

厚生科学研究費補助金 長寿科学総合研究事業

平成10年度研究報告書
(総括研究報告書・分担研究報告書)

「老化脳における神経構造可塑性制御分子
の発現と機能に関する研究」
(H10-長寿-054)

国立療養所中部病院長寿医療研究センター
分子遺伝学研究部

森 望

平成10年度 厚生科学研究費補助金 長寿科学総合研究事業

総括研究報告書および分担研究報告書

研究課題名： 「老化脳における神経構造可塑性制御分子の
発現と機能に関する研究」

研究課題番号： H10-長寿-054

主任研究者： 森 望
国立療養所中部病院長寿医療研究センター
分子遺伝学研究部長

分担研究者： 前川昌平
京都工芸繊維大学繊維学部
応用生物学科助教授

氷見俊行
東京医科歯科大学大学院
細胞機能制御学講座助手

研究期間： 平成10年4月1日～平成11年3月31日

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

老化脳における神経構造可塑性制御分子の発現と機能に関する研究

森 望 （国立療養所中部病院長寿医療研究センター分子遺伝学研究部長）

神経の突起伸展時に発現の大きく変動する一群の蛋白質（nGAPs）に着目し、nGAPsが神経の構造可塑性の制御に直接的あるいは間接的に関与していることを観察した。nGAPsのうち特にSCG10/スタスミン群に注目し、その発現変動と機能解析に重点をおいた。スタスミンが細胞分裂時の紡錘糸の崩壊因子であることにヒントをえて、SCG10が神経細胞の成長末端におけるマイクロチューブルの崩壊因子であることを明らかにした。SCG10ファミリーの神経特異的新規メンバーであるRB3とSclipのcDNAクローンも単離し、それぞれの脳の発達過程での発現の違いを明らかにした。また、RB3に結合する新たな蛋白質 GEF-2を同定することにより、SCG10群が微小管のダイナミックスを制御する分子機構の一端を明らかにした。さらに、SCG10蛋白質に対する特異抗体を作製し、神経細胞内での局在を検討した。その結果、シグナル伝達関連分子の凝縮しているラフトとよばれる膜画分に局在していることを明らかにした。以上の結果から、SCG10関連分子が神経応答における神経突起伸展制御において、外界からの刺激に応じて微小管系のダイナミックスを制御する様相を明らかにすることができた。

[研究組織]

- 森 望（国立療養所中部病院長寿医療研究センター分子遺伝学研究部長）
- 前川昌平（京都工芸繊維大学繊維学部応用生物学科助教授）
- 氷見俊行（東京医科歯科大学大学院細胞機能制御学講座助手）

A. 研究目的

老年期における記憶減退、痴呆、運動失調等の原因の少なくとも一部は、脳における神経の可塑性低下にある。

神経可塑性は LTP 等に代表される機能的可塑性と神経ネットワーク再編成やシナプス再生をともなう構造的可塑性に二分されるが、機能的可塑性も実際にはシナプス強化（あるいは弱化）を含むので、超微細レベルでの構造変化をともなうと考えられる。また、老化脳においては神経の退行性変性も頻繁におこるので、老化脳における構造可塑性の実態および可塑性減退のメカニズムを知ることは脳の老化を理解する上で大変重要な課題である。我々は、神経の突起伸展時に発現

の大きく変動する一群の蛋白質 (nGAPs) に着目し、nGAPs が神経の構造可塑性の制御に直接的あるいは間接的に関与していることを観察した。本研究では nGAPs のうち特に SCG10/スタスミン群に注目し、その遺伝子発現変動と機能解析に重点をおいた。スタスミンが細胞分裂時の紡錘系の崩壊因子であることにヒントをえて、(1) SCG10 の神経突起伸展における役割が神経細胞の成長末端におけるマイクロチューブの崩壊因子となりうるか否か検証を行う。また、(2) SCG10 関連分子 RB3, Sclip の cDNA クローンをとり、それぞれの発現分布の相違を明らかにする。(3) SCG10 に体する特異抗体を調製し、細胞内局在を明らかにする、さらに、(4) SCG10 群と結合する新規蛋白質を同定し、SCG10 によるチューブリン骨格制御の分子機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

SCG10 群の発現分布はノーザンブロットおよび *in situ* ハイブリダイゼーション法により行った。SCG10 関連分子である RB3 および Sclip の cDNA は RT-PCR 法によった。結合分子の探索は RB3 のリン酸化制御領域をベイトとする酵母のツーハイブリッドスクリーニングにより行った。チューブリンは牛大脳より定法により精製し、微小管の崩壊活性の測定は、遠心法および光散乱法により行った。大腸菌で過剰発現した SCG10 を抗原

