

Increase in α -tubulin modifications in the neuronal processes of hippocampal neurons in both kainic acid-induced epileptic seizure and Alzheimer's disease

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Vu, Thi Hang メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3190

博士(医学) Vu Thi Hang

論文題目

Increase in α -tubulin modifications in the neuronal processes of hippocampal neurons in both kainic acid-induced epileptic seizure and Alzheimer's disease

(カイニン酸誘発てんかん様発作およびアルツハイマー病の両方における海馬神経細胞の神経突起での α チューブリン修飾の増加)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

神経突起は微小管の構成タンパク質であるチューブリンを豊富に含んでいる。神経細胞において、チューブリンは C 末端にグルタミル化、脱チロシン化、 $\Delta 2$ チューブリン化など様々な翻訳後修飾を受ける。グルタミル化は非常にユニークな翻訳後修飾であり、チューブリンの C 末端領域に存在するグルタミン酸残基上にポリグルタミン酸の分枝を産生する。グルタミル化はチューブリンチロシンリガーゼ様(TTL)タンパク質ファミリーのサブファミリー、例えば TTL5、によって触媒される。 $\Delta 2$ チューブリンは α チューブリンの C 末端から二番目のグルタミン酸残基が細胞質型カルボキシペプチダーゼ 1 (CCP1)によって除去されることにより生成する。

神経系におけるチューブリン翻訳後修飾については長く研究されてきたが、神経変性状態および正常な脳において個々のチューブリン分子が受ける複数の翻訳後修飾に焦点を当てた研究はほとんどない。そこで本研究では、グルタミル化と $\Delta 2$ 型への転換の 2 つの修飾を受けた α チューブリン分子に親和性の高いモノクローナル抗体 DTE41 を作製した。これら 2 つの修飾を受けた分子を、私達はグルタミル化 $\Delta 2$ チューブリンと呼ぶことにした。本研究の目的は、神経変性状態において個々のチューブリン分子が受ける複数の翻訳後修飾の変化を正確に理解することである。

〔材料ならびに方法〕

ヒト死後脳の標本を解析するすべての実験は、浜松医科大学および福祉村病院長寿医学研究所の倫理委員会によって承認されたプロトコルに従って実施した。インフォームドコンセントはすべての患者から取得した。マウスを使用したすべての実験は、浜松医科大学動物実験委員会によって承認されたプロトコルに従って実施した。モノクローナル抗体 DTE41 は分枝鎖状のジグルタミン酸を持つ $\Delta 2$ チューブリンの C 末端領域ペプチドを抗原として作成した。

タンパク質は SDS-PAGE で分離し、ポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜に転写した。転写したタンパク質は特異的な抗体と適切な希釈率で反応させた後、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)標識二次抗体と共にインキュベートし、増強化学発光試薬で得られる画像を CCD カメラで撮影した。

固定した細胞は 5%ヤギ血清および 0.1%トリトン X-100 を添加したリン酸緩衝生理食

塩水(ブロッキング溶液)を用いて室温で 1 時間ブロッキングし、その後一次抗体で標識した。マウス脳切片はブロッキング溶液でブロッキングし、適切な抗体と共に 4℃で 20 時間インキュベートした。一次抗体は AlexaFluor 結合二次抗体で標識した。蛍光シグナルは共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

アルツハイマー病(AD)および非 AD 検体の切片は脱パラフィン後に再水和し、熱処理により抗原賦活化を行った。切片をブロッキング溶液でブロッキングし、次いで 4℃で 20 時間、一次抗体で標識した。一次抗体に HRP 標識二次抗体を反応させ、染色は DAB 基質キットを用いて行った。染色した切片は、脱水した後、Harleco 合成樹脂封入剤でマウントした。

[結果]

まず、新たに作成したモノクローナル抗体 DTE41 を用いた免疫組織化学により、マウス脳内におけるグルタミル化 $\Delta 2$ チューブリンの分布を確認した。グルタミル化 $\Delta 2$ チューブリンは海馬および大脳皮質において錐体ニューロンの細胞体と樹状突起に、小脳プルキンエ細胞において樹状突起末端に局在していた。

次に、神経変性の急性期にグルタミル化 $\Delta 2$ チューブリンのレベルが変化するかどうかを調べるために、カイニン酸誘導性てんかん様発作モデルマウスの海馬におけるグルタミル化 $\Delta 2$ チューブリンの発現量を免疫ブロット法および免疫組織化学により解析した。グルタミル化 $\Delta 2$ チューブリンは、未処理の対照と比較して、カイニン酸処理した個体の海馬で有意に増加した。対照的に、グルタミル化チューブリンと $\Delta 2$ -チューブリンそれぞれのシグナルに変化は認められなかった。

さらに、神経変性がゆっくりと進行する AD においてグルタミル化 $\Delta 2$ チューブリンの量が変化しているかどうかを免疫染色により調べた。AD では海馬錐体ニューロンの先端樹状突起および海馬 CA3 領域の苔状線維においてグルタミル化 $\Delta 2$ チューブリンの発現が増加していた。

[考察]

グルタミル化 $\Delta 2$ チューブリンはマウス脳の神経細胞で強く検出された。脳内においてチューブリンの大部分がグルタミル化され、約 35%が $\Delta 2$ フォームであることとよく一致する。

グルタミル化 $\Delta 2$ チューブリンはカイニン酸投与により誘発される急性てんかん様発作時に増加した。カイニン酸は神経細胞の過興奮を引き起こし、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる。神経細胞の興奮によってチューブリングルタミル化が亢進することが報告されている。また、カルシウムイオンは CCP1 の酵素活性に必要であると報告されている。過興奮した神経細胞でグルタミル化 $\Delta 2$ チューブリンの増加が誘導されたと考えられる。グルタミル化 $\Delta 2$ チューブリンは苔状線維マーカーであるカルビンジンと共局在し、またカルビンジンシグナルの末端で最も強くされたことから、グルタミル化 $\Delta 2$ チューブリンの増加はシナプスに近い軸索末端付近で発生したと考えられる。

AD 脳の海馬錐体ニューロンの先端樹状突起においてグルタミル化 $\Delta 2$ チューブリ

ンが増加しているという可能性は、 α チューブリンに対するグルタミル化チューブリンの相対的な量が AD 脳の先端樹状突起で増加していることを報告した以前の研究と部分的に一致している。AD 脳海馬 CA3 領域の苔状線維におけるグルタミル化 $\Delta 2$ チューブリンの増加は、抑制性入力の破綻による苔状線維の過興奮による $\Delta 2$ チューブリンのグルタミル化が亢進したという可能性が考えられる。

〔結論〕

急性てんかん様発作および AD の両方で α チューブリンの修飾であるグルタミル化 $\Delta 2$ チューブリンが増加する。