

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460267

研究課題名(和文) シュワン細胞の膜骨格構造における蛋白複合体の解析

研究課題名(英文) Analyses of protein complex in Schwann cell membrane skeletal structures

研究代表者

寺田 信生 (TERADA, Nobuo)

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号：60293461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：シュワン細胞で膜骨格蛋白4.1ファミリー4.1Gが髄鞘内シュミット・ランターマン切痕の形態に関与し、遺伝子欠損でシグナル蛋白Membrane protein palmitoylated (MPP) 6と接着分子 Cell adhesion molecule (CADM) 4の局在化消失、癌関連蛋白Srcのリン酸化を明らかにした。生体内凍結技法により、伸展した末梢神経線維は数珠状となり切痕部位での緩衝機構を直接可視化できた。この凍結技法でアルブミンも保持でき正確な局在を明らかにした。また神経で見出した4.1とMPPファミリー複合体をマウス腸管上皮細胞でも検討した。

研究成果の概要(英文)：We clarified that a membrane skeletal 4.1 family, 4.1G, is involved in Schmidt-Lanterman incisure in myelin of Schwann cells, and have roles in sorting of membrane protein palmitoylated (MPP) 6, cell adhesion molecule (CADM) 4 and phosphorylation of Src. In vivo cryotechnique revealed beaded appearance and protective reaction of the incisures in stretched peripheral nerve fibers, as well as accurate localization of albumin. In addition, we analyzed relationship between the 4.1 and MPP families in mouse intestinal epithelial cells.

研究分野：細胞組織学

キーワード：膜骨格 シュワン細胞 凍結技法 末梢神経系

1. 研究開始当初の背景

赤血球の「膜骨格」は、スペクトリン - アクチンからなる線維状蛋白にプロテイン 4.1R、シグナル蛋白 MPP (membrane protein palmitoylated) 1、膜内蛋白 Glycophorin C が複合体形成した網目状構造で、赤血球が血管内で流動する際の外力に抗する形態保持の役割が知られている。研究代表者らは、この 4.1R のファミリー蛋白である 4.1G および 4.1B の詳細な組織細胞内局在について神経系をはじめとして種々の臓器・組織に世界に先がけて見出し、さらに独自に両遺伝子欠損マウスを作製していた。また複合体蛋白の局在解析のための顕微鏡観察試料作製手段に、従来の試料作製法に加えて急速凍結技法や生体内凍結技法による最新の形態学的解析法を用いられる状況にあった。

そこで本研究では、それまで明らかにした 4.1B および 4.1G の局在を基にして、作製した 4.1B および 4.1G 遺伝子欠損マウスの検討を加えて、末梢神経系での“膜骨格の視点からの細胞膜の安定保持とシグナル伝達の構造基盤”を追究する点にあった。

2. 研究の目的

(1) 髄鞘形成における構造やシグナルに関わる複合体形成蛋白の探索

髄鞘を形成する新規蛋白を同定し、さらにそれらの蛋白複合体としての連関を解析することを目的とした。そのために関連蛋白の候補の発現と結合性を検討し可能性の高いものを絞り込んだ。

(2) 光学顕微鏡および電子顕微鏡による関連蛋白局在の解析

髄鞘を形成する新規蛋白について遺伝子改変マウスを作製し、その形態と機能変化を野生型マウスと光学顕微鏡、電子顕微鏡レベルでの比較検討を目的とした。神経系ではヒトでも遅延性に神経疾患が発症することがあるように、マウスの加齢による経時的変化が想定され、形態および蛋白発現と局在を詳細に検討した。

(3) 凍結技法による顕微鏡 3次元蛋白複合体解析法の開発

髄鞘を形成するシグナル蛋白の接着蛋白などとの相互位置関係を明らかにすることを目的とした。シグナル蛋白、膜骨格蛋白、膜内接着蛋白が運動した機構が大切と思われるが、生体に本来ある水分を加味した形態解析法の必要性として、神経線維の運動時における形態変化の解析に生体内凍結技法による蛋白局在解析法の開発を試みた。構造蛋白として、伸縮を自在にしながら血管を流れる赤血球にある膜骨格蛋白に着目し、神経線維の伸展をグリア細胞が検知して保護している可能性を仮説とした。