とし、モノクローナル抗体を調製した。細胞分画を行いウェスタンブロット法により局在を検討した。

D. 結果

SCG10 ファミリー分子はアミノ酸配列の高い相同性を持つ SCG10, SCLIP, RB3 の3種の神経特異的分子群と広く種々の組織に見られる stathmin とで構成されている。まず、これらの脳内局在を *in situ* ハイブリダイゼーション法により探索した。ジゴキシゲニン標識リボプローブを用いて、成熟ラット脳での mRNA 発現を調べた。SCLIP や stathmin の発現は一樣に高く、RB3 や SCG10 の発現は非常に低かった。その中でも、SCG10 は海馬錐体細胞層・嗅球僧帽細胞・大脳梨状葉・脊髄内側運動核などに高い発現を示した。また、RB3 は嗅球僧帽細胞・大脳梨状葉並びに視床に比較的高い発現を示した。SCLIP は神経細胞一様に高い発現を示したが、上丘など一部の細胞には非常に弱い発現しか示さなかった。Stathmin は、神経細胞だけではなく、白質のグリア細胞にも発現が見られ、また、海馬や脳幹部においては弱い発現しか見られなかった。この様に、SCG10 ファミリー分子は成熟脳において、かなり重複はしながらも多少異なる発現様相を呈していることが明らかとなった。

次に SCG10 ファミリー分子による微小管調節機構を探索するために、SCG10 タンパク質の変異体を作製し、

微小管崩壊活性を光散乱法により測定した。その結果、C末のコイルドコイル領域とそれに連なるリン酸化部位を含む調節ドメインの一部が微小管崩壊活性に非常に重要であることが判明した。しかしながら、SCG10に多数存在するリン酸化部位のリン酸化と微小管崩壊活性には相関が見いだされなかった。細胞を用いた系ではリン酸化と微小管崩壊活性との相関関係が報告されており、この様なリン酸化による制御はSCG10ファミリー分子結合タンパク質に依るものである可能性が示唆された。

そこで、酵母ツーハイブリッド法を用いて、SCG10ファミリー分子結合タンパク質を探索した。具体的には、SCG10ファミリー分子のうちLTPのような神経可塑性誘発後、発現上昇すると報告されたRB3分子に結合する分子を探索した。まず、ヒト脳由来のcDNAライブラリーを増幅し、RB3のリン酸化制御領域を結合の相手方とするスクリーニングを行った。陽性クローンについてDNAデータベースを検索した結果、少なくとも2個の候補分子GEF-2とLC3を分離した。それぞれについて実際の結合をin vitroで確認した。GEF-2は脳内において糖脂質の発現に関与する可能性、また、LC3については微小管に結合する微小管結合蛋白MAP1Bの軽鎖サブユニットとして知られている。SCG10ファミリー分子はチューブリン分子の重合体である微小管を崩壊させる活性があることがわかっているので、

この結果は大変興味深い。またGEF-2とLC3は高い相同性をもち、哺乳類ばかりでなく線虫でも関連する3遺伝子の存在がまた、植物にも相同遺伝子が確認された。したがって、微小管調節に関して進化上重要なものと推察された。

共同研究者の氷見（東京医科歯科大学）は、脳障害後の機能回復における加齢変化と、SCG10および、その類縁タンパク質の発現の変動の関連を調べるため、老若動物を用いた脳虚血モデルの作製を試みた。はじめにスナネズミを用いた両側頸動脈結紮モデルを試みたが、2年齢以上の老齢動物において、安定した虚血障害を加えることが不可能であることが判明した。ついで、ラットを用いた片側中大脳動脈結紮-血流再灌流モデルを検討した。1時間の虚血-再灌流2ヶ月後の明暗箱による記憶試験の成績を検討したところ、3か月齢ラットに比べ、1年齢ラットでは成績の回復が低いことが判明した。以上の結果より、上記、ラットの片側中大脳動脈結紮-血流再灌流モデルは、脳障害後の機能回復における加齢変化を調べるのに適していると考えられた。

共同研究者の前川（京都工芸繊維大学）は、大腸菌に発現させたヒトSCG10を抗原にSCG10に対するモノクローン抗体を作製した。この抗体を用い、ラット脳の細胞分画での挙動を解析した結果、SCG10が界面活性

劑存在下においても tubulin を主成分とする高分子複合体として、特に、種々のシグナル伝達因子の集積部位として注目されているラフト画分に局在することを見い出した。この結果は SCG10 がラフトにおける情報受容とその変換過程において微小管を中心とする細胞骨格系の構造変化を通じてシナプス形成やその変換に関与する可能性を強く示唆した。

