

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008-2009

課題番号：20791195

研究課題名（和文）

聴覚伝導路特異的細胞外マトリックスBral2による聴覚伝達維持機構の解析

研究課題名（英文）

Bral2 is essential for the maintenance of the extracellular microenvironment for the synaptic transmission in the auditory system.

研究代表者

別宮 洋子 (BEKKU YOKO)

岡山大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：60397875

研究成果の概要（和文）：

脳には、神経細胞とグリア細胞が存在する。その細胞間をうめる物質として、細胞外マトリックス(ECM)が存在する。ECMには、ヒアルロン酸やプロテオグリカンなどがある。脳では、それらは特に神経細胞膜周囲とランビエ絞輪に多く存在している。Bral2は、聴覚系の神経伝導路（耳から脳に刺激が伝わる経路）に存在するECMである。ヒアルロン酸、プロテオグリカンと一緒に複合体を作って存在している。今回の研究から、その複合体が刺激を伝えるために必要であること、Bralは複合体を形成する時に鍵となる分子であることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

There are two types of cells in the brain; the neuronal cell and glial cell. Extracellular matrix (ECM), such as hyaluronan and proteoglycan, exists in extracellular region of these cells. There are two dense organized ECM in the brain, one is in the perineuronal net (PNN) and other is at the node of Ranvier. The PNN is a mesh like structure surrounding the neuronal cell. Bral2 forms ECM complex with hyaluronan and proteoglycan, and is localized in the PNN of the auditory system. In this study, it is strongly suggested that Brals play key roles in the ECM assembly and the complex is essential for the neuronal activity through the analysis of Bral - deficient mice

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子神経生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：神経科学、聴覚伝導路、細胞外マトリックス、神経細胞周囲網、プロテオグリカン

1. 研究開始当初の背景

ECM分子Bral2(Brain link protein 2)は、脳幹に存在する神経核を中心に発現し、聴覚神経回路の中継核のほぼすべてを網羅するという特徴的な発現パターンを示す(Bekku et al., 2003)。Bral2は、リンクプロテイン(LP)の一種で、ヒアルロン酸(HA)結合型コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)およびHAとともに複合体を形成する。LPは、その複合体形成及び安定化に必須の分子であると考えられている。Bral2は、CSPGの中でもブレビカンと共局在する事がわかっている。CSPGは発生初期より発現し、成体になると脳では神経細胞周囲網(PNN)と呼ばれる、神経細胞周囲の網目状構造に多く存在するようになる。このPNNの働きとして、1)新たなシナプス形成の阻害による神経可塑性の制御、2)シナプスの固定化に関わっていると推測されている。Bral2も同様にPNNパターンを示す。なおかつ、そのパターンは聴覚伝導路特異的である。巨大分子複合体の機能は、果たして1)2)という役割だけであろうか？

CSPGは、コアタンパクにグリコサミノグリカン(GAG)鎖を付加した状態で存在する巨大分子であり、またHAもGAGの一種である。GAG鎖は、負の電荷を多く持つ性質から陽イオンおよび水分子を引き寄せる性質があり、水分子を含むゲル状で存在するといわれている(Hardingham and Fosang, 1992他)。別のBralであるBral1は、中枢神経系(CNS)のランビエ絞輪のみに限局する(Oohashi et al., 2002)。即ち、Bral1、Bral2いずれも神経伝導あるいは伝達に関係し、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} などの陽イオ

ンが多く必要とされる場に存在する。これらのことから、CSPG複合体の脳における役割は、陰イオンとの電氣的相互作用あるいは水和により陽イオンをストックし、必要時にイオンを供給できるイオン交換複合体として脳機能恒常性維持に関わっている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

PNNは、多くのCSPGが同定されているが、すべてが全く同じ神経核に存在しているわけではない。すなわち、ECM複合体の形成様式が異なることが予測されるが、今のところわかっていない。すでに、Bral2の欠損マウスが作製されているため、まずこれを欠損マウス解析により明らかにすることを目的とした。