(4) 腸管上皮細胞における膜骨格を構成する蛋白複合体の検討

さらに私たちが末梢神経に見出した 4.1 ファミリーと MPP ファミリーの関係をより追求するために、これまで報告したマウス腸管における 4.1 ファミリー-4.1B に着目した。MPP ファミリーについて腸管での研究がなかったため、単層円柱上皮をもち細胞局在が判別しやすいマウス小腸を用いて膜骨格蛋白の局在解析とシュワン細胞と比較しながら相互関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 顕微鏡による関連蛋白の局在解析

従来の形態のための試料作製法として、麻酔マウスの心臓よりアルデヒド還流固定、坐骨神経や大脳の神経組織を摘出し、後固定後、脱水、包埋して切片を作製した。

蛋白分布について、光顕および電顕のため免疫染色のためには、アルデヒド固定後、蔗糖を浸透させ、クライオスタットで凍結切片を作製。シグナル蛋白や膜骨格蛋白への抗体、および既知の接着装置蛋白(閉鎖結合:ZO-1(基底分画と側面分画の境界に局在);密着結合:カドヘリン、カテニン、さらに種々イオンチャネルや髄鞘蛋白に対する抗体を用いて、多重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により、免疫蛍光組織像観察をして局在を比較した。

(2) 凍結技法による顕微鏡解析法の開発

神経線維におけるシグナル蛋白、膜骨格蛋白もしくは膜内貫通蛋白の局在について、生体内凍結技法を用いて解析した。この方法では細胞接着の生体内における状態の空間的に保持した位置での解析に優れるが、その理由は通常の化学固定、アルコール脱水などの試料処理に伴う組織収縮などによる細胞間の位置関係の変化やそれに伴う組織収縮が改善されるためである。

具体的には麻酔下マウスを開腹後、神経系や消化管の臓器を露出し、血流が維持された組織に液体窒素で冷却したイソペンタン・プロパン混合液(-193°C)を直接かけて生体内凍結した。電顕のためには、凍結メス刃による切断を併用した。生体内凍結標本を凍結置換固定し、包埋、切片作製し、光顕と電顕で観察した。

(3) 末梢神経と腸管の複合体蛋白の生化学的検討

末梢神経については、免疫沈降法を用いて最適条件設定を探り蛋白複合体の検証を行った。この際、保有する 4.1B および 4.1G 遺伝子欠損マウス試料における複合体形成の比較が有用であった。

腸管については、麻酔下でマウス小腸を摘出し Laemmli sample buffer または Triton X-100 で溶解後、上清の蛋白濃度を調整、電

気泳動後プロット膜に転写し、目的蛋白に対する抗体で免疫染色した。また免疫沈降には、マウス小腸上清を抗 MPP6 抗体で沈降して電気泳動、プロット膜に転写、抗 Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK) 抗体で免疫染色した。

4. 研究成果

(1) 神経系におけるシグナル蛋白と膜骨格蛋白の役割

マウス神経系の髄鞘の構造体であるシュミット・ランターマン切痕 (SLI) における 4.1G を含む蛋白複合体について遺伝子欠損マウスを用いて解析し、シグナル蛋白 MPP6 と接着分子 CADM4 蛋白との結合を見出した。MPP ファミリー蛋白は微小管などの細胞骨格の輸送に関わるシグナル蛋白と考えられているが、4.1G 欠損マウス神経線維では MPP6 が激減していることから、4.1G が MPP6 の局在を規定していた。一方 CADM4 も 4.1G 欠損で消失したことより、4.1G による CADM4 の膜内輸送～局在化の役割が明らかとなった。

さらに癌関連遺伝子 Src が MPP6 と結合し、4.1G 欠損では Src リン酸化状態が変化していることが明らかとなった。Src は細胞質や核内蛋白とリン酸化を介したシグナル伝達が知られていることから、膜骨格のシグナル開始の役割が示唆された (図 1)。

