS2 タンパク質が分子層にある軸索 (平行線維) に運ばれている可能性を示唆している。小脳初代培養においても顆粒細胞軸索のプルキンエ細胞樹状突起への投射は行われるが、免疫染色を行ったところプルキンエ細胞の樹状突起周辺に CAPS2 シグナルが存在することが分かった。これからのことから、CAPS2 タンパク質は、顆粒細胞の軸索末端部に局在している可能性が強く示唆された。

また、免疫電子顕微鏡により顆粒細胞軸索末端とプルキンエ細胞の樹状突起とのシナプスにおける CAPS2 シグナルの局在を観察ところ、CAPS2 シグナルは active zone 周辺および、active zone から離れた場所に局在し、小胞状の構造物に隣接して存在するシグナルも見られた (図 4)。

次に小脳の溶出液をショ糖連続濃度勾配遠心にかき、CAPS2 のシグナルがどのような小胞画分に一致するかを調べた。CAPS2 のシグナルは synaptophysin 陽性のシナプス小胞画分には検出されず、chromogranin B 陽性の分泌顆粒画分に一致して検出された。このことから、CAPS2 は小胞に会合するタンパク質であり、その小胞は分泌顆粒のような比較的比重の大きい小胞であることが分かった。

CAPS2 の会合する小胞の特徴を調べるため、抗 CAPS2 抗体を用いて小脳溶出液から小胞を精製し、その中に含まれるタンパク質をウエスタンブロット法および two-site

enzyme immunoassayにて調べた。CAPS2抗体で精製した小胞には chromogranin B のシグナルが検出された他、BDNF、NT-3が陽性であった(図5)。小脳初代培養系において、CERAINシグナルがNT-3やBDNFのシグナルと共局在する可能性について検討したところ、CAPS2シグナルはプルキンエ細胞の樹状突起周辺において、BDNFおよびNT-3シグナルとよく共局在していることが分かった。

実際にCAPS2がBDNFやNT-3の分泌を促進する可能性を検討した。PC12細胞にCAPS2の全長タンパク質(CAPS2(wt))、CAPS2のC2ドメインとPHドメインだけを含むタンパク質(CAPS2(C2+PH))、CAPS2のC2ドメインとPHドメインが欠失したタンパク質(CAPS2(Δ C2+PH))をNT-3やBDNFと共発現させ、培地へ分泌されたNT-3やBDNF量をELISA法にて測定した。その結果、50mM KCl刺激による培地へのNT-3およびBDNFの分泌が、CAPS2(wt)の発現により増強されているのが分かった。この増強はCAPS2(C2+PH)やCAPS2(Δ C2+PH)の発現では確認されなかった。また、EGTA存在下では、CAPS2(wt)のNT-3分泌の増強は確認されなかった。

さらに、小脳初代培養細胞にアデノウイルスの感染によりCAPS2(wt)を発現させたときの、内因性のNT-3の分泌を測定した。感染後、培地に分泌されたNT-3量を測定した結果、50mM KClによる培地中へのNT-3分泌量は、CAPS2の発現によって有意に増強されていた。またアデノウイルスによりCAPS2を強制発現させた時の細胞生存性を検討するため、プルキンエ細胞と顆粒細胞の数を測定したところ、プルキンエ細胞の数は有意に増加したのに対し、顆粒細胞数には顕著な差は見られなかった。BDNFやNT-3が小脳初代培養系においてプルキンエ細胞の生存を増強するという知見から考えると、強制発現されたCAPS2がこれら神経栄養因子の分泌を促進し、プルキンエ細胞の生存率を高めたことが考えられる。

本博士論文研究で私は、小脳の形成において最も重要なイベントである”顆粒細胞の移動と平行線維の投射”に関与する遺伝子は発現のタイミングが小脳の解剖学的区分間で時間差があるという仮定のもと、蛍光ディファレンシャル・ディスプレイ法を行い、新規遺伝子a1803をクローニングし、BDNFやNT-3の分泌への関与を示した。これまでにBDNFやNT-3の活動依存的な分泌は報告されていたが、神経栄養因子の分泌に関する分子的なメカニズムは殆ど明らかにされておらず、本研究の成果はその分子メカニズムの解明への先駆けと言える。また、BDNFやNT-3の小脳形成における重要性が今までに示唆されていることから、小脳形成に重要な遺伝子を探索するという当初の目的に適った結果であると言える。

