

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592141

研究課題名(和文)新規細胞外マトリックスDACsのアストロサイトおよび神経細胞における機能解析

研究課題名(英文) Analysis of DACs, novel matrix structure composed of chondroitin sulfate proteoglycan in the brain

研究代表者

奥田 洋明 (Okuda, Hiroaki)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40453162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンにより構成される新規の細胞外マトリックス構造を見出し、その形態からDACsと命名して報告している。本申請ではDACsの機能の解明を目的とした。大脳皮質において特定の一部のアストロサイトでTenascin-R (TNR) が発現しており、このTNR陽性アストロサイトがDACsを構成していた。また培養アストロサイトを用いて機能を検討した結果、TNRがグルタミン酸の取り込み能を制御している可能性が示唆された。以上の結果よりTNR陽性アストロサイトはDACsを形成し、GLASTの発現を制御することにより、シナプスなどの微細環境を保つのに重要であることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, the CS-56 antibody, which recognizes a chondroitin sulfate moiety, labeled a subset of adult brain astrocytes, yielding a patchy extracellular matrix pattern. To explore the molecular nature of CS-56-labeled glycoproteins, we purified glycoproteins of the adult mouse cerebral cortex using a combination of chromatographies. One of the purified proteins was identified as tenascin-R (TNR) by mass spectrometric analysis. When we compared TNR mRNA expression patterns with the distribution patterns of CS-56-positive cells, TNR mRNA was detected in CS-56-positive astrocytes. TNR knockdown by siRNA expression significantly reduced glutamate uptake in cultured astrocytes. Furthermore, expression of mRNA and protein of GLAST, which is a major component of astrocytic glutamate transporters, was reduced by TNR knockdown. Our results suggest that TNR is expressed in a subset of astrocytes and contributes to glutamate homeostasis by regulating astrocytic GLAST expression.

研究分野：神経化学

キーワード：アストロサイト コンドロイチン硫酸プロテオグリカン

1. 研究開始当初の背景

1898年にイタリアの解剖学者である Camillo Golgi が特定の神経細胞体を覆う網状の構造体を記述し、その後、その構造体はペリニューロナル・ネット(PNN: perineuronal net)と命名された。PNNは細胞外マトリックスであるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)により構成され、抑制性神経細胞の周囲を取り囲む。CSPGの機能としては、神経突起伸展の誘導や反発などによる神経回路形成や、細胞外基質形成によるシナプスの安定化、細胞内外の情報伝達を制御することが知られているが、PNN自体の機能は長年にわたって不明であった。

しかし、近年の分子生物学の発展に伴ってPNNの機能は解明されつつある。神経回路の形成には臨界期があるが、PNNを除去することにより可塑性が復活することから、PNNは臨界期の形成を制御していると考えられている(Bavelier et. al., J Neurosci. 2010, 30:14964-14971)。さらに、成体動物の扁桃体からPNNを除去することによって、恐怖の記憶を消去できること(Gogolla et. al., Science 2009, 325:1258-1261)から記憶の固定・維持にも重要な働きをしていると推察されている。このように細胞外マトリックス構造であるPNNは脳高次機能に重要な働きをしている。

このような細胞外マトリックス構造はその後100年余りの間、報告がなかったが、我々は最近、PNN以来の新規の細胞外マトリックス構造を見出した。新規構造は脳においてPNNと同じくCSPGにより構成され、その形態から Dandelion Clock-like Structure (DACS)と報告した(Hayashi et. al., Biochem Biophys Res Commun.2007, 364:410-415)。DACSはCSPGの特定の硫酸化糖鎖を認識するモノクローナル抗体(CS56抗体)を用いて成熟脳を免疫染色すると見出すことが出来る。DACSは哺乳類全般で脳皮質において構造が認められること、若年期以降で構造が徐々に明瞭になること、GFAP

の発現が弱い特定の一部のアストロサイトがDACSを構成し、複数の神経細胞を取り囲むように存在すること、PNNと同様にCSPGにより構成されることなどの特徴が明らかとなっているが、その機能については不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的はDACSの機能を解明することにある。DACSの特徴およびPNNの機能を踏まえると、DACSは神経回路が成熟する若年期以降において周囲の神経細胞の機能を調節し、記憶・意識などの脳高次機能に關与している可能性が考えられる。何故ならば、近年、神経活動に応じてアストロサイトから分泌されるATPやD-セリンなどのGliotransmitterなどが周囲の神経細胞の活動を調節するということが報告されており、DACSはこの神経細胞-グリア細胞の相互作用を調節している可能性があるからである。この神経細胞-グリア細胞の相互作用は神経機能を考える上で極めて重要であることから、DACSが神経活動とどのような関連を持って機能しているかを追求することは、脳高次機能の解明に大変意義のあることと考える。