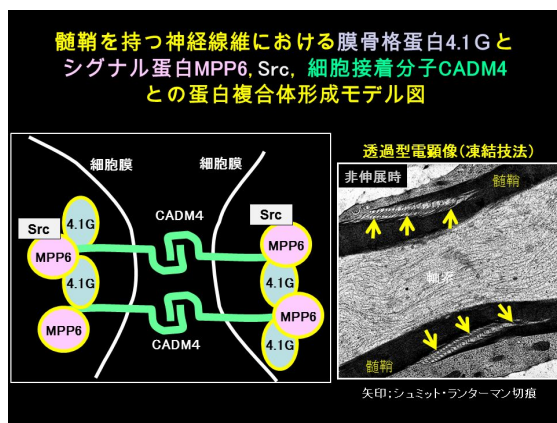


図 1

(2) 凍結技法を用いた顕微鏡試料作製法

4.1G 欠損の神経線維への表現型として、高月齢の 4.1G 欠損マウス坐骨神経における SLI 円錐台の高さが、野生型と比較して優位に減少したことより、形態形成に関与することがわかった。赤血球においては、4.1 ファミリー蛋白 4.1R が欠損すると溶血性貧血という病態を起こす。外力による神経線維の変化を明らかにするために、神経線維を伸縮させた状態で直接凍結する生体内凍結技法を行い、SLI の髄鞘における位置と形態変化を検討した。髄鞘を含む神経線維は進展時に数珠状に変化し、その変化に合わせて SLI がバネ状に円錐台の高さが変化していた。このことは前項に述べた赤血球の溶血性貧血のよ

うな機械的ストレスへの適応機能と対比させながら、神経疾患が比較的時間をかけて発症していく病態の一つの説明になると考えている (図 2)。

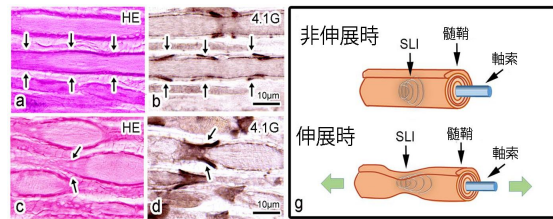


図 2

また、可溶性蛋白であるアルブミンは従来の固定 - 脱水過程で容易に溶出してしまいが、生体内凍結 - 凍結置換固定を用いることで組織切片内にそのまま保持して免疫染色によって解析できることを明らかにした。

このように凍結技法を用いて、正確な蛋白複合体の構造解析に応用できると考えている。

(3) MPP6 の腸管における局在と結合蛋白

末梢神経で見出した MPP6 の腸管における局在の検討では、免疫染色によって MPP6 は腸陰窩から腸絨毛における上皮細胞側底面の細胞膜直下に局在することを見出した。この MPP6 の局在は E-cadherin とは類似するが ZO-1 とは異なり、電子顕微鏡による超微形態での染色部位からも上皮細胞側面頂上部の tight junction への局在はわずかであった。

マウス小腸上皮における 4.1B と MPP6 の局在を比較すると、腸絨毛では類似していたが、腸陰窩では MPP6 のみで染色が得られ、それらは細胞質に局在していた。免疫染色による 4.1B 欠損マウス小腸における MPP6 の免疫染色性や局在部位は野生型マウスと変わらず、Western blot による蛋白発現量でも変化は認めなかった。このことから、小腸上皮において 4.1B は MPP6 の局在化に必須ではないことが明らかとなった。

さらに 4.1 ファミリーの 4.1G と 4.1N は、野生型マウス小腸で神経線維にはあるが上皮において局在を認めないことと、4.1B 欠損マウス小腸においての局在と発現にも変化が無かったことから、ファミリー蛋白による補填の可能性も低いと考えられた。

一方、免疫沈降法によって抗 MPP6 抗体で得た沈降物に、CASK の分子量を示す Western blot によるラインが得られたことから、CASK と MPP6 の結合が明らかとなった。

以上の結果から、神経線維内髄鞘で精密に制御された部位の構成蛋白を同定し、それらの分子複合体を明らかにすることによって、細胞膜間接着の構造さらにシグナル蛋白と連動する膜骨格部位は、細胞膜直下においてシグナルの検知と伝達が行われている細胞膜直下から細胞質における機能現場であることが考えられた。これらの知見はシグナルの検知、伝達、応答の構造的基礎の理解に役

立つと思われ、さらに今後これらの蛋白の破綻の検討により、ヒトにおける未知の脱髄神経疾患の解明につながると考えている。

また末梢神経で見出した MPP6 について接着部位に関連して、マウス小腸上皮における MPP6 の CASK と結合した膜骨格蛋白複合体としての機能が示唆された。ただし 4.1 ファミリー-4.1B を欠損しても MPP6 の局在は保持されたことから、末梢神経でみられた 4.1 に依存した MPP の輸送とは異なる機構をもつ可能性があり、今後の検討が必要である。

