

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700398

研究課題名（和文）分泌型レクチン PAP-III の N 末端プロセッシングとその神経再生における意義の研究

研究課題名（英文）Analyses of N-terminal processing of secretory lectin PAP-III in neuronal regeneration

研究代表者

小西 博之 (KONISHI HIROYUKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90448746

研究成果の概要（和文）：

トリプシン様プロテアーゼにより N 末端切断された PAP-III (Δ N-PAP-III) が線維状構造を取り、神経突起と非常に密に接着することを見出した。神経細胞を Δ N-PAP-III 線維上で培養すると軸索伸長が顕著に促進されたことから、 Δ N-PAP-III 線維は再生軸索伸長の良い足場となることで再生を促進する可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

I revealed that N-terminal processed PAP-III (Δ N-PAP-III) formed fibrillar structures and attached tightly to neuronal surfaces. When a dense networks of Δ N-PAP-III fibers were prepared on the culture dishes, neurites preferentially adhere to the Δ N-PAP-III fibers and neurite extension was enhanced. These results suggest a possibility that PAP-III may form insoluble fibrillar structures around injury site and would provide regenerating axons with a platform for elongation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：グリア細胞、神経再生

1. 研究開始当初の背景

分泌型レクチン pancreatitis-associated protein-III (PAP-III) は C 型レクチンに分類される分泌タンパクである。神経損傷時、損傷神経細胞またはシュワン細胞で極めて強く発現応答するため、神経再生過程で重要な役割を果たすことが予想されるが、その機能は良く分かっていなかった。

2. 研究の目的

私は PAP-III の機能解明を進める過程で、

末梢神経損傷部位で PAP-III タンパクは N 末端が切断されていることを見出していた。さらに、トリプシン様プロテアーゼで N 末端 11 アミノ酸が切除された PAP-III (Δ N-PAP-III) が in vitro で 2 つの活性 (1: コンドロイチン硫酸に結合する 2: 線維状構造を形成し神経細胞表面に接着する) を持つことを発見していた。そこで、本研究では PAP-III の N 末端切断という現象に着目し、 Δ N-PAP-III の神経再生における機能を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

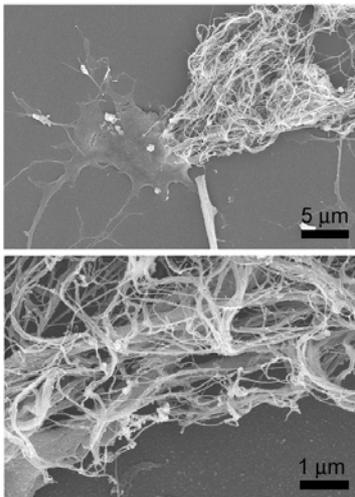
In vitro ですでに見出していた「線維状構造を形成し神経細胞表面に接着する」活性について、まず培養系で免疫細胞化学や電子顕微鏡詳細を用い詳細に解析した。神経細胞表面上には Δ N-PAP-III 結合分子(受容体)が存在する可能性が考えられたため、結合分子を共沈実験により探索した。また、これら実験に有用と思われる Δ N-PAP-III 線維特異的モノクローナル抗体を作成した。

In vivo における機能解析のため、まず神経損傷部位付近における Δ N-PAP-III 線維の形状と局在を、作成したモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学により調べた。さらに、モノクローナル抗体による機能阻害、またはノックアウトマウスを用いた機能欠失が軸索再生に与える影響を神経損傷モデル動物にて検討した。

4. 研究成果

(1) Δ N-PAP-III 線維と培養神経細胞のインターラクシオンの詳細な観察

大脳皮質初代培養神経細胞に対し Δ N-PAP-III 線維が接着する様子を走査型電子顕微鏡により観察した。その結果、 Δ N-PAP-III 線維が神経突起に絡みつくように接着することが明らかとなった。