従って、本申請ではDACSの成熟脳における機能の解明の一歩として、初代培養アストロサイトを用いてin vitroにおけるDACSの機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)DACsを構成するCSPGのコアタンパク質の同定

DACSは特定の硫酸化糖鎖構造を認識するCS56抗体により染色されるため、DACsを構成しているCSPGのタンパク質部分(コアタンパク質)は不明である。このコアタンパク質の同定は

遺伝子発現やノックダウンなどの分子生物学的手法を用いた解析を行うためには必須であるため、我々は DACS を構成する CSPG のコアタンパク質の同定を試みた。

マウス大脳皮質より CSPG を各種クロマトグラフィーを用いて精製し、脱糖鎖後にアクリルアミドゲルを用いて泳動して分離した。銀染色後、バンドを切り出した後、タンパク質を抽出して質量分析法により同定した。

(2) 培養アストロサイトを用いた DACS の機能の解析

DACS はアストロサイトが形成し、周囲の神経細胞を取り囲むように存在することから、周囲の神経細胞の機能を調節している可能性が考えられる。アストロサイトが神経細胞との情報伝達を行うには大まかに分類して 2 つの方法が考えられる。一つは D-セリンや ATP などの Gliotransmitter を用いる。もう一つは Cadherin や Ephrin などの細胞膜・外タンパク質を介する方法である。そこで DACS (TNR) がこれらの因子に関与するか否かを検討した。

周囲の神経細胞の活動に反応してアストロサイトから D-セリン、ATP、グルタミン酸などの Gliotransmitter が放出される。これら Gliotransmitter は神経細胞上の受容体に作用し、神経細胞の活動を調節することが知られている (Hamilton and Attwell, Nat Rev Neurosci. 2010, 11:227-238)。そこで、TNR の siRNA を用いてアストロサイトの内在性 TNR の発現を低下させた後、アストロサイトに刺激を添加し、Gliotransmitter (D-セリン、ATP、グルタミン酸) の培地への分泌、および RI 標識グルタミン酸を用いたグルタミン酸取り込み能を検討した。

(3) 膜タンパク質を介した細胞内シグナル伝達への影響の解析

アストロサイトは Ephrin などの細胞膜・外タンパク質を介して神経細胞と情報伝達を行い、スパインや長期増強の形成に関与することが知られてい

る (Klein R. Nat Neurosci. 2009, 12:15-20)。

そこで、TNR がこれら細胞膜・外タンパクと結合して細胞内・外の情報伝達に関与するか否かを検討を行った。TNR の siRNA を用いてアストロサイトの内在性 TNR の発現を低下させた後、アストロサイトにおける代表的なシグナル伝達の変化をウエスタンブロッティングを用いて検討した。

また、TNR と膜タンパク質との結合を免疫沈降法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) DACS を構成する CSPG のコアタンパク質の同定

マウス成熟脳より各種クロマトグラフィーを用いて CSPG を精製し、質量分析を用いて同定した。その結果、代表的な CSPG である phosphacan や versican 以外にも tenascinR (TNR) が候補としてあがった。これらの因子の in situ hybridization (ISH) と CS56 の免疫染色を成獣マウス脳で行うと、TNR のみが DACS の中心に陽性シグナルが認められ、他の因子は分布に重なりが認められなかった。さらに、TNR mRNA 発現細胞の同定を、各種細胞マーカーを用いた免疫染色と組み合わせを行った結果、アストロサイト特異的タンパク質である s100beta 陽性細胞に TNR が発現していること、また、CS-56 抗体を用いた免疫電顕の結果から、DACS はアストロサイトが構成していることが推察された。過去の報告より TNR は硫酸化糖鎖をもつことが知られており、また、PNN と共局在することから、抑制性の神経細胞が発現すると考えられている。しかしながら、TNR の ISH 陽性シグナルは PNN のマーカーである WFA レクチンの免疫染色とは共局在がみとめられなかった。

