

報告書

平成15年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

神経因性疼痛と神経再生におけるガレクチン-1の
細胞内情報伝達機構の解明

受賞者 吉村 和法 (埼玉医科大学生理学教室)

目 的：ガレクチン-1は β ガラクトシドに結合する動物レクチンでガレクチンファミリーに属する。ガレクチンファミリーは無脊椎から脊椎動物に広く分布し、現在までにガレクチン-1から14まで報告されている。ガレクチン-1は分子内に6個のシステインを持ち、還元状態でのみレクチン活性を示す。レクチン活性によって細胞表面の糖脂質や糖タンパク質糖鎖に結合することで細胞の接着および細胞増殖等へ関与していることが報告されている。いくつかの腫瘍(グリオーマ)では悪性度との関連が報告され、ガンの浸潤・転位や免疫系、あるいは発生・分化との関連も示唆されてその多様な働きが注目されている。最近堀江らはレクチン活性を持たない酸化型ガレクチン-1が、マクロファージを介して末梢神経再生を促進する働きを明らかにした。しかし、マクロファージ上のレセプターは不明な上、細胞内でどのような変化が起こっているか、十分に解析されていない。また研究代表者らは坐骨神経切断モデルラットにおいて切断部位に酸化型の組み換え型ヒトガレクチン-1を投与すると後根神経節の知覚神経細胞の生存が促進され、また坐骨神経の脊髄レベルでの痛みを伝達するNK1レセプターの発現が減少することを発見した(Restorative Neurology and Neuroscienceに投稿中)。このことは明らかに酸化型ガレクチン-1が坐骨神経再生時に痛みの調節にも関与していることを示唆するものであり、ますます酸化型ガレクチン-1の情報伝達の機構解明の意義は大きい。そこで研究代表者はまず、マクロファージの細胞内でどのような細胞内変化が起こっているのか解析した。この研究報告書は、酸化型ガレクチン-1によって誘導されたマウスマクロファージのプロテオーム解析の結果を中心に報告するものである。

方 法：酸化型ガレクチン-1および還元型ガレクチン-1はキリンビール医薬探索研究所の門屋利彦博士より提供されたものを使用した。マクロファージは成熟Balb/c雌雄マウスの腹腔より採取してものを使用した。マクロファージは無血清培地に培養され、それに

酸化型(Ox-Gal)あるいは還元型ガレクチン-1(CS-Gal)を100pg/ml添加し、あるいは無添加(Control)で30分間インキュベートし、リン酸緩衝液で細胞を2回洗浄してから、二次元電気泳動用サンプル調製液でホモゲナイズしてから続けて、超音波処理、遠心を行って、可溶性分画を集め、濃縮し、タンパク質定量を行ってから一次元電気泳動をpH 3-10 NL条件でおこなった。さらに二次元電気泳動は10-20% ゲル濃度で30 mA定電量、3時間泳動を行った。電気泳動後、高感度にリン酸化タンパク質を検出するためにPro-Q Diamond染色を行い、画像解析装置を装備した蛍光検出器(Typhoon 9440)でリン酸化タンパク質スポットを検出した。画像取り込み後、同一ゲルを全タンパク質の高感度染色のためにSypro Ruby染色を行い、同様に蛍光検出器にてSypro Rubyで染色されたタンパク質を検出した。酸化型あるいは還元型もしくは無添加の条件で処理されたマクロファージのリン酸化タンパク質染色およびSypro Ruby染色のパターンを画像解析して酸化型ガレクチン-1と有意な発現差異のあるスポットを、ゲルから切り出してトリプシン消化後、LC/MS/MSにてスポットのタンパク質を同定した。同定されたタンパク質は質量分析器付属の専用ソフトおよびインターネット上のデータベースを利用してバイオインフォマティクス的に解析した。

結 果：図1と2はそれぞれ還元型および酸化型ガレクチン-1処理によるタンパク質発現を、また図3と4は同一ゲル上のリン酸化タンパク質の発現を示している。矢印は特に発現差異が認められるスポットを示している。すくなくとも15個の興味あるスポットが見つかり、現在、そのうち10個のスポットについては解析結果が得られた(表1)。図3と4の比較により特に酸化型ガレクチン-1の刺激によりマクロファージの細胞内でスポット1と10が特にリン酸化されていた。一方、それに対応してタンパク質発現でも図1と2の比較より酸化型ガレクチン-1でスポット1と10は発現上昇していた。また酸化型ガレクチン-1処理マクロファージ