D. 考察

RB3 に結合する因子として単離した GAF-2 は、従来、微小管の安定化因子として知られていた MAP1A, MAP1B の小サブユニットである LC3 と高い相同性がある。また、これは、ごく最近あきらかになった神経伝達物質 GABA の受容体の裏打ち蛋白でチューブリンとも結合しうる GABARAP とも高い相同性があることが明らかとなった。この事実から、膜受容体 - GABARAP/GEF-2/MAP1B/LC3 - SCG10/RB3/Sclip - 微小管という機能連関の存在が強く示唆された。今後、神経膜応答から神経突起変換という構造可塑性の分子機構へ迫ることが可能になったと考えられる。

E. 結論

SCG10 は神経細胞に特異的に発現されるチューブリン崩壊因子であることを明らかにした。また、SCG10 には RB3 と Sclip という神経特異的類似分子があること、それらの分布が成

体脳で若干異なることを明らかにした。SCG10 の微小管崩壊活性は蛋白質分子のリン酸化により抑制されること、RB3 のリン酸化領域を含む調節ドメインに微小管安定化因子 MAP1A, MAP1B の小サブユニット LC3 の類似分子 GEF-2 が特異的に結合することもわかった。これらの事実から、SCG10 遺伝子が微小管のダイナミクスを制御する分子機構の一端を明らかにした。

参考文献

1. 森 望、神経の可塑性制御と脳の老化、Molecular Medicine 35, 654-663 (1998)
2. 森 望、脳の老化：遺伝子発現の変動と神経可塑性の低下、細胞工学 17, 1375-1385 (1998)
3. 森 望、神経の構造可塑性制御と脳の老化、日本神経精神薬理学雑誌 17(4) 159-167
4. Mori, N., Molecular Genetic approaches to the genes of longevity, aging and neurodegeneration in mammals. Mech. Ageing Dev., 98, 223-230 (1997)

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

SCG10/stathmin の研究

森 望 （国立療養所中部病院長寿医療研究センター分子遺伝学研究部長）

SCG10 ファミリーの神経特異的新規メンバーである RB3 と Scip の cDNA クローンを単離し、in situ ハイブリダイゼーション法によりそれぞれの成体脳での発現の異同を明らかにした。SCG10 蛋白質の部分発現クローンやリン酸化部位変異体を作製し、そのチューブリン重合活性への影響を比較し、微小管脱重合活性が分子のほぼ C 末半分に凝縮していることを明らかにした。また、少なくとも一部のセリン残基のリン酸化が活性を消去することも判明した。この結果、SCG10 が神経細胞の微小管の崩壊因子であることを明らかにした。SCG10 ファミリーのうち RB3 は LTP 刺激後、発現誘導かかかると最近報告されたので、RB3 に結合する蛋白質を同定することを試みた。その結果、RB3 のリン酸化部位を含む調節領域に、従来、微小管の安定化因子と考えられてきた MAP1A, MAP1B の小サブユニット LC3 の構造類似体である GEF-2 が特異的に結合することが明らかとなった。これにより、SCG10 群が微小管のダイナミクスを制御する様相の一端を明らかにすることができた。

A. 研究目的

SCG10 は GAP-43 と同様、神経細胞特異的に発現される突起伸展関連分子である。PC12 細胞等において神経成長因子 NGF により顕著な遺伝子発現誘導がおこることが知られており、神経の突起伸長に何らかの役割を担うものと考えられてきたが、その作用の実態は長らく不明のままだった。我々は SCG10 の神経構造可塑性にお

ける役割を解明する目的で、今までに、SCG10 関連遺伝子群の探索、発現の転写機構の解析、等を行ってきた。数年前に、SCG10 と相同性が高く全ての細胞で発現しているスタスミンが細胞分裂時に現われる紡錘糸の分解因子であることが報告された。これはスタスミンが紡錘糸の構成成分であるチューブリン（微小管）の崩壊因子であることを示唆していた。SCG10

は神経細胞に特異的なスタスミン様分子である。この事実は、SCG10 が神経細胞の核内ではなく、神経のマイクロフィラメントとしての微小管の構造の制御因子となる可能性を強く示唆した。そこで、我々は SCG10 に微小管の重合-脱重合を制御する活性があるか否か、また、SCG10 の新規関連分子との発現の違い、さらに SCG10 とチューブリンとの結合を仲立ちする分子の探索を試みることに より、SCG10 関連分子が、神経細胞の中でいかに微小管ダイナミックスを制御していくのか、その分子機構に迫ろうとした。本年度は、SCG10 の神経突起伸展における役割が神経細胞の成長末端におけるマイクロチューブルの崩壊因子となりうるか否かの検証、SCG10 関連分子 RB3, Sclip の cDNA クローンを単離とその発現分布の解明、SCG10 群と結合する蛋白質の同定により、神経細胞内における微小管骨格制御の分子機構を理解することを目的とした。