以上の結果から、成獣マウスの大脳皮質では、アストロサイトが TNR を発現・分泌して DACS を構成すると考えられる。

(2)培養細胞を用いた in vitro の系によるアストロサイトにおける DACS の機能の検討

培養アストロサイトにおける TNR の発現の検討

DACSの in vivo での機能を解析する前段階の一步として、初代培養アストロサイトにおける TNR の発現を検討した。CS56 および TNR 抗体を用いて免疫染色を行った結果、CS56 および TNR 共陽性のアストロサイトが認められた。これらの共陽性アストロサイトは in vivo と同様に GFAP 染色では強陽性を示さないことから、in vivo の状態をよく反映していると考えられる。

アストロサイトにおける TNR の機能の検討

DACS はアストロサイトが形成し、周囲の神経細胞を取り囲むように存在することから、周囲の神経細胞の機能を調節している可能性が考えられる。アストロサイトのシナプスにおける主な機能として、神経伝達物質であるグルタミン酸の取り込みとグリオトランスミッターの放出が知られている。DACS の構成成分である TNR の発現をノックダウンした時の、これら機能への影響を検討した。

培養アストロサイトの TNR をノックダウンすることにより、グルタミン酸の取り込み能の低下が認められ、また、グルタミン酸トランスポーターのひとつである GLAST の発現の低下が認められた。しかしながら、グリオトランスミッターの放出には影響は見られなかった。以上の結果を論文として報告した(Okuda et al., J Biol Chem 2013, 289:2620-2631)。

以上の結果より TNR 陽性アストロサイトは、GLAST の発現を制御することにより、グルタミン酸のホメオスタシスの調節を行っていることが示唆される。

(3)DACs の細胞内外の情報伝達への影響の検討

次に、DACs が細胞内外の情報伝達にどのよ

うに関連しているのかを検討した。TNR は CSPG と結合して細胞外マトリックスを形成するだけでなく、カドヘリンなどの膜タンパク質と結合することが報告されている。従って、TNR は他の膜タンパクを介して細胞内の情報伝達に影響を与えていると考えられる。そこで、TNR の siRNA を用いて、細胞内のシグナル伝達の変化を検討した。TNR のノックダウンにより細胞内シグナル伝達のひとつである Src kinase のリン酸化の減弱が認められた。また、TNR と結合する膜タンパク質を免疫沈降法を用いて探索したところ、ヘッジホッグ受容体である Patched1 との結合が認められた。

以上の結果より、TNR は Patched1 などの他の膜タンパク質と複合体を形成し、細胞内シグナル伝達を制御していると考えられる。その結果、GLAST などの発現を調節し、シナプスなどの微細環境の調節を行い、脳機能を正常状態に保つのに重要であることが示唆される。

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 1 件)

Okuda H, Tatsumi K, Morita S, Shibukawa Y, Korekane H, Horii-Hayashi N, Wada Y, Taniguchi N, Wanaka A. Chondroitin sulfate proteoglycan tenascin-R regulates glutamate uptake by adult brain astrocytes. *J Biol Chem.* 289:2620-2631. (2014) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

Hiroaki Okuda, Kouko Tatsumi, Yukinao Shibukawa, Hiroaki Korekane, Noriko Horii-Hayashi, Yoshinao Wada, Naoyuki

Taniguchi, Akio Wanaka

TenascinR-positive astrocytes constitutes a unique extracellular matrix and delineates the astrocytic territories.

第 35 回日本神経科学大会

Hiroaki Okuda, Kouko Tatsumi, Yukinao Shibukawa, Hiroaki Korekane, Noriko Horii-Hayashi, Yoshinao Wada, Naoyuki Taniguchi, Akio Wanaka

TenascinR constitutes a unique extracellular matrix and modulates GLAST expression in astrocytes.

第 55 回日本神経化学会

奥田 洋明・辰巳 晃子・森田 晶子・渋川 幸直・是金 宏昭・堀井-林 謹子・和田 芳直・谷口直之・和中 明生

Tenascin R 陽性アストロサイトにおけるグルタミン酸取り込み能の調節

第 118 回日本解剖学会総会

{その他}

ホームページ

<http://www.naramed-u.ac.jp/~2ana/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 洋明 (OKUDA HIROAKI)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40453162