

令和元年6月17日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07069

研究課題名(和文) タンパク質翻訳後修飾による末梢神経機能調節

研究課題名(英文) Regulation of peripheral nerve function through post-translational modifications

研究代表者

馬場 広子 (Baba, Hiroko)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40271499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経線維を覆う絶縁膜である髄鞘の障害は、重度の感覚や運動障害を生じることから、髄鞘の形成・維持や病的な崩壊(脱髄)機序を明らかにすることが重要である。本研究では、髄鞘における翻訳後修飾の役割を明らかにする目的で、動物モデルを作製した。髄鞘タンパク質P0遺伝子異常はヒトで脱髄性末梢神経障害を生じるが、その病態形成に翻訳後修飾系が関わると報告されている。そこで、このP0遺伝子改変マウスを作製し、軽度あるいは重度の髄鞘形成や形態の異常あるいは脱髄を生じたことから、髄鞘における翻訳後修飾の役割を明らかにする上で有用なモデルを作製することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経髄鞘は、興奮伝導を素速く正確に行うために重要であるが、その形成や維持あるいは脱髄機序はまだ不明な点が多い。本研究では、髄鞘におけるタンパク質修飾に着目し、その解析に適した新たなマウスモデルを作製した。これらのマウスを用いることにより、髄鞘形成や形態異常、脱髄など様々な病態とタンパク質修飾との関係性を解析できるとともに、正常髄鞘の形成や維持機構の理解にも役立つ。安定した末梢髄鞘異常を示すモデルマウスは少なく、さらにP0遺伝子変異はヒトでも遺伝性末梢神経障害を生じることから、今後髄鞘の基礎研究のみでなく脱髄性疾患研究にも役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Peripheral myelin has a role in rapid and efficient nerve conduction and its damage (demyelination) causes severe sensory or motor dysfunction. Therefore, it is important to know the molecular mechanisms of myelin formation/maintenance and demyelination. In this study, to know the role of protein modification in myelin, we made genetically modified mice. The gene encoding myelin P0 is one of the responsible genes for human peripheral neuropathy, and pathogenic involvement of protein modification has been reported. We established appropriate animal model to study role of protein modification in myelin since these P0 mutant mice show various ranges of delayed myelination, morphological abnormalities and demyelination depending on their genotypes and age.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：末梢神経髄鞘 シュワン細胞 翻訳後修飾 P0 脱髄 NEDD8 ユビキチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

有髄神経軸索は、髄鞘によってランビエ絞輪、paranode、juxtaparanode、internode の4つの機能ドメインに分かれる。paranode では軸索と髄鞘間に paranodal axo-glia junction (PJ) が形成され、ドメイン構造の形成・維持と絶縁に働くとともに、軸索・髄鞘間の相互作用にも重要な場となる。また、髄鞘側の paranode では、髄鞘形成細胞の細胞体と髄鞘深層部を結ぶ輸送路としても働く。申請者は、これまでに末梢神経髄鞘の paranode 部分にタンパク質翻訳後修飾に関わる neddylation 関連分子が集積していることを見出した(Kajigaya et al, 2016)。PJ が形成されないミュータントマウスではこのような特徴的な集積状態が変化することから、PJ との関連性が示唆される。また、これらの分子は、発達段階において髄鞘形成後に集積し始めることから、出来上がった paranode の機能に関与することが考えられる。paranode 部分の髄鞘は細胞質を有し、脂質二重膜が重層した internode の部位とは構造も分子構成も大きく異なること、さらにヒトの脱髄性疾患ではこの部位から障害されることが多いことから、これらの翻訳後修飾との関連性を明らかにすることが重要と考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

髄鞘の細胞質部分 (paranode) に集積する neddylation 関連分子に着目し、この部位におけるタンパク質翻訳後修飾を明らかにすることを目的とし、この解析に適した動物モデルの作製とその解析を行なった。

3. 研究の方法

(1) neddylation 関連タンパク質解析

髄鞘において neddylation による翻訳後修飾を受けているタンパク質分子を調べるために、末梢神経ホモジネートの各画分を解析した。これらの画分のタンパク質を通常の SDS-PAGE および 2次元電気泳動 (CTAB/SDS-PAGE) によって分離し、抗 Nedd8 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

(2) 動物モデルの作製およびその解析

翻訳後修飾と髄鞘異常との関連性を調べるために、CRISPR-Cas9 法を用いて末梢神経髄鞘特異的タンパク質 P0 遺伝子の遺伝子改変マウスを作製した。運動機能解析および電気生理学的解析は、成熟マウスを用いて行った。また、成熟および各発達段階のマウス坐骨神経を用いて免疫組織学的および電子顕微鏡解析を行った。

電子顕微鏡解析には、自然科学研究機構が行なっている先端バイオイメージング支援プラットフォーム (Advanced Bioimaging Support: ABIS) の支援 (18D-17C-013-E07) を受けて実施した。

動物実験および組換え DNA 操作に関しては、東京薬科大学の各関連委員会に申請し、学長承認を受けた上で関連規定を遵守して実施した。

4. 研究成果

(1) neddylation 関連タンパク質解析

以前に実施した免疫組織学的解析により、末梢神経組織内において Nedd8 などの neddylation 関連分子が髄鞘両端の paranode 部分に集積していることから (Kajigaya et al, 2016) 実際 neddylation で修飾された分子を調べるために坐骨神経ホモジネートの全画分、膜画分、可溶性画分のウエスタン解析を行った。その結果、分子量約 55~70k および約 40k 付近に各々複数の陽性バンドが見られた。また、2次元電気泳動後のウエスタン解析によって、Nedd8 陽性スポットが、これまでに同定されていない髄鞘関連分子であることが示された。これらの結果から、髄鞘において複数の neddylation 関連タンパク質が存在することが明らかとなった。