B. 研究方法

SCG10 群の発現分布はノーザンブロットおよび *in situ* ハイブリダイゼーション法により行った。SCG10 関連分子である RB3 および Sclip の cDNA は RT-PCR 法によった。結合分子の探索は RB3 のリン酸化制御領域をベイトとする酵母のツーハイブリッドスクリーニングにより行った。チューブリンは牛大脳より定法により精製し、微小管の崩壊活性の測定は、

遠心法および光散乱法により行った。大腸菌で過剰発現した SCG10 を抗原とし、モノクローナル抗体を調製した。細胞分画を行いウェスタンブロット法により局在を検討した。

D. 結果

シナプス活動の場を形成する細胞骨格系を中心とした分子群の神経機能調節機構を解明する目的で、神経突起特異的な微小管調節分子である SCG10 ファミリー分子の脳内局在と微小管調節の分子機構を探索した。SCG10 ファミリー分子はアミノ酸配列の高い相同性を持つ SCG10, SCLIP, RB3 の3種の神経特異的分子群と広く種々の組織に見られる stathmin とで構成されている。まず、これらの脳内局在を *in situ* hybridization 法により探索した。陽性細胞の同定の容易さからジゴギシゲニン標識リボプローブを用いて、成熟ラット脳での mRNA 発現を調べた。SCLIP や stathmin の発現は一様に高く、RB3 や SCG10 の発現は非常に低かった。その中でも、SCG10 は海馬錐体細胞層・嗅球僧帽細胞・大脳梨状葉・脊髄内側運動核などに高い発現を示した。また、RB3 は嗅球僧帽細胞・大脳梨状葉並びに視床に比較的高い発現を示した。SCLIP は神経細胞一様に高い発現を示したが、上丘など一部の細胞には非常に弱い発現しか示さなかった。Stathmin は、神経細胞だけではなく、白質のグリア細胞にも発現が見られ、また、海馬や脳幹部に

においては弱い発現しか見られなかった。この様に、SCG10 ファミリー分子は成熟脳において、SCLIP を中心として様々な発現様式を示しており、この様な発現と脳各部位における神経機能との関連は今後の検討課題である。

次に SCG10 ファミリー分子による微小管調節機構を探索するために、SCG10 タンパク質の変異体を作製し、微小管崩壊活性を光散乱法により測定した。その結果、C 末のコイルドコイル領域とそれに連なるリン酸化部位が多数存在する調節ドメイン領域の一部が微小管崩壊活性に非常に重要であることが明らかになった。しかしながら、SCG10 に多数存在するリン酸化部位のリン酸化と微小管崩壊活性には相関が見いだされなかった。細胞を用いた系ではリン酸化と微小管崩壊活性との相関関係が報告されており、この様なリン酸化による制御は SCG10 ファミリー分子結合タンパク質に依るものであることが示唆された。そこで、酵母 Two Hybrid Screening 法を用いて、SCG10 ファミリー分子結合タンパク質を探索した。具体的には、SCG10 ファミリー分子のうち LTP のような神経可塑性誘発後、発現上昇すると報告された RB3"分子に結合する分子を探索した。まず、ヒト脳由来の cDNA ライブラリーを増幅し、RB3"のリン酸化制御領域を結合の相手方とするスクリーニングを行った。2 回のスクリーニングで総計 3.7 億個のクローンにわた

る遺伝子をスクリーニングし、陽性クローンについて DNA データベースを検索した結果、少なくとも 2 個の候補分子 GEF-2 と LC3 を分離した。それぞれについて実際の結合を *in vitro* で確認した。ツーハイブリッド法によって得られた総計 100 個の候補クローンのうち 34 個が GEF-2 を 1 個が LC3 をコードする遺伝子であった。cDNA 中の蛋白質をコードする領域のみを含む発現ベクターを作成しスクリーニング用の酵母 (Y190) に再度、遺伝子導入し結合活性を確認した。GEF-2 は脳内において糖脂質の発現に関与する可能性、また、LC3 については微小管に結合する微小管結合蛋白 MAP1B の軽鎖サブユニットとして知られているものである。SCG10 ファミリー分子はチューブリン分子の重合体である微小管を崩壊させる活性があることがわかっているので、この結果は大変興味深い。また GEF-2 と LC3 は高い相同性を持ち、哺乳類ばかりでなく線虫でも関連する 3 遺伝子の存在がまた、植物にも相同遺伝子が確認された。したがって、微小管調節に関して進化上重要なものと推察される。

D. 考察

RB3 に結合する因子として単離した GAF-2 は、従来、微小管の安定化因子として知られていた MAP1A, MAP1B の小サブユニットである LC3 と高い相同性がある。また、これは、ごく最近あきらかになった神経伝