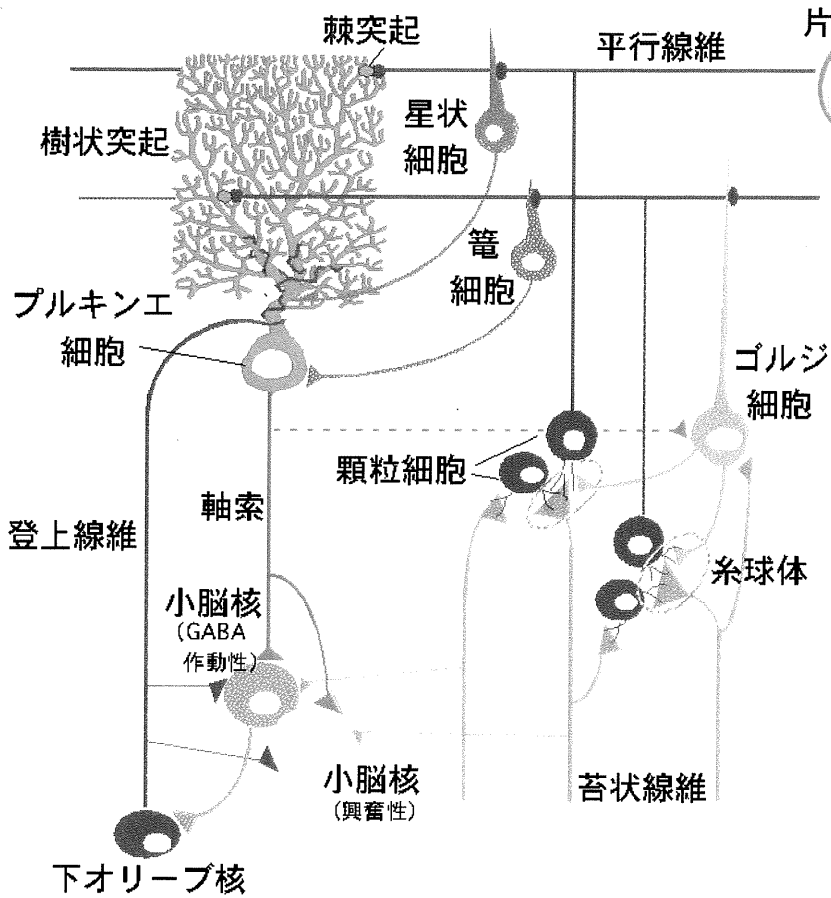


図1 小脳の神経回路網

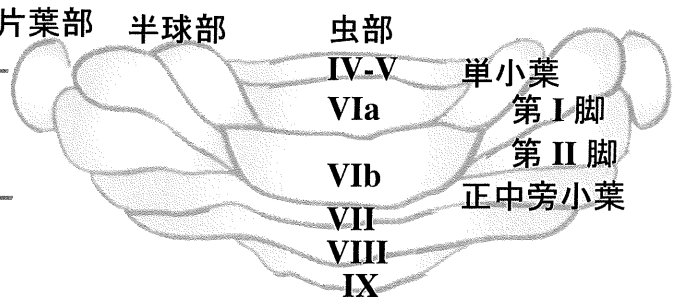


図2 マウス小脳域の区分 (真上から見た像)

