

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14344

研究課題名(和文) 中枢神経グリア細胞間の情報伝達メカニズムの研究

研究課題名(英文) Study for the mechanisms of intercellular signaling of glial cells in the central nervous system

研究代表者

白尾 智明(Shirao, Tomoaki)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20171043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、ドレブリンはアクチン結合領域2を介してコネクシン43と複合体を形成することが示唆された。このことから、中枢神経グリア細胞間の情報伝達メカニズムに重要な働きをしているGAP結合の機能の変化はアクチン線維およびコネクシン43のドレブリンへの結合の変化によって調節されていると考えられた。また、セリン142番のリン酸化の変化がCx43との複合体形成には影響を与えないことから、この部位のドレブリンのリン酸化はコネクシン43との複合体形成には直接的には関与しないと考えられる。

研究成果の概要(英文)：GAP junction plays a pivotal role for intercellular signaling of glial cells in the central nervous system. The present study indicates that drebrin binds to connexin 43 via actin-binding region 2. This suggests that the drebrin-mediated change of GAP junction function is due to the alteration of molecular interaction between drebrin, connexin43 and actin filaments. Additionally, it is indicated that the phosphorylation of drebrin at Ser 142 does not affect the binding affinity of drebrin to connexin 43 both phospho- and dephospho-mimic mutants of drebrin could bind to connexin 43.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ドレブリン コネクシン アクチン GAP結合

1. 研究開始当初の背景

アクチン結合タンパク質であるドレブリンが結合したアクチン線維は、神経シナプス(文献1)、免疫シナプス(文献2)、GAP結合(文献3)などの細胞間の情報伝達構造の機能に必要な細胞膜直下アクチン細胞骨格を構成している事が知られている。

神経ネットワークは高次脳機能の基盤をなすと考えられているが、グリア細胞もシナプスを構成する要素としての重要性が指摘されており、また一群のグリア集団により作られるグリアアセンブリが神経回路網と並列して存在し、高次脳機能発現に重要な役割を持つと考えられる。このグリアアセンブリのオン・オフはGAP結合のオン・オフにより決まる可能性がある。

GAP結合は上記のグリアアセンブリの情報伝達機構の一つと考えられる。GAP結合は膜直下アクチン細胞骨格により裏打ちされた比較的安定な構造であると考えられてきたが、最近、GAP結合は500ミリ秒単位での早い構造変化をすることが報告された(文献4)。この事は、グリアアセンブリも神経ネットワークと同じく、動的回路網である事を強く示唆している。

コネキシン43(Cx43)はアストロサイトにおけるGAP結合の基本的構成要素であるが、GAP結合機能にはドレブリンがCx43に結合していることが必要である事が明らかとなっている(文献3)。しかしながら、その分子の実態に関する研究はまだない。

成熟脳(*in vivo*)において観察されるドレブリンはそのほとんどが神経特異的アイソフォーム(ドレブリンA)であり、樹状突起スパインへの特異的局在が認められる。また幼弱脳では、非神経細胞にも発現するアイソフォーム(ドレブリンE)の発現が認められるが、やはりその発現は神経細胞に限局され、グリア細胞における発現はまだ確認されていない。しかしながら、アストロサイトを培養すると、アストロサイトではドレブリンEの発現が確認される。この事は、脳内のアストロサイトでもある状態のアストロサイトがドレブリンEを発現している可能性を示唆している。

そこで本研究では、グリアアセンブリにおけるGAP結合のオン・オフに関する

分子機構を明らかにする為に、「ドレブリン、Cx43および膜直下アクチン細胞骨格」に焦点を当てて研究を行った。

<引用文献>

1. Takahashi H. *et al.* "Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis." *J Neurosci* 23(16): 6586-6595. (2003)
2. Perez-Martinez M. *et al.* "F-actin-binding protein Drebrin regulates CXCR4 recruitment to the immune synapse" *J. Cell Sci.* 123:1160-1170 (2010)
3. Butkevich E. *et al.* "Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton." *Curr. Biol.* 14:650-658 (2004)
4. Majoul I. *et al.* "Fast structural responses of gap junction membrane domains to AB5 toxins." *PNAS USA.* 110(44):E4125-33 (2013)