達物質 GABA の受容体の裏打ち蛋白でチューブリンとも結合しうる GABARAP とも高い相同性があることが明らかとなった。この事実から、膜受容体 - GABARAP/GEF-2/MAP1B/LC3 - SCG10/RB3/Sclip - 微小管という機能連関の存在が強く示唆された。今後、神経膜応答から神経突起変換という構造可塑性の分子機構へ迫ることが可能になったと考えられる。

E. 結論

SCG10 は神経細胞に特異的に発現されるチューブリン崩壊因子であることを明らかにした。また、SCG10 には RB3 と Sclip という神経特異的類似分子があること、それらの分布が成体脳で若干異なることを明らかにした。SCG10 の微小管崩壊活性は蛋白分子のリン酸化により抑制されること、RB3 のリン酸化領域を含む調節ドメインに微小管安定化因子 MAP1A, MAP1B の小サブユニット LC3 の類似分子 GEF-2 が特異的に結合することもわかった。これらの事実から、SCG10 遺伝子が微小管のダイナミクスを制御する分子機構の一端を明らかにした。

F. 研究発表

1. 発表論文

1. 森 望、神経の可塑性制御と脳の老化、Molecular Medicine 35, 654-663 (1998)
2. 森 望、脳の老化：遺伝子発現の

変動と神経可塑性の低下、細胞工学 17, 1375-1385 (1998)

2. 学会発表

1. 森井博史、森 望 (1998) 神経特異的蛋白質 SCG10 ファミリーの脳内局在、第 41 回日本神経化学・第 21 回日本神経科学合同大会
2. Peter Kaub、今村一之、俣賀宣子、森井博史、森 望、渡辺恭良 (1998) 感受性期ネコ視覚野における神経成長関連遺伝子(SCG10)の発現様式、第 41 回日本神経化学・第 21 回日本神経科学合同大会
3. 森井博史、鳴瀬 善久、森 望 (1998) 神経突起伸展関連分子 SCG10 による tubulin 脱重合、第 71 回日本生化学学会大会

研究協力者

広瀬英司 (長寿医療研究センター)
森井博史 (長寿医療研究センター)

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

SCG10 と tubulin の相互作用の測定解析

前川昌平（京都工芸繊維大学繊維学部助教授）

研究要旨

SCG10 は神経特異的に発現する膜タンパク質であり、微小管構成因子 tubulin との相互作用により幼若期においては神経突起の形成、成熟期においては神経可塑性に関与していると考えられている。SCG10 が多く発現している幼若期のラット脳を用い、SCG10 の局在する膜画分について解析し、この因子が種々のシグナル伝達因子の集積部位として注目されているラフト画分に局在することを見出した。この結果は SCG10 がラフトにおける情報受容とその変換過程において微小管を中心とする細胞骨格系の構造変化を通じてシナプス形成やその変換に関与する可能性を示唆している。

キーワード：SCG10, tubulin, 微小管, 神経可塑性, ラフト

A. 研究目的

神経構造の可塑的变化には微小管や微小繊維といった細胞骨格構造の組換えが重要な役割を演じると考えられる。これらの構造体はまた種々の細胞内輸送系においてレールの役割を果たすため、神経細胞の生存や活動維持にも深く関与している。SCG10 は神経突起伸展に伴って発現される種々のタンパクの1つとして発見されたが近年 SCG10 に相同性をもち脊椎動物の種々の細胞に発現している stathmin が細胞骨格の一つであ

る微小管の調節因子であることが明らかになった。前年の研究では SCG10 もまた微小管重合調節活性をもつことを示し、更に大腸菌に発現させたヒト SCG10 を抗原に SCG10 に対するモノクローン抗体を作製した。この抗体を用い、ラット脳の細胞分画での挙動を解析した結果、SCG10 が界面活性剤存在下においても tubulin を主成分とする高分子複合体として存在することを示した。今年度はこの SCG10 含有複合体の構成因子を同定し、細胞内における

SCG10 の機能を解析することを目的とした。

B. 研究方法

1. ラット脳の分画. 細胞分画法や生化学的分画により幼若ラット脳を分画し, SCG10 の局在する画分の調製法を確立する. 2. SCG10 局在画分の解析. SCG10 の局在する画分についてその主要な構成因子をタンパク化学的手法, 免疫学的手法を用いて解析する. また SCG10 結合因子を免疫沈降, 化学架橋等の手法を用いて解析する.

C. 研究結果

1. 生化学的分画過程における SCG10 の局在. 生後 10 日齢のラット脳を可溶性画分, Triton 可溶性画分, Triton 不溶性画分に分画し, SCG10 が可溶性画分にはほとんど回収されないことを見い出した. 不溶性画分中の SCG10 は Triton 処理により約 50% が可溶化される. しかしこの可溶化画分を硫酸分画すると 40% 飽和条件下で沈殿し, この沈殿物は以後の透析によっても可溶化されないことを見い出した. また Triton 不溶性画分を懸濁しシヨ糖密度勾配にかけると低比重画分に SCG10 が回収されること, 硫酸沈殿物中の SCG10 含有複合体も同様の画分に回収されることを見い出した. この知見は膜画分に存在する SCG10 はある種の脂質と強く結合していることを示している.