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 11 件)

Terada N, Saitoh Y, Kamijo A, Ohno S, Ohno N. Involvement of membrane skeletal molecules in the Schmidt-Lanterman incisure in Schwann cells. *Med Mol Morphol* Nov 5, 2015 (査読有)

Kamijo A, Saitoh Y, Ohno N, Ohno S, Terada N. Immunohistochemical study of the membrane skeletal protein, membrane protein palmitoylated 6 (MPP6), in the mouse small intestine. *Histochem Cell Biol* Oct 26, 2015 (査読有)

Miyamoto Y, Torii T, Takada S, Ohno N, Saitoh Y, Nakamura K, Ito A, Ogata T, Terada N, Tanoue A, Yamauchi J. Involvement of the Tyro3 receptor and its intracellular partner Fyn signaling in Schwann cell myelination. *Mol Biol Cell* 26:3489-3503, 2015 (査読有)

Kamijo S, Saitoh Y, Ohno N, Ohno S, Terada N. Immunohistochemical study of mouse sciatic nerves under various stretching conditions with “in vivo cryotechnique”. *J Neurosci Methods* 227: 181-188, 2014 (査読有)

Saitoh Y, Terada N, Ohno N, Hamano A, Okumura N, Jin T, Saiki I, Ohno S. Imaging of thrombosis and microcirculation in mouse lungs of initial melanoma metastasis with in vivo cryotechnique. *Microvasc Res* 91:73-83, 2014 (査読有)

Wu B, Ohno N, Saitoh Y, Bai Y, Huang Z, Terada N, Ohno N. Immuno- and Enzyme-histochemistry of HRP for demonstration of blood vessel permeability in mouse thymic tissues by “in vivo cryotechnique”. *Acta Histochem Cytochem* 47:273-288, 2014 (査読有)

齊藤百合花、寺田信生、大野伸彦、大野伸一。生体内凍結技法による肺組織切片標本上での生体物質分布と血行動態の可視化法。山梨医科学雑誌 29:11-18,

2014 (査読有)

Chen J, Terada N, Saitoh Y, Huang Z, Ohno N, Ohno S. Detection of MAPK signal transduction proteins in ischemia/reperfusion model of mouse intestine using in vivo cryotechnique. *Histochem Cell Biol* 140:491-505, 2013 (査読有)

Huang Z, Ohno N, Terada N, Saitoh Y, Chen J, Ohno S. Immunohistochemical detection of angiotensin II receptors in mouse cerebellum and adrenal gland using “in vivo cryotechnique”. *Histochem Cell Biol* 140:477-490, 2013 (査読有)

Kim KH, Akase Z, Shindo D, Ohno N, Fujii Y, Terada N, Ohno S. Electron holography study of the charging effect in microfibrils of sciatic nerve tissues. *Microsc Microanal* 5:54-57, 2013 (査読有)

Terada N, Saitoh Y, Ohno N, Komada M, Yamauchi J, Ohno S. Involvement of Src in the membrane skeletal complex, MPP6-4.1G, in Schmidt-Lanterman incisures of mouse myelinated nerve fibers in PNS. *Histochem Cell Biol* 140:213-222, 2013 (査読有)

[学会発表](計 16 件)

寺田信生、齊藤百合花、上條明生、大野伸彦。膜骨格蛋白複合体がもたらす組織構築。(シンポジウム;最近の技術から見てきた細胞膜受容体の新しい側面)第 38 回日本分子生物学会年会 神戸 2015 年 12 月 3 日

齊藤百合花、寺田信生、齊藤成、大野伸彦。マウスメラノーマ肺転移巣における I 型肺胞上皮細胞による微小封鎖環境の形成と血行動態の免疫組織化学的検討。日本解剖学会第 75 回中部支部学術集会 福井 2015 年 10 月 3 日

寺田信生、齊藤百合花、大野伸彦。磁性流体を用いたマウス坐骨神経へのアデノウイルス遺伝子導入法および磁界可視化法。日本解剖学会第 75 回中部支部学術集会 福井 2015 年 10 月 3 日