2. 研究の目的

グリア細胞は神経細胞とともにシナプスを構成し、シナプス機能を制御する重要な一要素である。さらに、グリア細胞同士が連結し、機能的集団としてグリアアセンブリを形成する事で、高次脳機能に重要な役割を持つと考えられる。また、グリア細胞のGAP結合は500ミリ秒以下の速い構造的变化をする事がわかり、活動依存的にその構造および連結の制御を介して、グリアアセンブリ全体として機能が修飾を受ける可能性が示唆される。本研究は、グリア細胞のGAP結合のオン・オフを制御するメカニズムの解明、およびGAP結合のオン・オフによりグリアアセンブリが修飾されるかどうかを解明する事を目的とする。

従来の研究で、GAP結合の機能がドレブリンのノックダウンによって阻害される事から、GAP結合のオン・オフがCx43とドレブリンの相互作用を介して制御される可能性がある。そこで、ドレブリンとCx43の結合様式を明らかにし、ドレブリン、Cx43、アクチン線維間の相互作用によるGAP結合のオン・オフのメカニズムを明らかにする。さらに、GAP結合のオン・オフによるグリアアセンブリの変化を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

アストロサイト培養法

生後1日の新生ラット大脳皮質を単離し、0.25%トリプシン、0.1%DNase Iを含んだHank's balanced salt solution (HBSS)で、37℃で15分間インキュベート後、パスツールピペットで適度に組織を分散させ、Fetal bovine serum (FBS)を加えた。

その後、細胞溶液をレンズペーパーでろ過し、10 %FBS を含んだ Minimum essential medium (MEM) 培養液を用いて、75 ml 培養フラスコ (PRIMARIA ; FALCON, Franklin Lakes, NJ) で 37 °C、0.5 % CO₂ で培養した (一次培養)。細胞密度がコンフルエントな状態になるまで 10 %FBS を含んだ MEM で、1 週間に 2 度培地交換をして培養した。その後、HBSS で 1 度洗浄し、トリプシン処理を行い細胞回収し、種々のプレートに播種し、細胞密度が 60-70% になるまで 10%FBS/MEM で培養した (二次培養)。

HEK293 細胞培養法

Human Embryonic Kidney (HEK) 293 細胞を 10%FBS 入り DMEM (Sigma, D6046) で細胞密度が 60-70% になるまで培養した。

トランスフェクション法

トランスフェクションは Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher, 11668019) を使用した。60mm 培養ディッシュに播種した細胞密度が約 60-70% のアストロサイトおよび HEK293 細胞を使用した。GFP (遺伝子発現確認用)、Cx43 と各種ドレブリン変異体の組み合わせ 1 グループあたり 1.5 mL チューブを 2 本用意し、それぞれに Opti-MEM (Gibco, 31985070) を 125 uL 加えた (チューブ A およびチューブ B とする)。チューブ A に Lipofectamine 2000 溶液を 15 uL 入れた。チューブ B に以下の各種プラスミド DNA ベクター (1, 2 および 3 から一種) を 2.5 ug ずつ添加する。

1. pCMV-eGFP-C1 (遺伝子発現確認用)
2. pCMV-HA-Cx43
- 3-a. pCMV-Myc-drebrin E full length
- 3-b. pCMV-Myc-drebrin aa1-233
- 3-c. pCMV-Myc-drebrin E S142D
- 3-d. pCMV-Myc-drebrin E S142A,

A 液と B 液を混合し、室温で 5 分間インキュベーションした。インキュベーション後、混合液をそれぞれの培養ディッシュに 125 uL ずつ添加し、24 時間培養した。24 時間後の遺伝子発現を EGFP の蛍光を倒立顕微鏡 (OLYMPUS IX81) で確認した。

共免疫沈降 (Co-Immunoprecipitation, Co-IP)

トランスフェクション後 24 時間後、各細胞を Tris 緩衝液 [50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl], 20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, protease inhibitors (Complete, Roche)] で一度洗い、セルスクレーパーを用いて 1 mL の Tris 緩衝液で細胞を 1.5 mL チューブ

に回収した。20,000 g で 5 分間遠心した。遠心処理後、上清を捨て沈殿に各種 Co-IP バッファー (後述) を加えた。26G の注射針に三度通し、4 度で 10 分間インキュベーションした。Normal rabbit IgG または抗 Cx43 抗体 (後述) を 1 ug 分添加し、2 時間、4 度でローテーターを用いてインキュベーションした。その後、Protein A/G Agarose (Pierce, 20421) を 20 uL 添加し、4 度で 1 時間インキュベーションした。ビーズをバッファーで 5 回洗浄した後、2x sample バッファーを添加し、95 度で 5 分処理し、上清を免疫沈降サンプルとして SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) およびウェスタンブロットングを行った。