2. SCG10 の局在する膜画分の同定.

この画分は (H) Triton 処理に対する抵抗性, (J) 低比重性, を示す. これらの特性は最近注目されている細胞膜中のラフト (筏) 構造の特性と一致している. そこでラフトに局在することが知られている NAP-22, GAP-43(neuromodulin), Thy-1 等の密度勾配遠心による挙動を SCG10 のそれと比較しこれらがすべてシヨ糖濃度にして 0.6M~0.8 M の領域に濃縮されてくることを見い出した. すなわち SCG10 が神経細胞ラフトの構成因子であることをみいだした. 神経由来ラフトには tubulin も主要因子として存在することが知られているが tubulin と SCG10 の密度勾配遠心における挙動も一致することも見い出された. 3. SCG10 結合タンパク因子の解析. 化学架橋剤 (EDC, グルタルアルデヒド) を用い, SCG10 結合タンパク質を解析した. これらの架橋剤により分子量約 70 k の位置に SCG10 抗体と反応するバンドが生成することを見い出した. このバンドは tubulin 抗体とも反応するので tubulin と SCG10 の 1:1 複合体と考えられる. すなわち脳ラフトに局在すると報告されていた tubulin は SCG10 との結合を介してこの領域に保持されている可能性がある.

D. 考察

SCG10 の細胞内局在の解析によりこのタンパク質が神経ラフトの構成因子であることが見い出された. 神経ラフトには種々のグリコシルイノシト

ールアンカー型細胞接着因子, 栄養因子受容体, アミロイド前駆体タンパク質, サークファミリーチロシンキナーゼ群, 神経特異的カルモジュリン結合タンパク質, 細胞骨格タンパク質等が局在していることより, ラフトは情報の授受・変換・統合に関する膜領域であると考えられている. 今回の研究は SCG10 もまたこの領域に局在する因子であることを示した. この局在にはこのタンパク質の N-端に近い領域へのパルミチル酸付加が重要であると考えられるがこれを証明することは今後の課題である. 培養神経細胞において SCG10 は成長円錐部とゴルジ体領域に局在することが示されている. この知見は SCG10 がラフトに存在するという我々の結果とよく一致している. ラフトに存在する SCG10 の微小管重合調節における役割の解明が今後の重要な課題である. SCG10 は tubulin と結合することで微小管の脱重合をもたらすと考えられている. しかしながら tubulin 重合に及ぼす Triton 不溶性画分の影響を遠心法で解析してみたところ, Triton 不溶性画分が微小管重合を促進するという予備的結果が得られた. また可溶性画分にわずかに存在する SCG10 は微小管タンパク調製の過程で得られる低温非感受性微小管画分に回収されるという結果も得られている. これらの予備的知見は SCG10 が微小管の重合や安定化に積極的に関与している可能性を示唆しており興味深い.

E. 結論

SCG10 が神経細胞膜中のラフト構造に局在しラフト中で tubulin と複合体を形成していることを示した. これらの知見は神経突起やシナプス構造の維持, 改変に SCG10, さらにはラフト構造 が関与していることを強く示唆している.

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Iino,S., Kobayashi,S., and Maekawa,S. Immuno-histochemical localization of a novel acidic calmodulin binding protein, NAP-22, in the rat brain. Neuroscience, in press (1999)

2)Funatsu,N.,Miyata,S.,Kumanogoh,H.,Shigeta,M.,Hamada,S.,Endo,Y.,Sokawa,Y., and Maekawa,S. Characterization of a novel rat brain GPI-anchored protein(Kilon), a member of the IgLON cell adhesion molecule family. J. Biol. Chem. in press (1999)

2. 学会発表

1) 熊ノ郷晴子, 船津宣雄, 寺尾花英, 前川昌平: ラット脳由来 Triton X-100 不溶性低比重画分中の新規タンパク質の解析. 日本神経化学会第40回/日本神経科学会第21回合同大会(東京, 1998年9月)

2) 船津宣雄, 熊ノ郷晴子, 前川昌平: Triton 不溶性低比重画分 (TIF) に存在する新規 GPI- アンカー型細胞接着因子の解析. 日本神経化学会第40回/日本神経科学会第21回合同大会(東京, 1998年9月)

