

## 学内グラント 報告書

## 平成25年度 学内グラント終了時報告書

2分子会合体認識抗体を用いた脳疾患モデル動物の  
ニューロン間情報伝達異常の解析

研究代表者 小谷 典弘 (医学部 生化学)

研究分担者 村越 隆之\*, 中野 貴成\*

## 緒言

1972年, SingerとNicolsonは動物細胞膜が脂質二重層から成り, その上には細胞膜上分子が多数存在すること, 同時にこれら細胞膜上分子は脂質二重層の流動に伴って膜上で常にダイナミックに運動していることを提唱した<sup>1)</sup>. 1990年代に入って細胞膜上分子の運動についての研究が進められるようになり, 特定の細胞膜上分子同士が非常に短い一定時間内に膜上で会合する細胞膜上分子間相互作用の存在が実証され, 免疫細胞の活性化や一般の細胞内シグナル伝達に極めて重要であることが明らかとなってきた. このような学術的な背景の中, 我々は全く新規で実用的な細胞膜上分子間相互作用解析法の開発に成功した<sup>2,3)</sup> (特許第4929462). 本法はEnzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) と名付けた反応を利用し任意の細胞膜上分子と生理的に相互作用し「会合体」を形成する分子を生化学的に同定する方法である (EMARS法: Fig. 1).

一方, 脳のニューロンは活動電位が生じることで後位に存在するニューロンに電気信号を送り, 複雑かつ断続的な信号伝達を行うことで高次機能を維持している. これらが破綻すると, 鬱病などに代表される脳疾患が惹起される. 現在までに, 様々な脳疾患において多くの病態モデル動物が作成され, 疾患の起因となるニューロンの分子メカニズムの異常等が研究されてきた. しかし, これら分子メカニズムの異常が脳神経回路の信号伝達にどのような変調をきたし, 表現型である病態に関連していくかについては未だ不明な点が多く残されている.

本研究では, 申請者が長年研究してきた上記の細胞膜上分子間相互作用および細胞膜上分子「分子会合体」に焦点を当て, これらが神経細胞(ニューロン)の機能

にどのような影響を与えるかを解析し, これら会合体を認識する抗体の作製等を通して, 最終的に脳疾患モデル動物の病態と細胞膜上分子間相互作用の間に関連性があるかを検討することを目指す.

## 材料と方法

## 1. 培養神経細胞興奮刺激時における分子会合体形成変化

## a) ATPによる刺激

培養神経細胞のNeuro2aを6 cmディッシュに播種し, 10  $\mu$ Mのレチノイン酸(和光純薬)で神経分化誘導をかけた. 72時間後に細胞を300  $\mu$ M suramin (Sigma)でATPシグナルをキャンセルした. その後, 代表的な細胞膜脂質ラフトマーカであるCTxBのHRP標識体 (LIST bio) を用いて, EMARS反応を行い, 細胞膜脂質ラフト上の会合体分子を網羅的にFITC標識した. その際, 100  $\mu$ MのATPで興奮刺激した細胞群および刺激しなかった細胞群のサンプルをそれぞれ作製した. これらのサンプルをSDSサンプルバッファーに溶解後, 10%のSDS-PAGEゲルにて電気泳動した. PVDF膜に転写したのち, anti-fluorescein antibody (Rockland)を室温1時間反応させた. 洗浄後, 2次抗体としてanti-goat IgG-HRP (santacruz)を室温1時間反応させ, 発色した.

## b) KClによる刺激

培養神経細胞のNeuro2aを6 cmディッシュに播種し, 10  $\mu$ Mのレチノイン酸(和光純薬)で神経分化誘導をかけた. 72時間後に細胞をCTxBのHRP標識体 (LIST bio) を用いて, EMARS反応を行い, 細胞膜脂質ラフト上の会合体を網羅的にFITC標識した. その際, 50 mMのKClで興奮刺激した細胞群および刺激しなかった細胞群のサンプルをそれぞれ作製した. これらのサンプルをSDSサンプルバッファーに溶解後, 上記a)と同様にSDS-PAGEおよびウエスタン