(2) 動物モデルの作製およびその解析

(1)の結果により分子量 40~70k の複数の neddylation 関連タンパク質が正常な髄鞘の paranode に存在することが明らかになり、2次元電気泳動を用いた解析ではこれまでに同定された髄鞘構成タンパク質とは異なることがわかったが、MASS 解析では各分子の同定に至らなかった。このため、翻訳後修飾と髄鞘との関連性を解析できるようなマウスモデルの作製を行った。末梢神経髄鞘の主要構成タンパク質である P0 は、その遺伝子異常によりヒトの遺伝性脱髄性末梢神経障害を生じる。P0 遺伝子異常による病態形成にはタンパク質翻訳後修飾系が関与することが報告されている (VerPlank et al, *Glia*:66:379-395, 2017) ことから、P0 遺伝子改変動物を作製した。P0 遺伝子改変マウス(以下改変マウス)はメンデルの法則に則って誕生し、生後早期の発達段階には明らかな異常を認めなかった。

成熟マウスの運動機能を tail suspension test および rotarod test で解析した結果、野生型 (Wld) マウスに比較して改変マウスにおいて明らかな運動障害を認めた。障害の程度は、ヘテロ接合体 (Het) に比べてホモ接合体 (Hom) マウスで有意に大きく、また加齢とともに進行した。筋組織染色切片では神経原性の病変が認められ、電気生理学的解析では、Hom および Het

マウスにおいて下肢の神経伝導速度の低下が見られた。さらに、Hom マウスでは複合筋活動電位 CMAP の振幅が明らかに低下していることから、軸索変化を伴う髄鞘異常の可能性が考えられた。

免疫組織学的解析では、Hom マウスにおいて paranode 部分のタンパク質の集積異常があるほか、末梢神経髄鞘に特徴的に見られる構造で髄鞘最外層を縦走するカハールバンドの形成不全を認め、シュワン細胞体と髄鞘各部位とを結ぶ輸送路としてはたらく細胞質部分の分布に異常を示した。Het マウスでは、Hom マウスより軽度ではあるが同様な変化が見られた。

成熟マウス坐骨神経の準超薄切片を用いた解析では、Hom マウスで有髄神経線維が明らかに少なく、ヒトの遺伝性末梢神経障害で観察されるような tomacula 様の所見が多数見られた。Het マウスでも Hom マウスに比して軽度な変化があった。両マウスともに脱髄を示す所見も観察された。発達期の Hom および Het マウスと Wild マウスの末梢神経を用いた準超薄切片の光学顕微鏡解析により、改変マウス、特に Hom マウスにおいて髄鞘形成開始に明らかな遅延が見られた。

有髄神経では、軸索径の大きさと髄鞘の厚さとの関係性を示す *g*-ratio は、常に 0.6~0.7 と一定値に保たれる。Hom マウスと Wild マウスを用いて電子顕微鏡解析を行った結果、Hom マウスでは Wild マウスに比して明らかに軸索径に対する髄鞘の厚さが薄く、さらに軸索径自体も細いことがわかった。また、免疫組織学的解析結果と一致して、paranode 部分の髄鞘の形態異常およびカハールバンドの形成異常が見られた。さらに、接着分子である P0 の細胞質ドメインの異常に伴い、internode の脂質二重膜重層部分において、隣接する細胞質側の脂質二重膜同士の間隙部 major dense line (MDL) の解離と細胞質の混入あるいは層構造自体の部分的な開大が認められた (ABIS の支援による)。

以上の結果、翻訳後修飾に関わると考えられている P0 遺伝子改変マウスでは、neddylation 関連分子が集積すると考えられる髄鞘の細胞質部分が特に大きく変化していること、さらに、週齢の異なる Hom および Het マウスを用いることで、様々な段階の髄鞘形成あるいは形態異常および脱髄状態を得られることが明らかとなり、正常な髄鞘のみでなく遺伝性末梢神経障害あるいはその他の脱髄における翻訳後修飾との関連性を調べていく上でも有用なマウスモデルであることが示された。

<引用文献>

Kajigaya H, Ishibashi T, Hayashi A, Yamaguchi Y, Baba H. Concentration of neddylation-related molecules in paranodal myelin of the peripheral nervous system. Proc. Jpn. Acad., Ser. B 92:56-68, 2016

VerPlank JJS, Lokireddy S, Feltri ML, Wrabetz L. Impairment of protein degradation and proteasome function in hereditary neuropathies. Glia 66:379-395, 2018.

本研究で得られた結果は、2 編の論文としてまとめ現在投稿および投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件) 投稿準備中

〔学会発表〕(計 3 件)

Yamaguchi Y, Otani Y, Cui J, Baba H. Neuroscience 2018, Society for Neuroscience (国際学会), 2018

Baba H, Yamaguchi Y. Cold Spring Harbor Asia: Novel Insights into Glia Function & Dysfunction (国際学会、招待講演), 2018

大谷嘉典、山口宜秀、崔晶晶、馬場広子 第 61 回日本神経化学会・第 40 回日本生物学的精神医学会 合同年会, 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願・取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

機能形態学教室ホームページ: <http://www.ps.toyaku.ac.jp/kino-keitai/youkoso.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：山口 宜秀
ローマ字氏名： Yamaguchi Yoshihide
研究協力者氏名：大谷 嘉典
ローマ字氏名： Otani Yoshinori
研究協力者氏名：大野 伸彦（ABiS 支援者）
ローマ字氏名： Ohno Nobuhiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。