SDS-PAGE およびウェスタンブロットング

アクリルアミドゲルはコスモ・バイオ社の 4-20% グラディエントゲル (マルチゲル II ミニ, 414879) を用いた。電気泳動後のゲルを Immobilon-P polyvinylidene difluoride (Merck Millipore, IPVH00010) メンブレンに転写し、非特異結合を 10% BSA 入り Tris buffered saline (0.05% Tween 20) でブロッキングした後、一次抗体および HRP 結合二次抗体を反応させ、化学発光基質 (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Merck Millipore, WBKLS0100) を添加後、LAS-3000 (Fujifilm) にて可視化した。

抗体

一次抗体

- 抗ドレブリンマウルモノクローナル抗体 (クローン M2F6, 培養上清)
- 抗ドレブリンマウスモノクローナル抗体 (クローン MX823, PROGEN, 612128)
- 抗ドレブリンラビットモノクローナル抗体 (clone EPR12634, abcam, ab178408)
- 抗ドレブリン A 特異的ラビットポリクローナル抗体 (IBL, #28023)
- 抗Cx43ラビットポリクローナル抗体 (Sigma Aldrich, C6219)
- 抗GFPラビットポリクローナル抗体 (Molecular Probes, A11122)
- 抗c-Myc マウスモノクローナル抗体 (clone 9E10, Santa Cruz, sc-40)
- 抗HA High Affinity ラットモノクローナル抗体 (clone 3F10, Sigma Aldrich, 12158167001)
- Normal rabbit IgG (Santa Cruz, sc-2027)

二次抗体

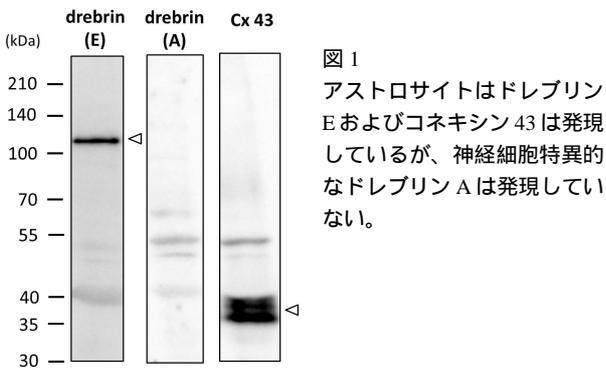
- マウスIgG HRP linked whole Ab (GE

- Healthcare, NA931-1ML)
- ラビットIgG HRP linked whole Ab (GE Healthcare, NA934-1ML)
- ラットIgG HRP linked whole Ab (GE Healthcare, NA-935)