さらに、その機能に関しては、PNNは多くがkv3.1bというカリウムチャンネルと共局在することが昔から知られている。聴覚伝導路では、聴覚特有の高周波に対応する、短くて継続性のある活動電位の発生にkv3.1bが関わっていると言われている(Song P et al., 2005; Zettel M et al., 2007)。Kv3.1bは素早い再分極を担う事で、連続する活動電位の発生が可能となっている。即ち、聴覚伝導路には素早くイオンをストックあるいは供給できる環境が必要であると考えられる。従って、Bral2を中心とするECM複合体は、聴覚伝導路の微小環境を調節している可能性が十分考えられた。よって、本課題では、聴覚伝導路において、1) Bral2複合体がイオン交換体としての役割を担い得るかどうか、2) シナ

プス伝達に関わるかどうかを明らかにし、聴覚伝導のメカニズムの一端を解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

これらの目的を明らかにするため、以下の研究をおこなった。

(I) Bra12欠損マウスにおけるCSPG及びそれに結合する分子への影響：免疫染色法、ウェスタンブロット法により解析した。

(II) Bra12を中心とするCSPG複合体と伝達に関わる分子等との関連：PNNと共局在するチャンネルなどへの影響を免疫染色により確認した。

(III) Bra1を中心とするCSPG複合体欠損が細胞外スペース(ECS)に及ぼす影響：脳内の細胞外物質拡散係数(ADC_w および ADC_{TMA})の計測を行った

(IV) Bra12欠損マウスにおける聴覚の測定：聴覚脳幹誘発電位を含むいくつかの聴覚検査をおこなった。

4. 研究成果

まず、Bra12欠損マウスにおいて、CSPG複合体を構成する分子の変化が神経核によって異なることを突き止めた。つまり、神経核によって複合体の形成様式が異なることが強く示唆された。

次に、聴覚伝導路に見られるチャンネルであるKv3.1b及び、ペリニューロナルネットとともに発現が見られるパルプアルブミンの発現を調べた。これらについては特に発現に変化がなかったため、複合体はこれらの局在にとくに役割を果たしていないことがわかった。

更に、Bra1を中心とするCSPG複合体欠損が細胞外スペース(ECS)に及ぼす影響を調べるために、細胞外物質拡散係数を計測した。

Bra12の存在部位が聴覚伝導路であるため、細胞外物質拡散係数を計測するには、従来の測定方法に試行錯誤が必要な部位であった。従って、まず比較的計測し易いランビエ絞輪に存在する、Bra11の欠損マウスを使用しその性質を推し量ろうとした。ランビエ絞輪も、Bra12同様、CSPGが存在する場所である。

拡散係数計測に先立ち、まずランビエ絞輪のECM複合体の構成を詳細に調べた。すると、ランビエ絞輪の直径の太さによってECM複合体の構成が異なり、太い方がより複雑なECM複合体を有することがわかった。この結果は、神経活動にECM複合体が関与するのではないかという仮説を支持するものであり、太さにより差異があることは世界で初めて示されたので、神経学分野でも国際的にハイレベルのジャーナルである、*Journal of Neurochemistry*に掲載された(Bekku et al., 2009)。

その結果を踏まえて、Bra11欠損マウスを解析したところ、Bra11がECM複合体のキーマン子となっていることがわかった。すなわち、Bra11欠損マウスでは、CSPG他ECMが、ランビエ絞輪周囲には存在できない。拡散係数を計測したところ、Bra11欠損マウスでは、野生型と比べて拡散係数が早くなっていることがわかった。

つまり、イオンの拡散を妨げる物質として、ECM複合体が存在することがわかった。このマウスでは跳躍伝導速度も遅くなっており、世界で初めて、ECM複合体が跳躍伝導においてイオンをストックするという役割を果たしているのではないかという性質を示すことができた。この成果は、神経学分野では国際的にトップジャーナルである、*Journal of Neuroscience*に掲載された(Bekku et al., 2010)。さらに、国内でも注目されて山陽新聞に取り上げられた。

