

Synectin in the nervous system: expression pattern and potential as a binding partner of neurotrophin receptors

著者	加藤 洋
発行年	2005-03-15
URL	http://hdl.handle.net/10271/251

doi: 10.1016/j.febslet.2004.07.017

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 431号	学位授与年月日	平成17年 3月15日
氏名	加藤 洋		
論文題目	<p>Synectin in the nervous system: expression pattern and potential as a binding partner of neurotrophin receptors (神経系における synectin: その発現様式および神経栄養因子受容体結合蛋白としての可能性について)</p>		

博士(医学) 加藤 洋

論文題目

Synectin in the nervous system: expression pattern and potential as a binding partner of neurotrophin receptors
(神経系におけるsynectin：その発現様式および神経栄養因子受容体結合蛋白としての可能性について)

論文の内容の要旨

[はじめに]

神経栄養因子(NGF、BDNF、NT3/4)は中枢神経系においてニューロンの成長、分化、生存に関与し、末梢神経系での神経再生過程にも重要な役割を担う。NGF、BDNF、NT3/4は各々異なるTrk受容体(Trk A, Trk B, Trk C)と結合し生理的機能を発揮するが、最近Trk A、Trk B受容体とPDZ蛋白であるsynectinが結合することが報告された。このことはsynectinがTrk受容体の結合蛋白として機能し、神経栄養因子を介したニューロンに対する様々な作用を調節している可能性を示唆している。しかしsynectinが神経系のいかなる細胞に発現するかという点に関しては全く情報が得られていなかった。そこで本研究ではまず成熟期のラット脳内におけるsynectin発現についてwestern blotによる解析を行い、synectin産生細胞を免疫組織化学的に同定することを試みた。次にsynectinが生後発達過程においていかなる発現変化を示すのかという問題をin situハイブリダイゼーション法によって検討した。さらに神経系ではsynectinはどのタイプのTrk受容体と蛋白複合体を形成しうるか、そして実際の脳内にsynectin-Trk複合体が存在するかという問題について形態学的、生化学的な検討を加えた。

[材料ならびに方法]

(動物)雄Wistarラットを用いた。

(western blot法)1% Triton-Xを含むlysis bufferを用い、可溶化された脳内蛋白を泳動サンプルとした。7.5%SDS-PAGEによって分離、ニトロセルロース膜に転写後、特異的抗体を用いsynectin、Trk受容体の発現を検出した。

(免疫組織化学)4%PFAを用いて灌流固定し、厚さ18 μ mの凍結切片を作製した。免疫組織化学反応にはABC法を用いた。

(in situハイブリダイゼーション組織化学)³⁵Sにて標識したオリゴプローブを用いてin situハイブリダイゼーションを行い、synectin mRNAを検出した。

(Yeast two-hybrid法)synectinとの結合が報告されているTrk Bの膜近傍領域(458-543)およびこれに相当する領域であるTrk Cの(459-545)をコードするcDNAをサブクローニングしてpGilda Trk BおよびpGilda Trk Cを作成し、これらをbaitプラスミドとした。同様にpJG 4-5 synectin(119-333)を作成し、これをpreyとして用いた。

(免疫沈降法)ラット脳をlysis bufferを用いてホモジネート、遠心して得られた上清にTrk抗体を加えることによりTrk-synectin複合体を選択的に分離し、抗synectin抗体を用いてsynectinを検出した。

(運動神経切断)左側の顔面神経本幹を5mm切除し、その後の脳内におけるsynectin mRNA発現の経時的変化を観察した。

〔結果〕

1. 成熟脳における synectin の発現

- ・western blot法の結果synectinは成熟ラットの脳内に広く発現しており、嗅球、大脳皮質、視床、海馬、中脳、小脳における発現量に差は認められなかった。
- ・免疫組織化学的検討によりsynectinは脳内のほとんどのニューロンに発現していることが明らかになった。

2. 発達過程における synectin の発現変化

- ・western blot法およびin situ hybridization法により、synectin蛋白およびmRNAの発現はともに生直後では低く、生後1週間で劇的に増大すること、さらにその発現量は14日齢でピークを迎えた後に減少していくことを明らかにした。

3. 中枢神経系における synectin の Trk 受容体との関連

- ・synectinの生後発現変化はTrk B、Trk C受容体の発現動態と類似したものであった。そこで我々は酵母two-hybridアッセイによりsynectinのTrk B、Trk Cに対する結合能を検討し、synectinはTrk Bと結合するがTrk Cとは結合しないことを明らかにした。
- ・14日齢の脳のシナプス膜蛋白を抽出し、そこにTrk-synectin複合体が存在していることを抗Trk抗体を用いた免疫沈降により証明した。