4. 研究成果

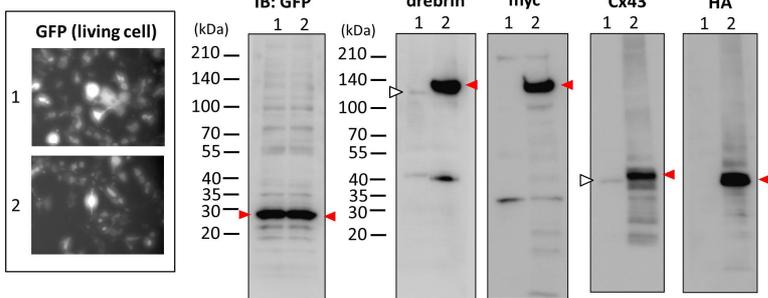
ドレブリンおよび Cx43 のアストロサイトでの発現確認

ラット大脳皮質から調製したアストロサイトにおけるドレブリン E および Cx43 の発現をウェスタンブロッティングにより確認した (図 1)。



HEK293 へのドレブリン E および Cx43 プラスミド DNA の過剰発現

HEK293 細胞へ GFP、ドレブリン E および Cx43 を過剰発現させ、GFP 蛍光およびウェスタンブロッティングで発現確認を行った (図 2)。



ドレブリン E, Cx43 とともに強制発現させたタンパク質の発現が確認された。

Co-IP 用各種バッファの比較

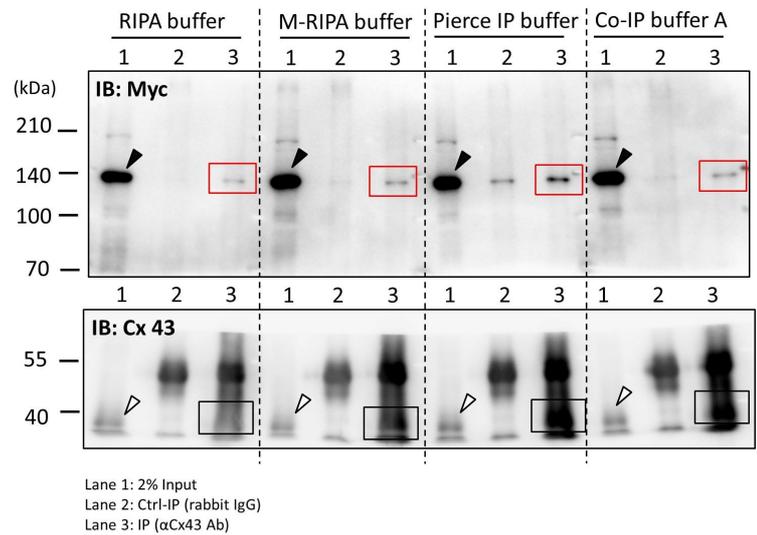
本研究における Co-IP に適したバッファ選択のため、HEK293 細胞に myc-ドレブリン E および HA-Cx43 を発現させ、

各種バッファによる抗 Cx43 抗体を用いた Co-IP を行い、検出は抗 myc 抗体を用いた (表 1 および図 3)。

Types of Co-IP Buffer	A: RIPA Buffer	B: M-RIPA Buffer	C: Pierce IP Buffer	D: Buffer A
Tris-HCl (pH 7.4)	50 mM	50 mM	25 mM	25 mM
NaCl	150 mM	150 mM	150 mM	100 mM
Triton X100	-	-	-	0.50%
NP-40	1%	1%	1%	-
Sodium-deoxycholate	0.5% (w/v)	0.25% (w/v)	-	-
SDS	0.1%	-	-	-
EDTA	1 mM	1 mM	1 mM	-
Glycerol	-	-	5%	-

表 1 各バッファの組成

図 3 各バッファによる Co-IP 効率の比較



Closed arrow heads : ドレブリン E (Input)
Red rectangles : Cx43 と共沈降したドレブリン
Open arrow heads : Cx43 (Input)
Closed rectangles: 抗 Cx43 抗体で沈降した Cx43

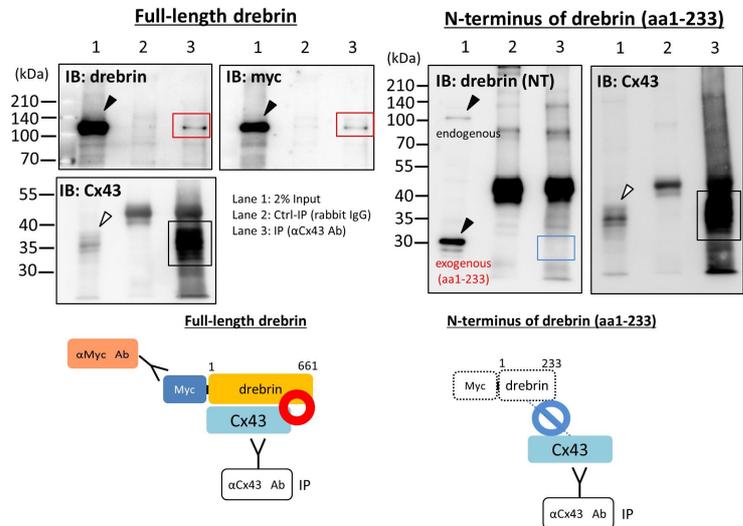
4 種を比較した結果、どのバッファでもドレブリン E - Cx43 の共沈降が確認された。その中でももっとも S/N 比が良かった Co-IP buffer A を本研究では用いることに決定した。

ドレブリンの Cx43 への結合領域の同定

ドレブリンの Cx43 への結合領域を明らかにするために、HEK293 細胞に全長ドレブリンと N 端ドレブリン (アミノ酸 1-233) を Cx43 とともに発現させ、抗 Cx43 抗体を用いた Co-IP 実験を行った (図 4)。

図 4 N 端ドレブリンは Cx43 と結合しない

Closed arrow heads : ドレブリン E (Input)
Red rectangles : 共沈降したドレブリン
Open arrow heads : Cx43 (Input)
Blue rectangle : 共沈降しない N 端ドレブリン
Closed rectangles: 抗 Cx43 抗体で沈降した Cx43



全長ドレブリンは Cx43 と共沈降するが (red rectangles) N 端ドレブリン (アミノ酸 1-233) は共沈降しなかった (blue rectangle)。