\*医学部 生化学

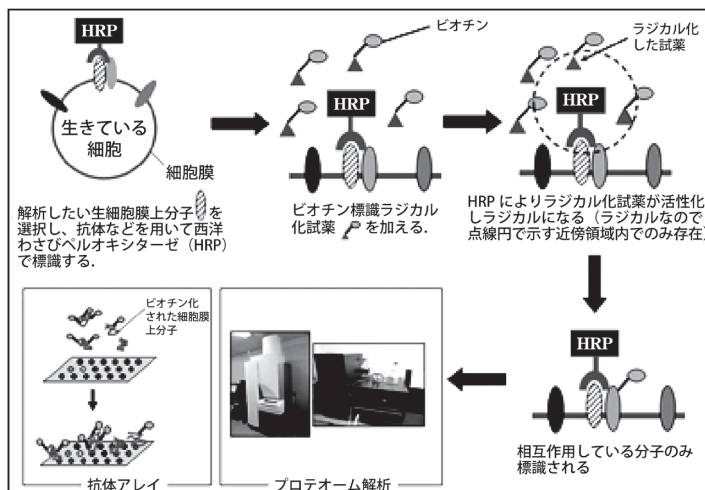


Fig. 1. EMARS法の概要.

プロットングを行った。

## 2. 人工的分子会合体形成によるニューロンの電気生理的形質変化の解析

### a) 光感受性会合体分子発現ベクターの構築

光感受性分子であるシロイヌナズナのCRY2, CIB1<sup>4)</sup>をクローニングしたものをpBluescriptにサブクローニングした。このベクターを用い、分子会合体形成のために、以下のキメラ分子遺伝子を作製した。

- 1) 神経細胞にて細胞膜上分子会合体を誘導すると考えられているPSD95の一部領域と蛍光タンパク質および上記CRY2を含んだキメラ分子。
- 2) 上記1)を細胞膜上近傍に誘導させるための膜タンパク質であるclaudin1および2 (CLN1, CLN2)と蛍光タンパク質および上記CIB1を含んだキメラ分子。

これらをほ乳類細胞発現ベクターであるpcDNA3.1 (invitrogen)に組み込んだ。

### b) 光感受性会合体分子の細胞への発現

上記の発現ベクターを、それぞれNeuro2a, HEK293, NIH3T3細胞にFuGENE (プロメガ)を用いてトランスフェクションした。単独トランスフェクションおよびCLN1 + PSD95, CLN2+PSD95の組み合わせでのダブルトランスフェクションを行った。

## 結果

### 1. 培養神経細胞活動刺激時における会合体形成変化

培養神経細胞のNeuro2aを用いて、神経細胞(ニューロン)が活動する場合に興奮刺激前後で会合体の形成に変化があるかを調べた。興奮刺激としては、ATPによる刺激およびKClによる刺激の

2種類の刺激法を試みた。それぞれの刺激中にEMARS反応を行い、脂質ラフト中で会合している分子群を網羅的に標識し、どのような分子が標識されているかウエスタンブロットングで確認した(Fig. 2)。

その結果、ATP刺激では刺激の有無で会合体を作る分子が有意に変化していることが分かった。一方、KClによる刺激では、有意な変化は観察されなかった。

### 2. 人工的分子会合体形成によるニューロンの電気生理的形質変化の解析

人工的に分子会合体を形成させるために、光刺激依存的に会合体を作る分子群を分子生物学的手法にてニューロン(神経細胞)に発現させた。CLN1および2(マウスcDNAライブラリからクローニング)に関しては、細胞膜上に発現が観察された。一方PSD95は細胞内に広く発現が観察された(Fig. 3)。

## 考察

我々は2008年にEMARS法を開発し、容易に細胞膜上の分子会合体を標識・解析できる状況にある。本研究では、1) 神経細胞(ニューロン)の分子会合体が神経機能にどのような影響を与えているかEMARS法で研究する、2) 神経機能に関与する分子会合体を同定する、3) それら会合体(基本的には2分子会合体)認識抗体を作製し、それを用いて実際の脳疾患動物の脳神経組織において会合体の発現量が増減しているか等を調べる、という3ステップの研究を目指している。その第一ステップとして、今回、実際のEMARS反応を用いて神経培養細胞の分子会合体を捉える実験を行った。実験に使用したNeuro2a細胞は、EMARS反応に対して非特異的の反応が少なく実験に使用するのに最適であることが事前実験で判明している。