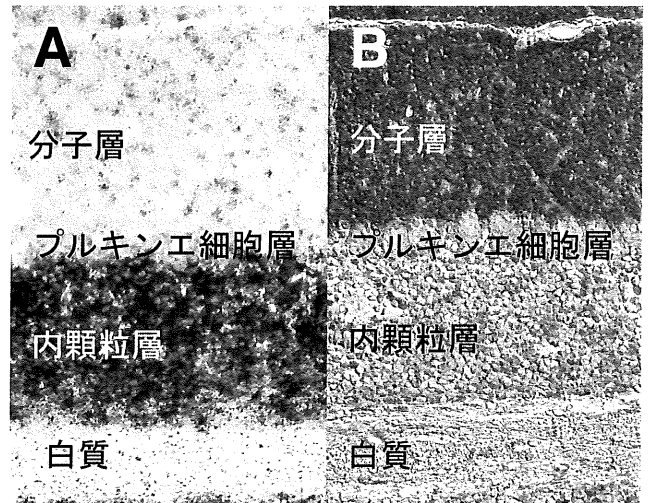


図3 P21マウス小脳でのCAPS2の mRNAとタンパク質の局在

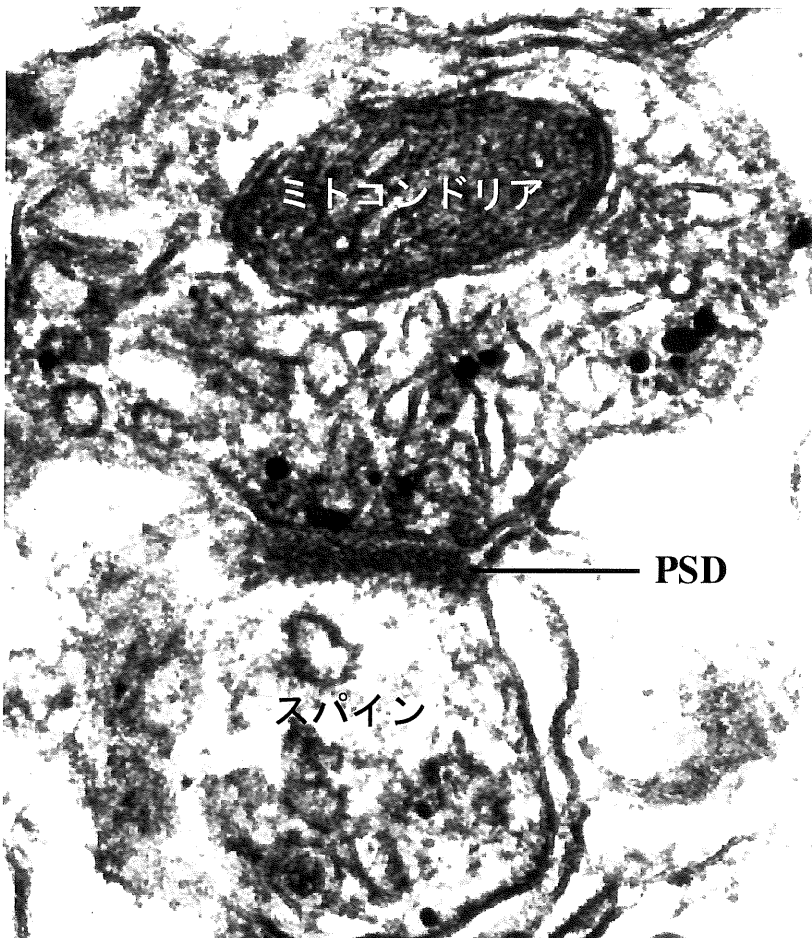


図4 CAPS2の免疫電子顕微鏡写真

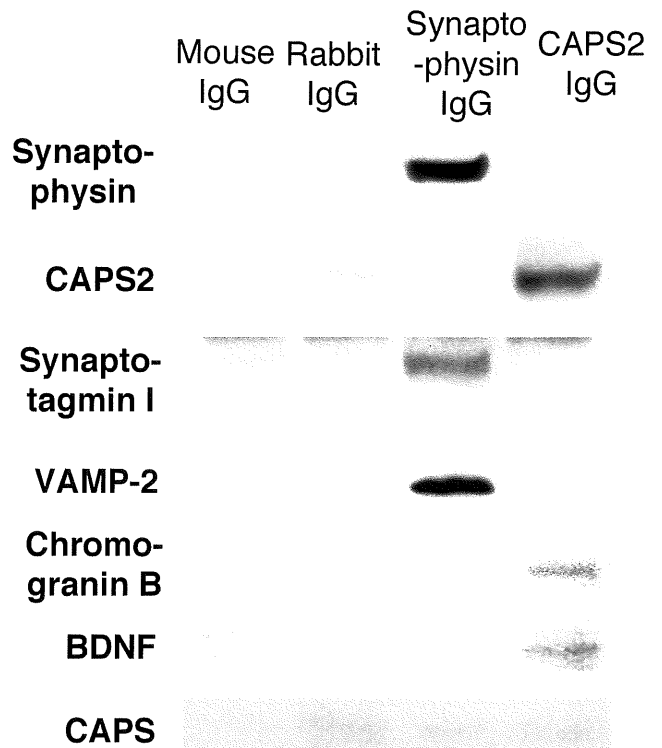


図5 CAPS2の会合する小胞の精製