ドレブリンのリン酸化状態によるコネクシン 43 への結合能の違い

次に、ドレブリンのリン酸化状態による Cx43 への結合能の違いを検討するために、HEK293 細胞に HA-Cx43 と野生型 (Wild type, WT) Myc-ドレブリン E、リン酸化擬態型 Myc-ドレブリン E (142 セリン アスパラギン酸, S142D) もしくは、脱リン酸化型擬態型 Myc-ドレブリン E (142 セリン アラニン, S142A) を強制発現させ抗 Cx43 抗体を用いて Co-IP を行った (図 5)。

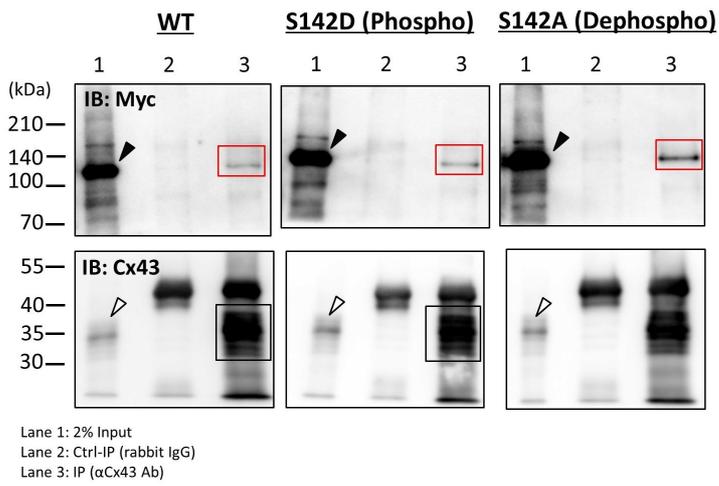


図 5 野生型、リン酸化擬態、脱リン酸化擬態ドレブリンのコネクシン 43 への結合能
Closed arrow heads : ドレブリン E (Input)
Red rectangles : Cx43 と共沈降したドレブリン
Open arrow heads : Cx43 (Input)
Closed arrow heads: 抗 Cx43 抗体で沈降した Cx43

その結果、その結果、野生型、リン酸化、脱リン酸化擬態型、いずれも Cx43 と複合体を形成することが明らかになった。

< 結論 >

本研究により、全長ドレブリンは Cx43 と複合体を形成する一方、N 端ドレブリン (アミノ酸 1-233) は複合体を形成しないことが明らかになった。一方、先行研究 (文献 5) より、N 端ドレブリン (アミノ酸 1-300) は Cx43 と複合体を形成することから、ドレブリンと Cx43 複合体の形成には、ドレブリンのアクチン結合領域 2 (アミノ酸 233-317) が重要であることが示唆された。

また、ドレブリンのリン酸化状態による Cx43 への結合能の違いを検討するために、HEK293 細胞に野生型ドレブリン、リン酸化擬態型ドレブリン (S142D) および脱リン酸化擬態型ドレブリン (S142A) を Cx43 とともに発現させ、共免疫沈降を行った。その結果、野生型、リン酸化、脱リン酸化擬態型、いずれも Cx43 と複合体を形成した。

本研究により、ドレブリンはアクチン結合領域 2 を介して Cx43 と複合体を形成することが示唆され、このことから、アクチン繊維、Cx43 のドレブリンへの結合の変化が GAP 結合の機能の変化に寄与していることが示唆された。また、セリン 142 番のリン酸化の変化が Cx43 との複合体形成には影響を与えないことから、この部位のドレブリンのリン酸化は Cx43 との複合体形成には直接的には関与しない可能性が示唆された (下図)。



< 引用文献 >

5. Ambrosi C. et al. "Connexin43 Forms Supramolecular Complexes through Non-Overlapping Binding Sites for Drebrin, Tubulin, and ZO-1. PLoS One. 11(6):e0157073 (2016)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

1. Ishizuka Y, Yamazaki H, Shirao T. (2016) "Study for interaction between drebrin and connexin 43 in glial assembly." The 59th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Fukuoka, Japan. (福岡国際会議場)

[その他]

ホームページ等
群馬大学大学院 医学系研究科 神経薬理学
<http://neuro.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白尾 智明 (SHIRAO, Tomoaki)
群馬大学大学院・医学系研究科・神経薬理学・教授
研究者番号：20171043

(2) 連携研究者

石塚 佑太 (ISHIZUKA, Yuta)
群馬大学大学院・医学系研究科・神経薬理学・助教
研究者番号：50614179