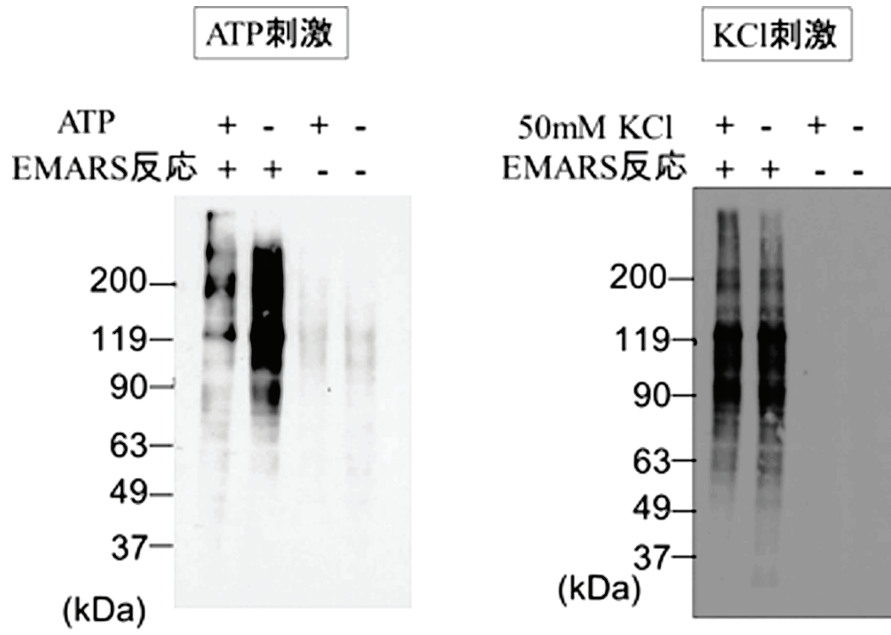


Fig. 2. 各刺激による分子会合体の変化.