(図2)でタンパク質発現の上昇がスポット2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 15で観察された(スポット12はなし).
考 察: LC/MS/MS分析の結果, スポット1は glucose regulated protein であると同定されたが, このタンパク質の発現は最近, MAPキナーゼ経路を活性化することが報告されている. それゆえ, ガレクチン-1のレセプターはなお不明であるが, 酸化型ガレクチン-1のシグナルが不明なレセプターを介して, MAPキナーゼ経路を活性化している可能性が示唆される. この活性の結果, マクロファージでのまだ未同定な神経栄養因子の分泌が誘導され, それが生理的作用として切断された軸索の再生を促進しているものと推測される. 今後は分泌されている未同定な神経栄養因子の同定を行う予定である. またスポット10はLC/MS/MSより細胞骨格の再構築に関与するcofilinであることが明らかになった. このタンパク質はリン酸化されると, アクチンの脱重合を引き起こすことが既に報告されている. それゆえ, 酸化型ガレクチン-1処理でマクロファージのCofilinのリン酸化と発現の上昇が起こっているの, マクロファージにアクチン細胞骨格の変化が起こっていることが推論される. なお他のスポット2, 3, 4, 5からはすべて同一な glucose regulated protein が同定され, スポット6, 7, 8はすべて alpha enolase であることが判明した. 以上のことをまとめて考慮すると, 少なくとも酸化型ガレクチン-1は坐骨神経の損傷によって還元型ガレクチン-1として末梢神経から放出され, 炎症部位で一酸化窒素などの酸化的条件により酸化型ガレクチン-1に変化し, それが周囲の細胞, 特にマクロファージにストレスシグナルとして機能を開始する. すなわち, そのシグナルはマクロファージ内の神経栄養因子などの分泌を盛んにするMAPキナーゼ経路を活性化するGRP94 (glucose regulated protein)の発現およびリン酸化を上昇させる. またアクチンの脱重合を調節し, また細胞移動の方向を調節するRho-LIMK-Cofilinのシグナル伝達経路を不活性化に導くcofilinのリン酸化および発現増加を酸化型ガレクチン-1は誘導している. これらのことはまさに予想していた酸化型ガレクチン-1の神経再生の誘導の開始を示唆する結果であると考えられる. 今後は酸化型ガレクチン-1のレセプターの解析も含めてより詳細な酸化型ガレクチン-1のシグナル伝達経路の解明を進めて行く予定である.

なお本研究成果の成果の一部はRestorative Neurology and Neuroscienceに発表し, また全体の成果は米国神経科学会に発表する予定である.

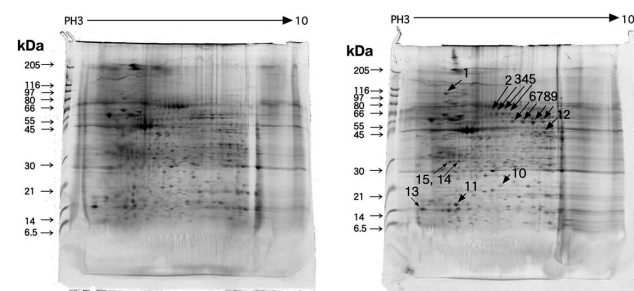


図1. CS-Gal (100 pg/ml)

図2. OX-Gal (100 pg/ml)

Sypro Ruby staining

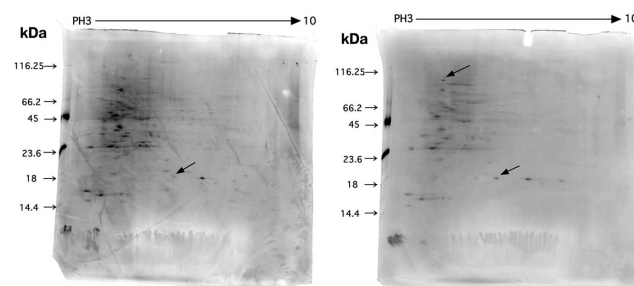


図3. CS-Gal (100 pg/ml)

図4. OX-Gal (100 pg/ml)

Pro-Q Diamond staining

表1.

Spots changed on expression of protein (Red indicates spots changed also in phosphorylation)		
Spot's Number	Protein identified	Regulation
1	GRP94 (GP96), glucose-regulated protein	Up
2	Glucose regulated protein	Up
3	Glucose regulated protein	Up
4	Glucose regulated protein	Up
5	Glucose regulated protein	Up
6	Alpha enolase	Up
7	Alpha enolase	Up
8	Alpha enolase	Up
9		
10	Cofilin	Up
11	Coactosin-like protein	Up
12		
13		Down
14		Up
15		Up

図および表の説明: 図1と3, 図2と4は同一ゲルで示されているようにCs-Gal (還元型ガレクチン-1)あるいはOX-Gal (酸化型ガレクチン-1)で30分間処理したマクロファージのホモジネートの二次元電気泳動後, 図1と2はタンパク質染色(Sypro Ruby staining)を, 図3と4はリン酸化タンパク質染色(Pro-Q Diamond staining)を行った染色パターンを示している. 矢印はCS-Gal処理したマクロファージと比較して発現に変化が認められたスポットを示し, それらのスポットはゲルから切り出し, トリプシン処理後, LC/MS/MS分析を行い, その結果が表1にまとめられている. また表1の赤で記載されたタンパク質はリン酸化発現の上昇も確認されたことを示している.