また、Bral2 欠損マウスでは、聴覚検査の結果、聴覚にやや異常がみられた。今後、細胞外物質拡散係数の測定は、Bral1 での技術もとに改良して Bra12 に応用し継続していくとともに、PNN の聴覚における CSPG 複合体の役割をさらに追求していく予定にしている。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Bekku Y, Vargova L, Goto Y, Vorisek I, Dmytrenko L, Narasaki M, Ohtsuka A, Fässler R, Ninomiya Y, Sykova E and Oohashi T, Bral1 : its role in diffusion barrier formation and conduction velocity in the CNS. *J Neurosci*, 査読有, 30(8) 2010:

3113-3123

② Bekku Y, Ninomiya Y and Oohashi T, Brevican organizes hyaluronan-binding extracellular assemblies distinctively at the large diameter nodes of Ranvier in the CNS. *Neurosci Res*, 査読無, 2009; 65 (suppl. 1): S73

③ Bekku Y, Rauch U, Ninomiya Y and Oohashi T, Brevican distinctively assembles extracellular components at the large diameter nodes of Ranvier in the CNS. *J Neurochem*, 査読有, 108(5) , 2009:1266-76

④ Kang JS, Kawakami Y, Bekku Y, Ninomiya Y, Belmonte JCI and Oohashi T, Molecular cloning and developmental expression of a hyaluronan and proteoglycan link protein gene, *crtl1/hapln1*, in zebrafish. *Zoological Science* 査読有, Vol 25, Issue 9, 2008, pp. 912-918

[学会発表] (計 5 件)

① Bekku Y, Rauch U, Ninomiya Y, and Oohashi T; Brevican organizes hyaluronan-binding

extracellular assemblies distinctively at the large diameter nodes of Ranvier in the CNS; Neuroscience 2009 第 32 回日本神経科学学会大会, 2009 年 9 月 16 日-18 日, 名古屋

② Bekku Y, Vargova L, Goto Y, Vorisek I, Fässler R, Ninomiya Y, Sykova E and Oohashi T; The nodal ECM barrier model in the CNS: From an extracellular ion diffusion analysis in Bral1-deficient mice; Ninth Biennial Satellite Meeting of the ISN on Myelin Biology, Myelin Development, Function and Related Diseases Conference; 2009 年 8 月 19 - 23 日, Gyeongju, S. Korea

③ Bekku Y, Vargova L, Goto Y, Ninomiya Y, Sykova E and Oohashi T; The ion-diffusion barrier model at the node of Ranvier: From an extracellular ion diffusion analysis in Bral1-deficient mice;; 第 36 回国際生理学会大会、2009 年 7 月 27 日-8 月 1 日, 京都

④ Bekku Y, Rauch U, Ninomiya Y, Oohashi T; Brevican determines specialization of the hyaluronan-binding nodal matrix assemblies at the large diameter nodes of Ranvier in the CNS; 第 56 回マトリックス研究会大会、8th Pan-Pacific Connective Tissue Society Symposium, 2009 年 6 月 4 日-7 日, 神奈川

⑤ Vargova L, Dmytrenko L, Vorisek I, Bekku Y, Oohashi T; Deletion of the brain-specific link protein Bral-1 facilitates extracellular diffusion in the mouse corpus callosum. and E. Sykova; SfN 2008, 2008 年 11 月 15 日-19 日, Washington DC, USA

[その他]

報道情報 (計 2 件)

① 岡山大学プレスリリース平成 22 年 2 月 23 日

② 山陽新聞掲載平成 22 年 3 月 16 日

ホームページ：
<http://www.mbb-okayama.com/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

別宮 洋子 (BEKKU YOKO)
岡山大学・医学部・技術専門職員
研究者番号：60397875