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

老化脳における nGAPs mRNA の発現解析

水見敏行（東京医科歯科大学歯学研究科助手）

研究要旨

神経特異的に発現される遺伝子 SCG10 ならびに、神経成長関連遺伝子（neuronal growth associated proteins; nGAPs）は、神経可塑性に強く関わっていることが示唆されている。つまり、個体発生期の神経回路形成に伴って強く発現されること、ならびに成熟動物においても海馬等の可塑性に関わり合いが深いと考えられている部位に強く発現されていること、老化に伴って、発現量が減少することなどが報告されている。本研究では、脳障害後の機能回復における加齢変化と、SCG10 および、その類縁タンパク質の発現の変動の関連を調べるため、老若動物を用いた脳虚血モデルの作製を試みた。はじめにスナネズミを用いた両側頸動脈結紮モデルを試みたが、2 年齢以上の老齢動物において、安定した虚血障害を加えることが不可能であることが判明した。ついで、ラットを用いた片側中大脳動脈結紮-血流再灌流モデルを検討した。1 時間の虚血-再灌流 2 ヶ月後の明暗箱による記憶試験の成績を検討したところ、3 か月齢ラットに比べ、1 年齢ラットでは成績の回復が低いことが判明した。以上の結果より、上記、ラットの片側中大脳動脈結紮-血流再灌流モデルは、脳障害後の機能回復における加齢変化を調べるのに適していると考えられた。

キーワード nGAPs 神経可塑性 老化 虚血 学習

A. 研究目的

中枢神経系に特異的な機能である記憶・学習などの機能は、神経細胞の可塑性によって実現されていると考えられている。すなわち、記憶とは、いったん完成された神経回路の動的な組み替えによって実現されていると考えられている。個体発生期の突起

進展やシナプス形成で重要な役割を果たしている神経成長関連遺伝子（neuronal growth associated proteins; nGAPs）は、成熟個体においても記憶などに関わる神経可塑性を担っていると考えられている。また、老齢動物における nGAPs の発現低下は、加齢による学習行動の成績低下

との関連が示唆されている。

ところで、通常、中枢神経系が障害を受けた場合、神経細胞の再生は観察されない。生き残った神経細胞が発芽・分岐形成・突起進展などによって、脱落した神経細胞の機能を代替すると考えられているが、機能の回復と生き残った神経細胞による神経回路の再構成の関係は、未だ明示されていない。齧歯類を用いた脳虚血障害モデルでは、虚血数時間から数日で著しい神経細胞の脱落が観察され、それとともなって、学習行動の成績が低下することが報告されている。この学習行動の低下は、虚血負荷数ヶ月後、一部回復することが知られているが、報告はほとんど見られない。この機能回復は、虚血-再灌流1ヶ月程度で、海馬歯状回の電気生理学的な長期増強の誘導が再び可能になることや、population spikeの大きさが虚血前の大きさまで回復することなどに関連づけられているに過ぎない。

本研究では虚血後の機能回復期に注目して、加齢による神経可塑性の変動と nGAPs 発現量の変動を検討しようとした。すなわち、第1に機能回復期に nGAPs の発現量の変動があるのかどうか、第2に老若による機能回復の程度と nGAPs 発現量に関連があるのかどうかを検討しようとした。

B. 研究方法

1. スナネズミ両側頸動脈結紮-再灌流モデルの作製

麻醉下、スナネズミ両側頸動脈を結紮し、一定の時間後に結紮系を取り除いて血流を再開通する。

2. ラット片側中大脳動脈結紮モデルの作製

虚血負荷時、14 週齢（3ヶ月齢）、および、1 年齢のラット（SD 系、SLC）を用いて実験を行った。ハロタン麻醉下、ラット頸動脈分岐部を露出し、外頸動脈を焼灼・切断した。切断部の外頸動脈から、先端を歯科用印象材を塗って太くしたナイロン栓糸を挿入して内頸動脈と中大脳動脈分岐部を塞栓した。1 時間後に栓糸を抜き取り、外頸動脈の栓糸挿入口を焼灼した。梗塞巣は、エーテル深麻醉下、断頭屠殺したラットの脳からブレインマトリックスを用いて生切片を作製し、2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 染色を行って決定した。

3. 学習行動の解析

明暗箱による学習行動の測定

底面に電極を敷いたプラスチック製の箱（20 cm x 20 cm x 20 cm）を2つあわせ、一方を透明（明室）、他方を黒い蓋（暗室）で覆った。明室と暗室はラットが通行できる穴のあいた壁で仕切った。明室にラットをいれ、暗室に入ったら、ただちに底面の電極より電撃（60 V AC；獲得試行）を加え、暗室に入らなくなるという学習命題を施した。このとき暗室にはいるまでの時間を測定した（獲得試行の潜

時)。翌日に再び明室にラットを入れ（再現試行）、暗室にはいるまでの時間を測定した（再現試行の潜時）。5分たっても暗室に入らない動物は、便宜上、潜時を5分として計算した。

運動量の測定

40 cm x 70 cm の箱の内部に 10 cm づつの区画を設定し、ラットを5分間、自由に散策させた。ラットの両前肢が別の同一区画に移動した回数を数えて運動量とした。