齊藤百合花、寺田信生、齊藤成、大野伸一、大野伸彦。肺転移癌組織における組織構築と薬物分布の関連性の解析。第 47 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 長崎 2015 年 9 月 18 日

寺田信生、齊藤百合花、上條明生、大野伸彦。膜骨格蛋白 Membrane Protein Palmitoylated 6 (MPP6) のマウス小腸における結合蛋白の検討。第 47 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 長崎 2015 年 9 月 18 日

上條明生、齊藤百合花、大野伸彦、寺田信生。マウス小腸における膜骨格蛋白 Membrane Protein Palmitoylated 6 の免疫組織化学的検討。第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 神戸 2015 年 3 月 21 日

齊藤百合花、寺田信生、齊藤成、大野伸彦。生体内凍結技法による肺組織内マウスメラノーマ転移巣における血行動態と酸欠シグナル分子の同時イメージング。第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 神戸 2015 年 3 月 21 日

上條明生、齊藤百合花、大野伸彦、大野伸一、寺田信生。マウス坐骨神経における膜骨格蛋白 4.1G との抗 angiomin 抗体の免疫交差反応性の検討。第 74 回日本解剖学会中部支部学術集会。金沢 2014 年 10 月 11 日

寺田信生。生きた動物生体内臓器の動的機能分子形態像の解析。(学会奨励賞受賞講演) 第 46 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会。東京 2014 年 10 月 17 日

寺田信生、齊藤百合花、大野伸彦、上條明生、大野伸一。生きたマウス末梢神経線維の伸展機能状態下構造とシグナル分子機構の解析。(ワークショップ; 神経の構造と機能をもたらず分子を捉える) 第 55 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 松本 2014 年 9 月 27 日

寺田信生、齊藤百合花、大野伸彦、大野伸一。動物生体内臓器の機能的イメージング像を探る試料作製法。(シンポジウム; 最近の顕微解析法が拓く機能分子解剖学の展開) 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 栃木 2014 年 3 月 29 日

寺田信生、齊藤百合花、大野伸彦、大野伸一。マウスおよびヒトメラノーマ株細胞とマウスメラノーマ皮下移植モデルにおける膜骨格蛋白 4.1 ファミリーの免疫組織化学的検討。第 73 回日本解剖学会中部支部学術集会、甲府、2013 年 10 月 5 日

上條明生、齊藤百合花、大野伸彦、大野伸一、寺田信生。種々伸展状態下マウス坐骨神経における機能的形態像および血清蛋白分布の 3 次元解析法。第 73 回日本解剖学会中部支部学術集会、甲府、2013 年 10 月 5 日

寺田信生、齊藤百合花、大野伸彦、大野伸一。高速変化する生体物質の細胞内分子構造に対応した凍結組織切片での機能形態像。(シンポジウム; バイオイメージングと病態解析応用の接点を探る)

第 45 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、福岡、2013 年 9 月 14 日

齊藤百合花、寺田信生、大野伸彦、大野伸一。生体内凍結技法による種々病態下マウス肺組織内循環動態の可視化。第 45 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、福岡、2013 年 9 月 13 日

上條明生、齊藤百合花、大野伸彦、大野伸一、寺田信生。生体内凍結技法によるマウス下肢屈伸状態下坐骨神経組織の免疫組織化学的検討。第 54 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、東京、2013 年 9 月 13 日

〔図書〕(計 3 件)

Ohno S, Ohno N, Terada N (Editors). In vivo cryotechnique in biomedical research and application for bioimaging of living animal organs. Springer 2015, 300

Terada N, Saitoh Y, Ohno N, Ohno S. Membrane skeleton in Schmidt-Lanterman incisure in Schwann cells of the peripheral nervous system. Springer; in Schwann cell development and pathology. Eds. Sango K, Yamauchi J. 2014, p.29-45.

Ohno N, Sakoh T, Saitoh Y, Terada N, Ohno S. Schwann cell-axon interactions: The molecular and metabolic link between Schwann cells and axons. Springer; in Schwann cell development and pathology. Eds. Sango K, Yamauchi J. 2014, p.47-67.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 信生 (TERADA, Nobuo)

信州大学・学術研究院保健学系・教授
研究者番号：60293461