4. 末梢神経の再生過程における synectin の発現変化

- ・軸索損傷後の運動ニューロンにおいてTrk B mRNAの発現が一過性に上昇することが知られている。我々は軸索損傷後の顔面神経ニューロンでsynectin mRNAの発現が上昇することをin situ hybridization法により明らかにした。synectin mRNAは神経切断後24時間以内に発現が上昇し始め、7日後に発現のピークが認められた。その発現強度は対照側の約4倍にも達した。その後は徐々に減少し、術後28日目には対照側と同等の発現量に戻った。これは同様の実験においてTrk B mRNAがみせる発現動態と一致した。又、咬筋神経切断モデルにおいても三叉神経運動核で同様の発現上昇を確認した。

〔考察〕

本研究によって、生後発達過程においてsynectinがTrk Bと同様、シナプス形成の盛んな時期に高い発現を示すこと、また実際の脳内においてTrk-synectin複合体が存在していること、さらに顔面神経切断によってTrk Bと共にsynectinが著明な発現上昇を示すことが明らかになった。これらの結果は神経系においてsynectinがTrk Bと機能的複合体を形成している可能性を示唆している。さらにTrk Bは中枢神経系の発達および末梢神経の再生において重要な役割を担うことが知られているので、synectinがTrk Bと協調して神経発達ならびに神経変性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

神経栄養因子は中枢および末梢神経において神経細胞の成長、分化、維持に関与し、神経再生においても重要な役割を担うことが明らかにされてきた。神経栄養因子のTrk受容体がPDZ蛋白であるsynectinと結合することが報告された。このことから、synectinが神経栄養因子によるTrk受容体と結合して神経細胞の生理機能を調節している可能性が考えられる。本研究はsynectinの脳における局在、生後発達過程での発現の変化、どのTrk受容体のサブタイプと結合するか、神経再生における発現動態などについて解析

し、synectinの神経細胞での発現の意義について考察した。

- 1) 成熟ラット脳におけるsynectinの局在：Western blotによりsynectinは40kD蛋白であり、脳に広く分布し、嗅脳、大脳皮質、視床、海馬、中脳、小脳で発現した。細胞分画の解析ではサイトゾール分画に目立ち、シナプトソーム分画にも認められた。免疫染色では、大脳皮質、海馬の神経細胞、小脳のブルキンエ細胞、嗅脳の僧帽細胞などの神経細胞で強い発現を認めた。
- 2) 脳の発達過程におけるsynectin発現の変化：Western blotおよび免疫染色で生後の脳におけるsynectinの発現をみたところ、出生直後では発現は弱く、生後1週間で急速に増加し、生後2週目でピークに達し、その後減少した。これは神経シナプス形成の時期とほぼ一致していた。
- 3) 脳におけるsynectinとTrk受容体との関連：Trk受容体にはTrk A、Trk B、Trk Cが知られている。そのうちTrk Aは限局的に発現し、synectinと結合しないと考えられた。synectinはTrk Bと結合するが、Trk Cとは結合しないことがyeast two-hybrid法で明らかになった。
- 4) 末梢神経再生過程におけるsynectin発現の変化：ラットの左側顔面神経本幹を切断し、その後、顔面神経核でのsynectinの発現をin situ hybridizationで経時的に比較した。神経切断後synectin mRNAの発現は7日目でピークに達し、その後、徐々に減少し、28日目に対照と同レベルになった。

本研究によって、生後2週前後のシナプス形成時期と一致してsynectinの発現が強まること、synectinは脳内神経細胞のTrk Bと結合するが、Trk Cとは結合しないこと、顔面神経切断による神経再生によって、synectinは神経細胞内にその合成が増加し、7日目にピークになり、その後減少することが明らかになった。

審査委員会では、申請者が、synectinが脳における神経シナプス形成に参与することを示唆し、脳内の神経細胞においてTrk Bと機能的に結合することを明らかにしたことは、synectinがシナプス形成および神経再生に重要な役割を果たしている可能性を示した研究として高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- (1) 合成ペプチドを用いた抗体の作り方について
- (2) synectinの脳における神経細胞以外の細胞での発現について
- (3) synectinの神経細胞での局在について、特に軸索ではどうか
- (4) synectinはどのタイプの神経細胞で発現しやすいか
- (5) in situ hybridizationのシグナルの特異性の判断の基準について
- (6) in situ hybridizationで、synectinのmRNAのシグナルがなぜ嗅球に強いのか
- (7) synectinは神経再生に対してその発現が亢進するのか、抑制するのか
- (8) yeast two-hybrid法の実験で、synectinはなぜTrk B PSD-95と結合しないのか
- (9) 顔面神経核を如何に同定したか
- (10) 顔面神経切断によって、顔面神経核の神経細胞数はどのように変化するのか
- (11) synectinの胎生期での発現について
- (12) 生後におけるsynectinの発現とシナプス形成との関係について

これらの質問に対し、申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 筒井祥博
副査 峯田周幸 副査 山本清二