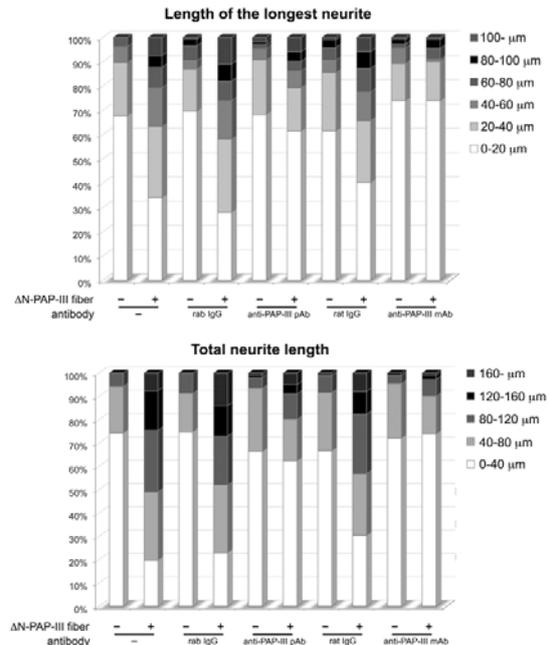


(2) Δ N-PAP-III 線維特異的抗体の作成

計画を効率良く進めるため、全長のPAP-IIIは認識せず、N末端が切断された Δ N-PAP-IIIのみを認識するラットモノクローナル抗体の作成を試みた。In vitro で切断反応を行った Δ N-PAP-IIIを抗原とし、腸骨リンパ節法を用いた結果、 Δ N-PAP-IIIを特異的に認識するハイブリドーマが1クローン得られた。このハイブリドーマクローンから精製した抗体を以下の実験に用いた。

(3) Δ N-PAP-III 線維の神経突起伸長活性

Δ N-PAP-III 線維が強く神経突起に接着することから、 Δ N-PAP-III 線維が神経突起伸長の足場となり、神経突起伸長を促進する可能性を検討した。 Δ N-PAP-III 線維を密に敷いたカバースリップ上で大脳皮質神経細胞を培養したところ、神経突起伸長が顕著に促進された。コントロールに対し、最長突起の長さは2.24倍に、突起の長さの総和は3.14倍に増加した。この突起伸長活性は既存のポリクローナル抗体または作成したモノクローナル抗体で有意に抑制されたことから、この活性は Δ N-PAP-III 特異的なものであることが裏付けられた。



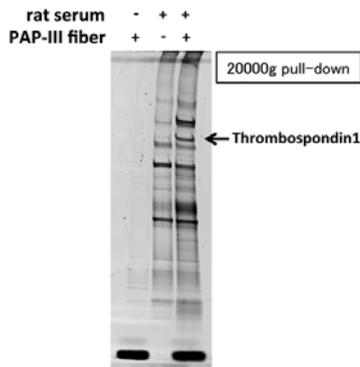
(4) Δ N-PAP-III 結合分子の探索

Δ N-PAP-III 線維は強く神経細胞表面に接着することから、神経細胞表面に結合分子(受容体)が存在することが予想された。そこで、培養神経細胞から調整した膜画分と Δ N-PAP-III 線維を in vitro で反応後、 Δ N-PAP-III 線維と共沈するタンパクを探索した。共沈タンパクを SDS-PAGE で分離後、得られたバンドを切り出し、飛行型質量分析器にてタンパク同定を行った。幾つかのタンパクが同定されたが、すべて細胞質タンパクであったため、非特異的な結合であると判断し実験を中断した。

Δ N-PAP-III 線維は他の分泌タンパクと相互作用する可能性も考えられる。そこで、次に分泌タンパクを標的とし、共沈するタンパクの同定を試みた。ラット血清を用い共沈実験を行った結果、軸索伸長効果を持つことが報告されている細胞外タンパク thrombospondin-1 を同定した。2者間の結合がどのように互いの機能に影響を及ぼすか現在解析を進めている。

(5) 生体における Δ N-PAP-III の形状と局在

既存の抗 PAP-III ポリクローナル抗体、作成した Δ N-PAP-III 特異的モノクローナルを用い、坐骨神経切断ラットの損傷軸索を染色した。様々な固定条件と染色条件で免疫組織化学を行ったが、良好なシグナルは得られず、 Δ N-PAP-III 線維の in vivo における形状と局在は評価できなかつた。現在モノクローナル抗体をさらに作成し、再試行を行なっている。