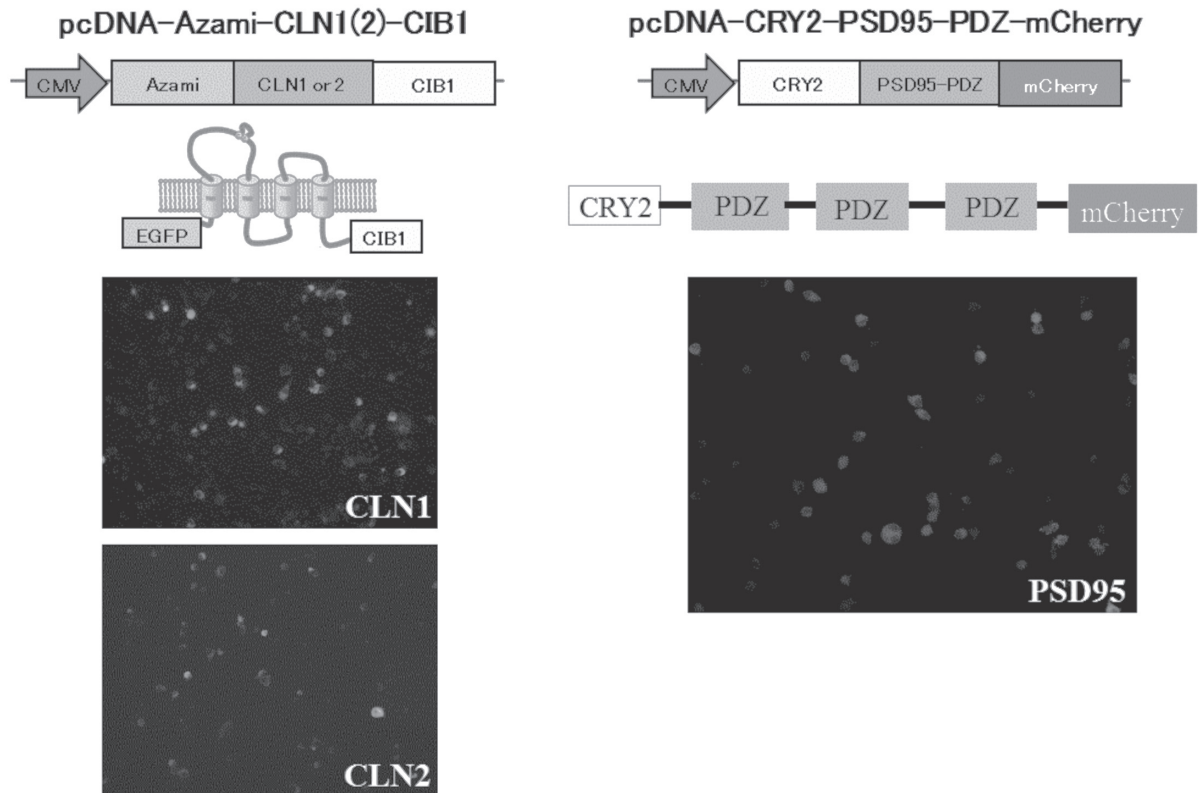


Fig. 3. CLN1および2, PSD95の発現細胞.

細胞内シグナル伝達のプラットフォームである脂質ラフトは、細胞機能に深く関与しているため、本研究では、まずこの構造体における分子会合体を対象とした。刺激方法はATPおよびKClによる脱分極誘発を行った。ATPはニューロンに興奮刺激を惹起することが知られており、神経伝達物質ではないかとの説もある。まず、ATP刺激中にEMARS反応で分子会合体を標識・解析すると、ATPによる刺激では分子会合体の構成分子が減少する傾向が見られた。一方、同様に興奮刺激を誘導するKCl添加では、有意な差は見られなかった。これは、予想外の結果であるが、Neuro2aはKClで脱分極が起こりにくい可能性があり、この点について精査することが課題である。今後は、ATPの刺激有無で変化している会合体分子をプロテオームで解析し、実際のニューロン（初代培養細胞・スライス培養）で同じ現象が観察されるか検討する予定である。さらに、判明した分子会合体を認識する抗体を作製することで、細胞イメージングなどの技術を通して、脳神経疾患でこれら分子会合体形成に変化が起こっているか検討することを考えている。

次に、光刺激により人工的に分子会合体を形成する手法<sup>4)</sup>により、神経細胞において分子会合体形成がどのような生理機能を持つのか精査することとした。これには以下の2つの目的がある。1) 上記分子会合体認識抗体を作製するときの抗原(2分子会合体抗原)を作製するのに本手法を使用する、2) 上述のEMARS法による分子会合体同定により判明した会合分子同士を人工的に会合体形成する系の構築を行う。しかし、上記2つの目的達成に必須なのは、会合体分子を同定することであるが、これには時間がかかる。従って、我々は準備実験として、近年ニューロンにおいて細胞膜上で分子会合体を誘導すると考えられているPDZドメインを持つタンパク質(PSD95等)を細胞膜近傍に光刺激で誘導し、より生理的条件下で

分子会合体を誘導する系を構築することとした。細胞膜上に発現するclaudin分子にPSD95分子のPDZドメインを持つ一部配列を光刺激で結合させ、PDZに結合する細胞膜上分子群の会合体形成を誘導することとした。現在までにこれらタンパク質のキメラ分子を発現させることに成功した。2つの分子をダブルトランスフェクションした細胞も作製した。今後は、これらが光刺激で会合体誘導を起こすか検討し、その後ウイルスベクターを作製して実際のニューロン(初代培養細胞・スライス培養)で同様の実験が出来るか検討する予定である。

#### 参考文献

- 1) Singer SJ, and Nicolson GL. Science 1972;175:720-31.
- 2) Kotani N, Gu J, Isaji T, Udaka K, Taniguchi N, and Honke K. Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:7405-9.
- 3) Honke K, and Kotani N. The enzyme-mediated activation of radical source reaction: a new approach to identify partners of a given molecule in membrane microdomains. J Neurochem 2011;116:690-5.
- 4) Kennedy MJ, Hughes RM, Peteya LA, Schwartz JW, Ehlers MD, Tucker CL. Rapidblue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. Nat Methods 2010;7:973-5.

#### 研究成果

- 1) 本家孝一, 山口亜利沙, 小谷典弘. GPI-アンカー型HRP融合タンパク質がつくる脂質ラフトドメイン, 第86回日本生化学会大会, シンポジウム, 平成25年9月12日, パシフィコ横浜