4. nGAPs 発現の解析

現在、計画中である。

C. 研究結果 および D. 考察

1. スナネズミ 両側頸動脈結紮-再灌流モデルの作製

既報にあるとおり、5-10 分間の両側頸動脈結紮-再灌流によって、3ヶ月齢雄性スナネズミの海馬 CA1 領域に遅発性神経細胞死が観察された。また、3分間の両側頸動脈結紮では、1週間たっても海馬の神経細胞の十分な脱落が観察されなかったり、あるいは、全く神経細胞の脱落が観察されなかった。

2 年齢スナネズミは、エーテル麻酔下、両側頸動脈結紮中3分以内に死亡（4 頭死亡 / 全 5 頭）し、生存したのも翌日までの間に死亡した。ハロタン、ケタミン-キシラジン（9:1）混合麻酔によっても、3分間の両側頸動脈結紮によって翌日まで生存した動物は見られなかった（各 2 頭）。

以上のことより、2 年齢スナネズミ

を用いて両側頸動脈結紮モデルを作製することは不可能であると考えられた。

2. ラット片側中大脳動脈結紮モデルの作製

既報の通り、結紮-再灌流の翌日の梗塞巣は大脳皮質と線条体の一部におよんでいた。結紮-再灌流翌日の梗塞巣の面積は、3ヶ月齢ラットと1年齢ラットでほとんど違いが見られなかった（各 2 頭）。結紮-再灌流2ヶ月後では、3ヶ月齢ラットと1年齢ラットのどちらも、虚血負荷側の大脳皮質に著しい萎縮が見られた（各 3 頭）。反対側の半球には、肉眼による変化は認められなかった。虚血負荷側の脳は変形が著しいために3ヶ月齢ラットと1年齢ラットの比較は行わなかった。

3. 学習行動の解析

明暗箱による学習行動の測定

虚血負荷前の試行では、獲得試行の潜時、ならびに再現試行の潜時について、3ヶ月齢ラットと1年齢ラットで差が見られなかった（各 3 頭）。同一の個体で、虚血負荷2ヶ月後の獲得試行の潜時は、3ヶ月齢ラットと1年齢ラットで差が見られなかった。再現試行の潜時は、3ヶ月齢ラットが1年齢ラットよりも長かった（3ヶ月齢：300 秒 ± 0 秒；1年齢：113 秒 ± 14 秒）。すなわち3ヶ月齢ラットでは全個体（3 頭）が、明室に5分間滞まったのに対し、1年齢ラットでは、

半数以上が暗室に入った（入った個体 2 頭 / 全 3 頭）。

の成績と、nGAPs の発現量の変動を比較する実験の意義が示唆された。

運動量の測定

3ヶ月齢ラットと1年齢ラットともに虚血負荷の翌日の運動量は、虚血負荷前に比べて上昇した。虚血負荷後1週間ではほぼ、虚血負荷前の状態に戻り、虚血負荷後1ヶ月、および、2ヶ月でも同様であった。

本研究に用いた方法では、既報にあるような老若による運動量の違いは検出できなかった。

なお、電撃に対する感受性を検討するため、明室と暗室の通行を遮断した上で、3ヶ月齢ラットと1年齢ラットを明室に入れて、底面の電極の電圧を徐々に大きくし、ラットが発声を上げる電圧を測定したが、虚血負荷の前後で、3ヶ月齢ラットと1年齢ラットで差は見られなかった（各 3）。

E. 結論

以上の実験結果より、2年齢以上のスナネズミを用いて、安定した虚血障害モデルの作製が不可能であること、および、ラットを用いた片側中大脳動脈結紮1時間-血流再灌流モデルでは、血液再灌流後2ヶ月にわたって、3ヶ月齢ラットと1年齢ラットで同程度の脳障害が進行することが判明した。また、明暗箱の実験から、3か月齢ラットに比べ、1年齢ラットは成績の回復が低いことが判明した。このことは、2年齢以上のラットを用いて、明暗箱

19980193

報告書 続き[1]は下記に掲載

老化のなぞ解きをはじめ。 (特集) 遺伝子から探る老化のメカニズム
森望, 駒野宏人

Molecular Medicine. 35 巻 5 号, pp.556-569, 1998

19980193

報告書 続き[2]は下記に掲載

神経の可塑性制御と脳の老化. (特集)遺伝子から探る老化のメカニズ
ム

森望

Molecular Medicine. 35 巻 5 号, pp.654-663, 1998

19980193

報告書 続き[3]は下記に掲載

脳の老化:遺伝子発現の変動と神経可塑性の低下. (特集)老化研究の
フロンティア

森望

細胞工学. 17 巻 9 号, pp.1375-1385, 1998