(6) 生体における Δ N-PAP-III の機能解析

Δ N-PAP-III 線維の神経突起伸長活性が神経再生に与える影響を検討するため、坐骨神経切断モデル動物で Δ N-PAP-III 線維の機能阻害を試みた。

作成した Δ N-PAP-III 線維特異的モノクローナル抗体が、少なくとも培養系では機能阻害抗体として働くことが(3)で示されたため、坐骨神経損傷モデルラット作成時、神経切断部位にモノクローナル抗体を投与した。しかしながら、再生軸索の伸長には影響を与えなかつた。損傷時の1回投与ではなく、浸透圧ポンプなどを利用した持続投与を行うことで、再評価を行いたいと考えている。

また、研究期間内にノックアウトマウスの作成が完了したため、マウス神経損傷モデルを用いた解析を計画した。しかし、ヘテロ雄マウスが不妊となり、ホモマウスが産出できなかった。現在、雄生殖器における PAP-III 発現を含め、不妊となる原因の特定を進めている。

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 5 件)

① Matsumoto S, Konishi H, Maeda R, Kiryu-Seo S, Kiyama H. Analysis on expression of the regenerating gene (Reg) family members Reg-III β and Reg-III γ in the mouse during development.

J Comp Neurol, 520(3), 479-94, 2012. 査読有

② Konishi H, Ogawa T, Kawahara S, Matsumoto S, Kiyama H. Continuous stress-induced dopamine dysregulation augments PAP-I and PAP-II expression in melanotrophs of the pituitary gland. *Biochem Biophys Res Commun*, 407(1), 7-12, 2011. 査読有

③ Kawahara S, Konishi H, Morino M, Ohata K, Kiyama H. Pancreatitis-associated protein-I and pancreatitis-associated protein-III expression in a rat model of kainic acid-induced seizure. *Neuroscience*, 175, 273-80, 2011. 査読有

④ Takahashi M, Abe M, Yamagishi T, Nakatani K, Okade T, Ogawa T, Konishi H, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Nakajima Y. Local ventilation system successfully reduced formaldehyde exposure during gross anatomy dissection classes. *Anat Sci Int*, 85(4), 251-2, 2010. 査読有

⑤ Konishi H, Ogawa T, Nakagomi S, Inoue K, Tohyama M, Kiyama H. Id1, Id2 and Id3 are induced in rat melanotrophs of the pituitary gland by dopamine suppression under continuous stress. *Neuroscience*, 169(4), 1527-34, 2010. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

以下、代表的な物を記載

①<口頭>小西博之、松本早紀子、木山博資。PAP-III (Reg-III γ)はN末端切断により線維状構造を形成し軸索伸長の足場となる。第54回日本神経化学学会大会。瑠璃光(金沢)。2011年9月28日。

②<ポスター>小西博之、松本早紀子、木山博資。PAP-III はN末端切断により線維状構造を形成し軸索伸長の足場となる。第2回名古屋大学医学部・生理学研究所合同シンポジウム。名古屋大学(名古屋)。2011年8月20日。

③<ポスター>小西博之、松本早紀子、川原慎一、前田理亜、木山博資。PAP-III (Reg-2)はN末端切断により線維状構造を形成し軸索伸長の足場となる。

第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会。横浜コンベンションセンター（横浜）（※震災により紙面開催）。2011 年 3 月 30 日。

④ Konishi H, Matsumoto S, Kawahara S, Maeda R, Kiyama H. The pancreatitis-associated protein-III (PAP-III) is polymerized into a fibrillar structure by the cleavage of its N-terminus. Society for Neuroscience 40th Annual Meeting, San Diego Convention Center (San Diego), USA, 13th November 2010.

⑤ <口頭> 小西博之、松本早紀子、木山博資。PAP-III は N 末端切断により線維状構造を形成する。
第 12 回 ORIGIN 夏のワークショップ。レイクフォレストリゾート（京都）。2010 年 9 月 5 日。

⑥ <ポスター> 小西博之、川原慎一、松本早紀子、前田理亜、木山博資。
Pancreatitis-associated protein-III (PAP-III) は N 末端切断により線維状構造を形成する。
第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会・合同大会。神戸コンベンションセンター（神戸）。2010 年 9 月 3 日。

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/Anatomy2/contact.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 博之 (KONISHI HIROYUKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90448746

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし