

## Result

### Characterization of purified recombinant human UCH-L1 proteins

To avoid artificial polymerisation among proteins by disulfide bonds, we carefully purified wild-type UCH-L1, I93M (linked to familial PD), and S18Y (linked to reduced risk of PD), and I93/S18Y double-substituted recombinant proteins (Fig. 1A) under reducing conditions as described

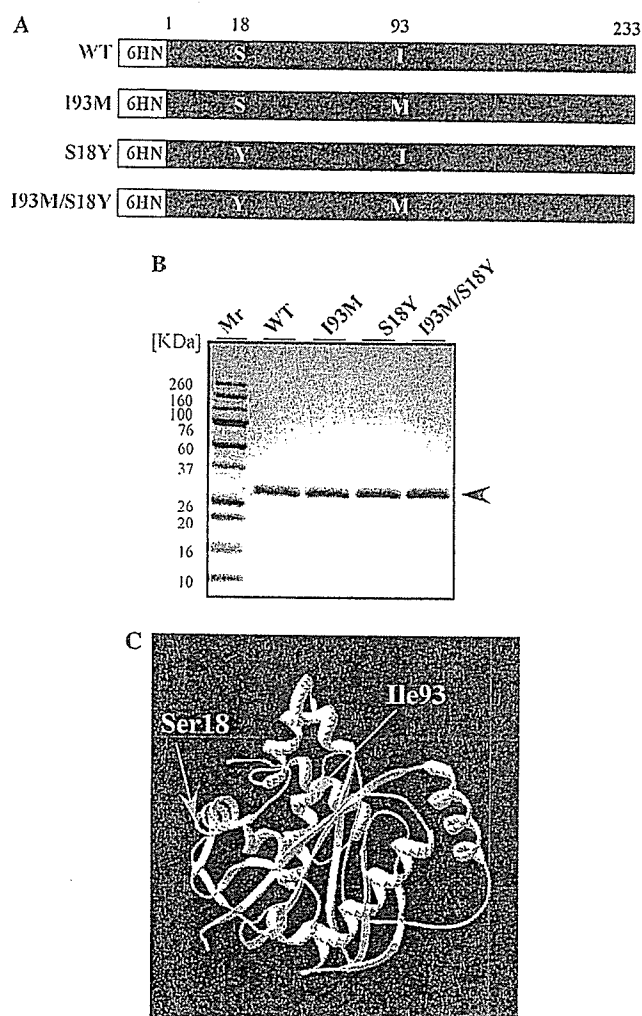


Fig. 1. Characterization and analysis of purified recombinant 6HN-tagged human UCH-L1s. (A) Schematic representation of 6HN-tagged human UCH-L1 wild-type (WT) and mutants I93M, S18Y, and I93/S18Y double-substituted recombinant. The numbers indicate the amino acid residues of the N- and C-termini of UCH-L1 (open reading frame). The positions of the point mutations are indicated. The N-terminal 6HN-tag is shown in white. (B) Visualization of recombinant human UCH-L1s by SDS-PAGE under reducing conditions and Coomassie staining. One microgram of each sample was subjected to analysis. The arrow indicates the 28.9-kDa 6HN-tagged human UCH-L1 bands. Mr, molecular weight markers (kDa). (C) The crystal structure of UCH-L1 was modeled after the crystal structure of human UCH-L3 [25] using SWISS-MODEL protein modeling [26–28]. The residue 93 is proximal to the active center (C90), while the location of residue 18 on the protein surface, distal from the active site.

previously [24]. SDS-PAGE showed a single 28.9-kDa band for each of the 6HN-tagged proteins (Fig. 1B) in good agreement with the theoretical 27.8-kDa molecular mass of the 6HN-tagged UCH-L1. The expression levels for the wild-type and variant UCH-L1 proteins were equivalent. The residue 93 is proximal to the active site (C90), while the location of residue 18 is on the protein surface, distal from the active site (Fig. 1C).

### SANS analysis of tertiary structure of wild-type and human UCH-L1 variants in water

SANS curves of a protein mostly reflect the characteristics of the aggregation number, shape, and dimensions of the structure. The experimental profile for the wild-type fitted well to the theoretical SANS curve (calculated from Eq. (2), based on the distance between the center of the two particles being 43 Å) of the dimer consisting of the two spherical monomers rather than that of the monomeric one ( $R = 21.5$  Å) calculated from Eq. (2) (Fig. 2). We noted a rotating ellipsoidal monomer and dimer when the axis ( $a$ ) was changed by the resolution of a 5 Å (Fig. 3A) and calculated the theoretical curves by Eq. (3) (Fig. 3B–D). The ambiguous difference between the theoretical SANS curves of the rotating ellipsoidal monomer (Fig. 3B) and the rotating ellipsoidal dimer (Fig. 3C) was observed in the  $q$  range of 0.03–0.1. However,  $I(q)_{\text{dimer}}$  markedly diminished in the  $q$  range of 0.1–0.15, and then reached the first minimum value at  $q = 0.15$ , although the scattering intensity ( $I(q)_{\text{monomer}}$ ), gradually declined with increasing  $q$  value. Thus, the characteristic decrease of the scattering intensity

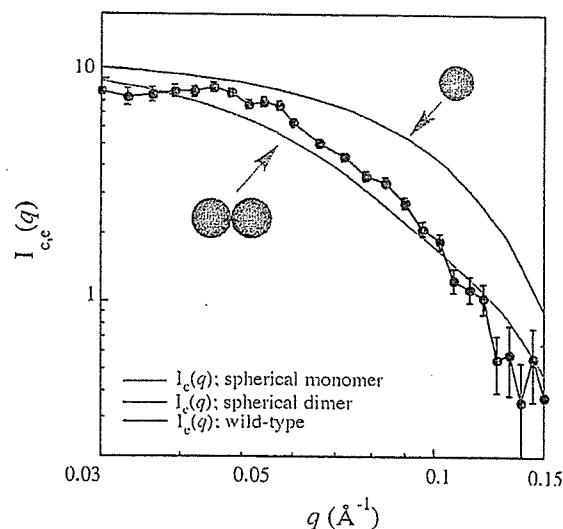


Fig. 2. The relative neutron scattering intensity ( $I(q)$ ) versus the magnitude of the scattering vector  $q$ .  $I_c(q)$  for the wild-type UCH-L1 (black closed circle). The blue line indicates theoretical curves;  $I_c(q)$ , monomeric sphere (diameter = 21.5 Å calculated from Eq. (3), based on the  $R = \sqrt{5/3}Rg$  value obtained using CRYSON program by Svergun [29,30]). The red line indicates theoretical curves;  $I_c(q)$ , dimeric spheres (calculated from Eq. (2), based on the distance between the center of the two particles being 43 Å).

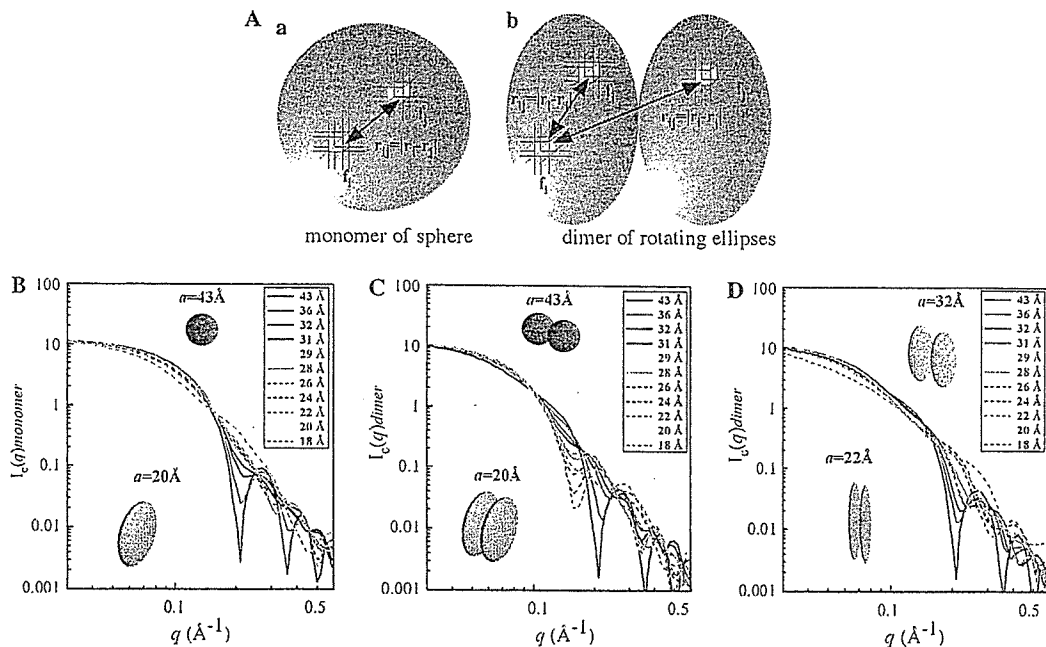


Fig. 3. Model calculations showing how ellipsoidal parameters affect the relative scattered intensity. (A) Schematic views of two body correlations. (a): monomer of a sphere. (b): dimer of rotating ellipses. In the  $q$  range of the SANS measurement, we assumed a constant scattering factor in the UCH-L1 variants, and thus divided the rotating ellipse by the resolution of a  $5 \text{ \AA}$  cube. (B)  $I_c(q)$  for the theoretical rotating ellipsoidal monomer, the remarks in the figure represent axis values of ellipsoid, e.g., when  $a$  is  $20 \text{ \AA}$ ,  $b$  and  $c$  are  $62 \text{ \AA}$ . (C)  $I_c(q)$  for the theoretical rotating ellipsoidal dimer (short axis,  $a$ ; and long axis,  $b$  and  $c$ ,  $a \leq b = c$ ). (D)  $I_c(q)$  for the theoretical rotating stick-like ellipsoidal dimer (short axis,  $a$  and  $b$ ; and long axis,  $c$ ,  $a = b \leq c$ ), the remarks in the figure represent axis values of ellipsoid, e.g., When  $a$  and  $b$  are  $22 \text{ \AA}$ ,  $c$  is  $164 \text{ \AA}$ . When  $a$  and  $b$  are  $32 \text{ \AA}$ ,  $c$  is  $78 \text{ \AA}$ .

in the  $q$  range of  $0.1$ – $0.15$  is observed on the SANS profiles of the rotating ellipsoidal dimers (short axis,  $a$ ; and long axis,  $b$  and  $c$ ,  $a \leq b = c$ ), however, not observed on the rotating stick-like ellipsoidal dimer (short axis,  $a$  and  $b$ ; and long axis,  $c$ ,  $a = b \leq c$ ) (Fig. 3D). The SANS profiles may provide the size of the rotating ellipsoidal dimers and therefore we applied this model to analyze the experimental SANS curves of UCH-L1 variants. The red lines in Fig. 4 are the best theoretical fits to a rotating ellipsoidal dimeric model determined individually for wild-type and each variant of UCH-L1s; the blue lines are those for a monomer having the same axis length. As shown in these figures, our data are consistent with this assumption in the  $q$  region. The wild-type is an ellipsoidal dimer [short axis,  $29 \text{ \AA}$ ; long axis,  $52 \text{ \AA}$  (Fig. 4A)], the I93M mutant is also an ellipsoidal dimer [short axis,  $20 \text{ \AA}$ ; long axis,  $62 \text{ \AA}$  (Fig. 4B)], the S18Y polymorphism is a spherical dimer [short axis,  $43 \text{ \AA}$ ; long axis,  $43 \text{ \AA}$  (Fig. 4C)], and the I93M/S18Y double-substituted variant is an ellipsoidal dimer [short axis,  $31 \text{ \AA}$ ; long axis,  $50 \text{ \AA}$  (Fig. 4D)]. The configuration of the aggregate was dependent on the monomeric protein structure caused by amino acid substitution. It is also quite clear that even the most deformed rotating ellipsoidal monomer never satisfies the experimental curve. The major component of UCH-L1 wild-type may exist as a dimer in water. These results imply that the most part of the wild-type and each UCH-L1 var-

iant self-assembles and exists as a dimer in water. Thus, the fitting evaluation of the difference in the size and the shape between monomer and dimer is available by analyzing the SANS curve in the optimum  $q$  range.

To address whether the observed configurational differences of the UCH-L1 variants in water reflect on altered secondary structure, we used CD spectroscopy to estimate the secondary structure in the recombinant proteins (Fig. 5A). The ratios of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, and other secondary structural features in these proteins were estimated from mean residue ellipticity data and are presented graphically in Fig. 5B. We previously indicated that relative to the wild-type, the I93M mutant displayed a slightly lower ellipticity over the range  $195$ – $200 \text{ nm}$ , indicating a decreased  $\alpha$ -helical content [24]. Relative to wild-type, the I93M substitution was also associated with the considerable increase in the content of  $\beta$ -sheet. On the other hand, the influence of the S18Y substitution on the variation of the secondary structures of UCH-L1 was smaller than that of I93M mutation, relative to the wild-type or the I93 mutant. However, the inclination was not only on the wild-type but also on the I93M mutant although the effect on increase of the  $\beta$ -turn content by the S18Y substitution of the amino acid sequence was small. These variations of the  $\beta$ -turn content were quite similar to those of the three-dimensional configuration of the ellipsoidal UCH-L1 based on SANS studies.

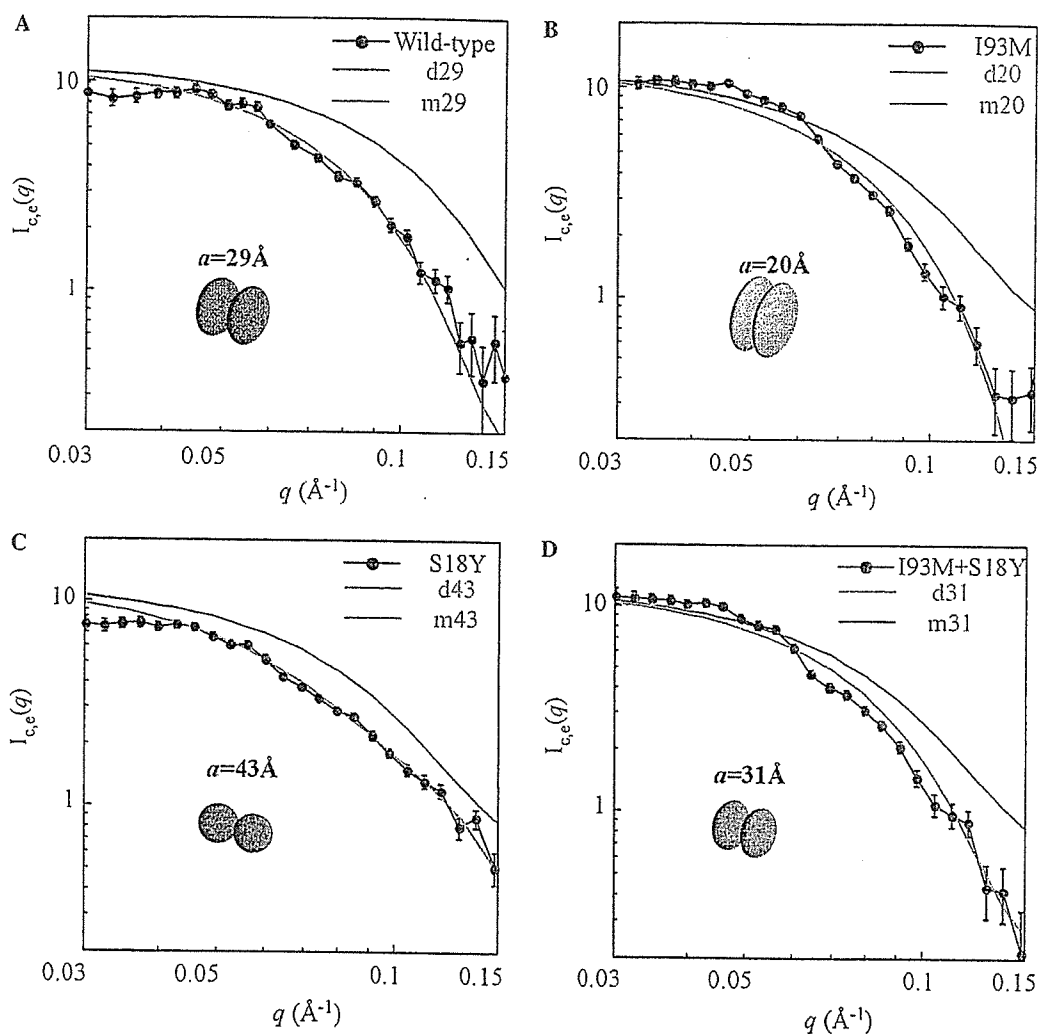


Fig. 4. Relative neutron scattering intensity  $I(q)$  versus the magnitude of the scattering vector  $q$ . (A)  $I_c(q)$  for the experimental curve of wild-type UCH-L1 (black close circle).  $I_c(q)$  for the calculated theoretical curves for dimer (d29) and monomer (m29). The red line corresponds to the theoretical fit for a rotating ellipsoidal dimer, ( $a$ , 29 Å;  $b$ , ( $=c$ ), 52 Å). The blue line represents for a rotating ellipsoidal monomer having the same diameter. (B)  $I_c(q)$  for the I93M mutant (black close circle). The red line corresponds to the theoretical fit for a rotating ellipsoidal dimer, ( $a$ , 20 Å,  $b$ , ( $=c$ ), 62 Å). The blue line represents for the monomer. (C)  $I_c(q)$  for the S18Y polymorphism (black close circle). The red line corresponds to the theoretical fit for a rotating spherical dimer, ( $a$ , 43 Å,  $b$ , ( $=c$ ), 43 Å). The blue line represents for the monomer. (D)  $I_c(q)$  for the I93M/S18Y double mutant (black close circle). The red line corresponds to the theoretical fit for rotating ellipsoidal dimer, ( $a$ , 31 Å,  $b$ , ( $=c$ ), 50 Å). The blue line represents for the monomer.

## Discussion

UCH-L1 is abundantly present neuronal brain protein enzyme with multiple enzymatic functions including hydrolysis of C-terminal ubiquityl esters, ubiquityl ligase activity, depending on multiple forms in an aqueous solution and stabilization of mono-ubiquitin. The aim of this study was to clarify whether UCH-L1 variants exist as a monomer or multimer in water and, in particular, to discuss the relation between the configuration of the variants and the risk of Parkinson's disease. We preferred SANS to address this question without adding any chemical modifications or physical force to proteins in water. We confirmed that no changes occurred on the SANS profiles of wild-type UCH-L1 and UCH-L1 variants during the measurement.

We first succeeded in demonstrating the configuration of UCH-L1 in an aqueous solution by SANS. The wild-type

was a dimer, and the monomeric component was ellipsoidal, contrary to the expectation based on the crystal structure (Fig. 1C). The I93M variant was a dimer, and the monomeric component was more ellipsoidal than that of the wild-type. The protective polymorphic variant, S18Y, was also a dimer, but the configuration was quite different compared to wild-type and I93M, the monomeric component retained its spherical shape. The size-distribution of the UCH-L1 wild-type and variants is dependent on the concentration based on the time derivative analysis of the sedimentation velocity [16]. The 80% of the total wild-type is a monomer ( $\sim 2.3S$ ),  $\sim 15\%$  is a dimer ( $4S$ ), and  $\sim 5\%$  is a tetramer ( $8S$ ) at  $7 \mu M$ . The populations of both oligomers increased with increased protein concentration, and the dimer became the predominant species at  $70 \mu M$ . A similar concentration-dependent size growth was observed on S18Y; all of S18Y existed as a monomer at  $10 \mu M$ , and

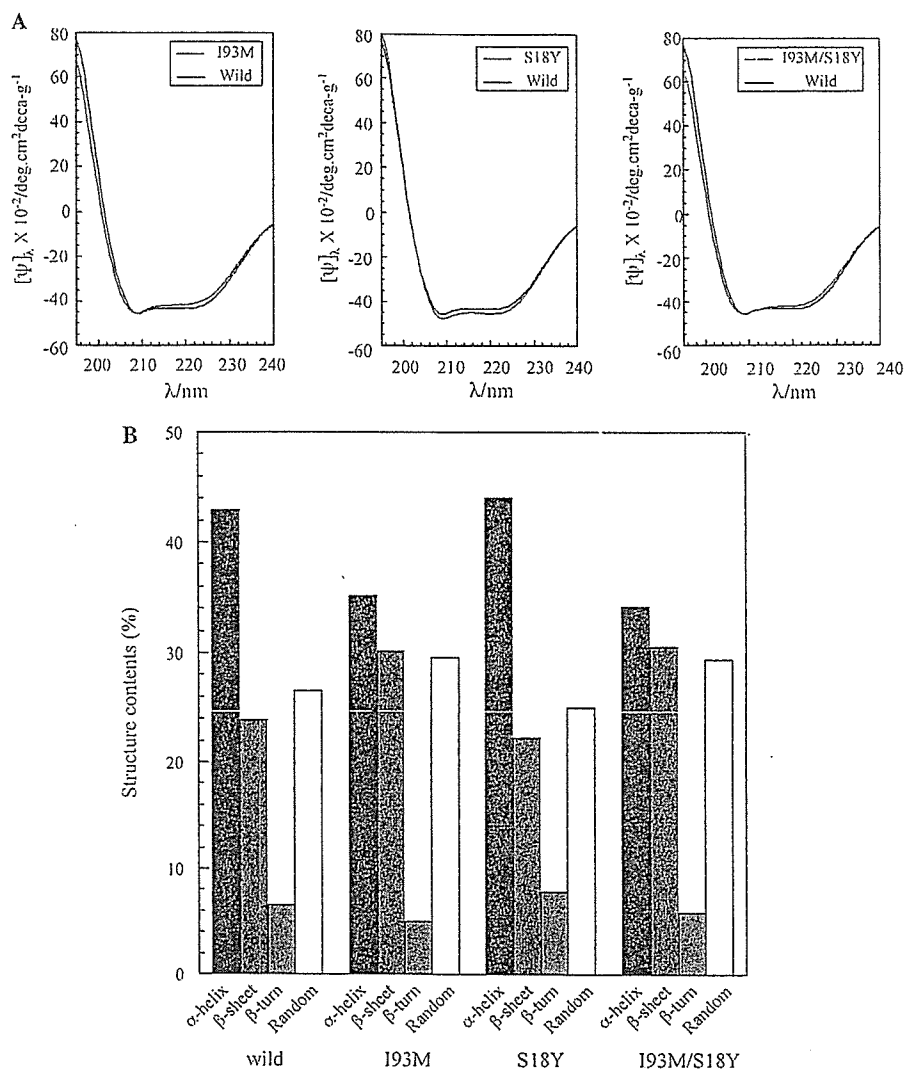


Fig. 5. CD spectra and secondary structural content of 6HN-tagged human UCH-L1s. CD spectra (mean residue ellipticity) for recombinant proteins ( $8.7 \times 10^{-4}$  M) in a 20 mM Hepes buffer (pH 7.8). (A) Wild-type UCH-L1 is shown in black, I93M in red, S18Y in blue, and S18Y/I93M in green. (B) Secondary structural content of recombinant human 6HN-tagged UCH-L1s.

the dimer was detected at  $28 \mu\text{M}$ . If homogeneity of the protein is attained in water, the configuration of protein should also be qualitatively equivalent at a lower concentration. Such an apparent size distribution was considered to be in a state of non-equilibrium, temporarily produced by adding a physical force, e.g., ultracentrifugation, to the protein.

In particular, we obtained important information about the shape of UCH-L1 in water by SANS observation; namely, the wild-type UCH-L1 and the variants formed rotating ellipsoids. The possible existence of the ellipsoidal dimer was suggested previously by analysis of the sedimentation velocity [16], indicating that the sedimentation value corresponding to the dimer (4S) was smaller than that of twice the monomer ( $\sim 2.3\text{S}$ ). This discordance implied that the dimer was anisotropic, but not a sphere. Here, we noted the influence of a comparative change of the  $\beta$ -turn content by the substitution of amino acid to the protein structure,

because as is well known, the  $\beta$ -turn content is an important component for constructing a three-dimensional structure, i.e., the globularity of protein [33,34] despite the low content. The relationship between the relative change of globularity (circular ratio =  $a/b$ , see SANS data analysis) and that of  $\beta$ -turn content is summarized in Table 1. Based on the wild-type, I93M substitution decreases the circular ratio to 58% and the  $\beta$ -turn content to 76%, whereas S18Y substitution increased the circular ratio to 179% and the  $\beta$ -turn content to 118%. If the S18Y substitution occurs on the I93M mutant, the circular ratio increases to 193% and the  $\beta$ -turn also increases to 156%. Conversely, the circular ratio decreases to 52% and the  $\beta$ -turn also decreases to 64%, if an I93M substitution occurs on the S18Y polymorphism. An I93M mutation rendered the ellipsoidal dimer more stable because of a decrease of the  $\alpha$ -helix [24], increase of the  $\beta$ -sheet, and decrease of the  $\beta$ -turn. Conversely, S18Y substitution regained the globu-

Table 1  
Relation between the relative change of ellipsoidal and  $\beta$ -turn by amino acid substitution

Type	Amino acid substitution	Circular ratio	Relative change of ellipsoidal	$\beta$ -turn content (%)	Relative change of $\beta$ -turn
Wild	Non	1.8 <sup>a</sup>	—	6.6	—
	I93M	3.1 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>	5.0	0.76 <sup>d</sup>
	S18Y	1.0 <sup>a</sup>	1.79 <sup>a</sup>	7.8	1.18 <sup>d</sup>
I93M mutant	S18Y	1.6 <sup>a</sup>	1.93 <sup>b</sup>	5.8	1.56 <sup>e</sup>
S18Y polymorphism	I93M	1.6 <sup>a</sup>	0.52 <sup>c</sup>	5.8	0.64 <sup>f</sup>

<sup>a</sup> The relative changes of the circular ratio of I93M and S18Y were calculated based on the wild-type, <sup>b</sup>based on the I93M, and <sup>c</sup>based on the S18Y.

<sup>d</sup> The relative changes of the  $\beta$ -turn content of I93M and S18Y were calculated based on the wild-type, <sup>e</sup>based on the I93M, and <sup>f</sup>based on the S18Y.

<sup>\*</sup> The relative change of the circular ratio ( $a/b$ ) was calculated.

larity of the dimer, and resulted in changing the ellipsoidal form of wild-type up to spherical, and also the ellipsoidal form of the I93M mutant up to a similar circular ratio of wild-type. The globularity of UCH-L1 variants is closely related to the variation of the secondary structures, further, to the locations of the substitution of amino acids on the protein. The location of residue 93 is near the hydrolytic active site and the substitution may directly restructure the local geometric configuration and affect hydrolytic activity. On the other hand, although the location of residue 18 is distal from the active site, the position is on the hydrophilic surface of the protein and the substitution may often affect  $\beta$ -turn formation (Fig. 1C). When two protein molecules form a spherical dimer by a very weak attractive force, such as the S18Y polymorphism, the presence of this type of oligomer cannot be detected by other methods except by SANS. Thus, that the globularity of the UCH-L1 molecule depends on the  $\beta$ -turn content was responsible for not only the dimeric configuration, but also the risk of Parkinson's disease.

Finally, we considered the relationship between configuration of wild-type UCH-L1 and UCH-L1 variants and their functions, i.e., multiple enzymatic activities, C-terminal hydrolase, and ubiquityl ligase (Fig. 6) [15,16,19–24]. The progressive deformation of the ellipsoidal form by the I93M mutation simultaneously impaired both the hydrolytic and ubiquityl ligase activities. This configurational defect could cause impairment of dynamic flexibility, which is necessary for enzymatic functions by the enlargement of the hydrophobic region. We can surely imagine the relation between progressive deformation of ellipsoidal dimer caused by I93M mutation and impairment of enzymatic functions. The restoration of globularity of monomeric UCH-L1 by S18Y substitution augmented the hydrolytic activity. In contrast, it markedly decreased the ubiquityl ligase activity. However, it is not easy to imagine why the restoration of globularity by S18Y substitution simultaneously decreases ubiquityl ligase activity and increases hydrolytic activity. Hydrolysis may be the dominant activity of UCH-L1, but it seems to be very sensitive to the dimeric configuration. However, the ubiquityl ligase activity may vary, coupled with the hydrolytic one, if both active centers are adjoined. However, the increased hydrolytic activity of the S18Y coupled with its decreased ligase

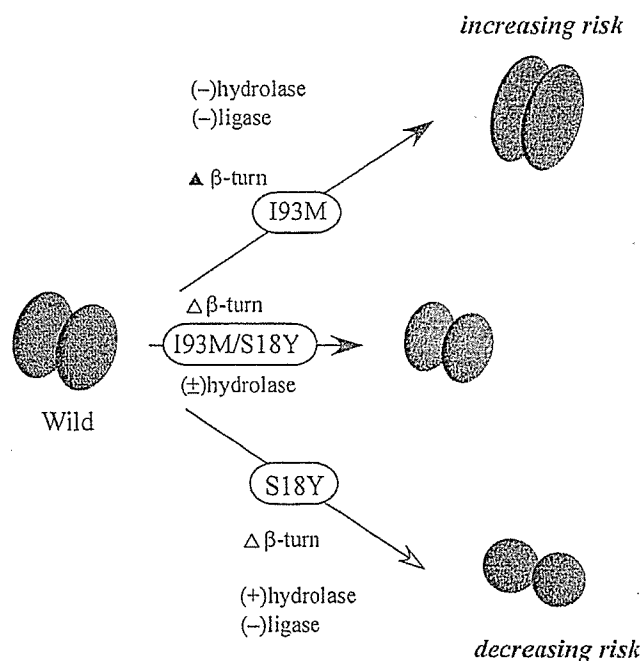


Fig. 6. Schematic speculative models of the relationship between the configuration of UCH-L1s in water and the multi-enzymatic activities. The self-assembled rotating ellipsoid wild-type dimer in water has both ubiquitin hydrolase activity and a ubiquityl ligase one. Both ubiquitin hydrolase and ubiquityl ligase activities decrease, as the result of an I93M mutation promoting the ellipsoidal deformation by a decrease of the  $\beta$ -turn and. A S18Y substitution recovers the globularity by an increase of the  $\beta$ -turn, causing an increase of ubiquitin hydrolase activity and a decrease of the ubiquityl ligase one. Thus, the variation of UCH-L1 hydrolytic activity caused by the deformation of the globularity of monomer component correlates to the PD risk.

activity (which can prevent  $\alpha$ -synuclein degradation by K63-linked ubiquitin ligation) may be additive or synergistic with respect to the decreased risk of sporadic PD [16]. In this study, SANS observation may help in the confirmation of these hypotheses by observing either the hydrolytic digestion of ubiquitinated-proteins or oligomerization of free-ubiquitin based on the multiple enzymatic functions of PD-associated UCH-L1 variants. We demonstrated that SANS is an important technique for the direct observation of pathological protein assembly in water. We anticipate the design of a new SANS in the near future that is suitable for medical science and pathological analysis.

## Acknowledgments

All authors acknowledge that the first two authors contributed equally to the study and are joint First Authors. This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, a grant from Pharmaceuticals and Medical Devices Agency of Japan, and a grant from Japan Science and Technology Agency.

## References

- [1] M. Hirai, M. Koizumi, T. Hayakawa, H. Takahashi, S. Abe, H. Hirai, K. Miura, K. Inoue, Hierarchical map of protein unfolding and refolding at thermal equilibrium revealed by wide-angle X-ray scattering, *Biochemistry* 43 (2004) 9036–9049.
- [2] Y. Yonezawa, S. Tanaka, T. Kubota, K. Wakabayashi, K. Yutani, S. Fujiwara, An insight into the pathway of the amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme obtained from a small-angle X-ray and neutron scattering study, *J. Mol. Biol.* 323 (2002) 225–237.
- [3] M. Hirai, H. Iwase, T. Hayakawa, K. Miura, K. Inoue, Structural hierarchy of several proteins observed by wide-angle solution scattering, *J. Synchrotron Rad.* 9 (2002) 202–205.
- [4] M. Tehei, D. Madern, C. Pfister, G. Zacai, Fast dynamics of halophilic malate dehydrogenase and BSA measured by neutron scattering under various solvent conditions influencing protein stability, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 14356–14361.
- [5] W.M. Garrison, Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins, *Chem. Rev.* 87 (1987) 381–389.
- [6] S.D. Maleknia, C.Y. Ralston, M.D. Brenowitz, K.M. Downard, M.R. Chance, Millisecond radiolytic modification of peptides by synchrotron X-rays identified by mass spectrometry, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3965–3973.
- [7] G. Xu, M.R. Chance, Radiolytic modification of sulfur-containing amino acid residues in model peptides: fundamental studies for protein footprinting, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2437–2449.
- [8] S. Kuwamoto, S. Akiyama, T. Fujisawa, Radiation damage to a protein solution, detected by synchrotron X-ray small-angle scattering: dose-related considerations and suppression by cryoprotectant, *J. Synchrotron Rad.* 11 (2004) 462–468.
- [9] F.F. Robert, D.J. Rodi, A. Mirza, T.C. Irving, E. Kondrashkinad, L. Makowski, High-resolution wide-angle X-ray scattering of protein solutions: effect of beam dose on protein integrity, *J. Synchrotron Rad.* 10 (2003) 398–404.
- [10] F. Matumoto, K. Makiko, K. Maeda, H. Patzelt, Y. Maeda, S. Fujiwara, Conformational changes of troponin C within the thin filaments detected by neutron scattering, *J. Mol. Biol.* 342 (2002) 1209–1221.
- [11] W. Yong, A. Lomakin, M.D. Kirkitadze, D.B. Teplow, S.-H. Chen, G.B. Benedek, Structure determination of micelle-like intermediates in amyloid-protein fibril assembly by using small angle neutron scattering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 150–154.
- [12] A.J. Doig, E. Hughes, R.M. Burke, T.J. Suà, R.K. Heenanà, J. Luà, Inhibition of toxicity and protofibril formation in the amyloid- $\beta$  peptide  $\beta(25-35)$ , *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 537–542.
- [13] K. Lu, J. Jacob, P. Thyagarajan, V.P. Conticello, D.G. Lynn, Exploiting amyloid fibril lamination for nanotube self-assembly, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2002) 6391–6393.
- [14] K.D. Wilkinson, K.M. Lee, S. Deshpande, P. Duerksen-Hughes, J.M. Boss, J. Pohl, Ubiquitin and the Biology of the Cell, Plenum Press, New York, 1998, pp. 99–125.
- [15] E. Leroy, R. Boyer, G. Auburger, B. Leube, G. Ulm, E. Mezey, G. Harta, M.J. Brownstein, S. Jonnalagada, T. Chernova, A. Dehejia, C. Lavedan, T. Gasser, P.J. Steinbach, K.D. Wilkinson, M.H. Polymeropoulos, The ubiquitin pathway in Parkinson's disease, *Nature* 395 (1998) 451–452.
- [16] Y. Liu, H.A. Lashuel, A. Liu, P.T. Lansbury Jr., The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect  $\alpha$ -synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility, *Cell* 111 (2002) 209–218.
- [17] H. Osaka, Y.L. Wang, K. Takada, S. Takizawa, R. Setsuie, H. Li, Y. Sato, K. Nishikawa, Y.J. Sun, M. Sakurai, T. Harada, Y. Hara, I. Kimura, S. Chiba, K. Namikawa, H. Kiyama, M. Noda, S. Aoki, K. Wada, Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin ion neuron, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 1945–1958.
- [18] Y. Manago, Y. Kanahori, A. Shimada, A. Sato, T. Amano, Y. Sato-Sano, R. Setsuie, M. Sakurai, S. Aoki, Y.-L. Wang, H. Osaka, K. Wada, M. Noda, Potentiation of ATP-induced currents due to activation of P2X receptors by ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1, *J. Neurochem.* 92 (2005) 1061–1072.
- [19] D.M. Maraganore, M.J. Farrer, J.A. Hardy, S.J. Lincoln, S.K. McDonnell, W.A. Rocca, Case-control study of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease, *Neurology* 53 (1999) 1858–1860.
- [20] P. Wintermeyer, R. Kruger, W. Kuhn, T. Muller, D. Woitalla, D. Berg, G. Becker, E. Leroy, M. Polymeropoulos, K. Berger, H. Pruntek, L. Schols, J.T. Epplen, O. Riess, Mutation analysis and association studies of the UCHL1 gene in German Parkinson's disease patients, *Neuroreport* 11 (2000) 2079–2082.
- [21] J. Zhang, N. Hattori, E. Leroy, H.R. Morris, S. Kubo, T. Kobayashi, N.W. Wood, M.H. Polymeropoulos, Y. Mizuno, Association between a polymorphism of ubiquitin carboxyterminal hydrolase L1 (UCH-L1) gene and sporadic Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.* 6 (2000) 195–197.
- [22] J. Satoh, Y. Kuroda, A polymorphic variation of serine to tyrosine at codon 18 in the ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 gene is associated with a reduced risk of sporadic Parkinson's disease in a Japanese population, *J. Neurol. Sci.* 189 (2001) 113–117.
- [23] Y. Momose, M. Murata, K. Kobayashi, M. Tachikawa, Y. Nakabayashi, I. Kanazawa, T. Toda, Association studies of multiple candidate genes for Parkinson's disease using single nucleotide polymorphisms, *Ann. Neurol.* 51 (2002) 133–136.
- [24] K. Nishikawa, H. Li, R. Kawamura, H. Osaka, Y.L. Wang, Y. Hara, T. Hirokawa, Y. Manago, T. Amano, M. Noda, S. Aoki, K. Wada, Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304 (2003) 176–183.
- [25] S.C. Johnston, C.N. Larsen, W.J. Cook, K.D. Wilkinson, C.P. Hill, Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 Å resolution, *EMBO J.* 16 (1997) 3787–3796.
- [26] M.C. Peitsch, Protein modeling by E-mail, *Bio/Technology* 13 (1995) 658–660.
- [27] N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18 (1997) 2714–2723.
- [28] T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3381–3385.
- [29] D.I. Svergun, C. Barberato, M.H.J. Koch, M. CRYSOLE—a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Crystallogr.* 28 (1995) 768–773.
- [30] D.I. Svergun, S. Richard, M.H.K. Koch, Z. Sayers, K.G. Zaccari, Protein hydration in solution: experimental observation by X-ray and neutron scattering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 2267–2272.
- [31] P. Debye, Zerstreuung von Röntgenstrahlen, *Ann. Phys.* 46 (1915) 809–823.
- [32] J.T. Yang, C.S. Wu, H.M. Martinez, Calculation of protein conformation from circular dichroism, *Methods Enzymol.* 130 (1986) 208–269.

- [33] R.H. Thomas, A.K. Roger, A.G. Margaret, F.G. John, O.F. Robert, Transfer of a b-turn structure to a new protein context, *Nature* 339 (1989) 73–76.
- [34] A. Perezel, B.M. Foxman, G.D. Fasma, How reverse turns may mediate the formation of helical segments in proteins: an X-ray model, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 8210–8214.

## 膜骨格 細胞骨格と細胞膜との相互作用

中田千枝子・諸根信弘・楠見明弘

細胞膜に接した部分の細胞骨格は、細胞膜機能の発現に必須であり、“膜骨格”とよばれる機会が増えてきた。膜骨格には多様な膜貫通型蛋白質が結合しており、短寿命の結合も含めると膜骨格のコントゥアの15～30%は、膜貫通型蛋白質によって占められているようである。膜分子を1分子追跡することによって、細胞膜の概念にパラダイムシフトが必要なことがわかってきた。すなわち、膜骨格とそこにアンカーされた膜蛋白質(ピケット)は、細胞膜中のすべての分子に対しての拡散障壁となり、細胞膜を30～200 nm程度のコンパートメントに仕切っている。これが、細胞膜上でのシグナル変換の空間制御、大規模な拡散障壁の形成などを可能にしている。

▶▶ KEY WORDS : 細胞膜の仕切り 1分子追跡 神経細胞の極性形成

### はじめに：膜骨格の構造圏

赤血球の直径は約8  $\mu\text{m}$ 。それに対して、毛細血管の太さは3～5  $\mu\text{m}$ 。それでは、どのようにして、赤血球は毛細血管を通過していくのだろうか？ 答えは、くなくにゃと折りたたまれて通過する、ということである。だから、赤血球は全体としてきわめて柔らかい構造もっているに違いない。しかし、同じ赤血球は太い動脈も通過しなくては行けない。ここでの流速は、瞬間的には毎秒数メートルにも達する。細い管の中でこのような速さで液体を流すとどうなるか？ 管壁上では摩擦のため液体は流れにくい。その結果、管の真ん中では管壁近くよりはるかに流れが速くなる。したがって、動脈中にある1個の赤血球では、壁近くの部分より真ん中の部分で前に大きく引っ張られ、大きな変形力(引きちぎる力となるので剪断力とよばれる)がかかる。もし、赤血球が柔らかかったら、大きく変形するだけではなく、引きちぎられてしまうかもしれない。赤血球は約1分間で体内を一巡し、寿命は120日程度なので、その間に、18万回もこのような折りたたみと剪断力に抗して踏みとどまる、という過程の繰返しに耐えなくては行けない。

これはどのようにして可能になっているのであろうか？ 赤血球の膜自体は、通常脂質と膜蛋白質からできたりボソームのような膜であるので、十分に柔らかいが剪断力には弱い。そこで注目されたのが、細胞膜の細

胞質側表面を覆っていた線維状蛋白質のネットワークであり、“膜骨格(membrane skeleton)”という名前を与えられた(図1)。1970年代のことである。この言葉は、今では、はるかに広い意味に用いられるが、それについては後述する。

赤血球膜の膜骨格構造を図1に示す<sup>1-5)</sup>。スペクトリンは非常に柔軟性のある蛋白質分子で、かかる力によって長さが大きく変わるし、折れ曲がりもかなり自由である<sup>2,6,7)</sup>。赤血球には細胞内に細胞骨格がなく、膜骨格だけで細胞の変形に対処している。このような膜骨格が、柔らかいほうはよいとして、どのように剪断力に耐えるかは、まだ、完全には解かれていない。しかし、ある程度引っ張られると、そこから先はスペクトリン4量体は伸びられないことが予想されるので、少なくとも、リボソームのように簡単に壊れたり引きちぎられたりはしないことが想像できる。

一方、白血球系の細胞は、血管通過の問題を別の方法で解決しているように思われる。すなわち、白血球系の細胞の多くには、細胞膜直下に数マイクロメートルの厚さでアクチンフィラメントがびっしりと存在している。これらのアクチンフィラメントは、赤血球の40 nm程度の短い線維ではなく、何マイクロメートルもの長さになっている。さらに、非常に多くのアクチン結合蛋白質が存在し、これらが、アクチンを側面どうしでつないでア

Chieko Nakada<sup>1</sup>, Nobuhiro Morone<sup>2</sup>, Akihiro Kusumi<sup>1,3</sup>, <sup>1</sup>京都大学再生医科学研究所 ナノ再生医工学研究センター, <sup>2</sup>国立精神・神経センター 神経研究所, <sup>3</sup>膜機構プロジェクト ICORP-JST E-mail: akusumi@frontier.kyoto-u.ac.jp <http://www.nanobio.frontier.kyoto-u.ac.jp/>

Membrane skeleton : Interaction of the plasma membrane with the cytoskeleton



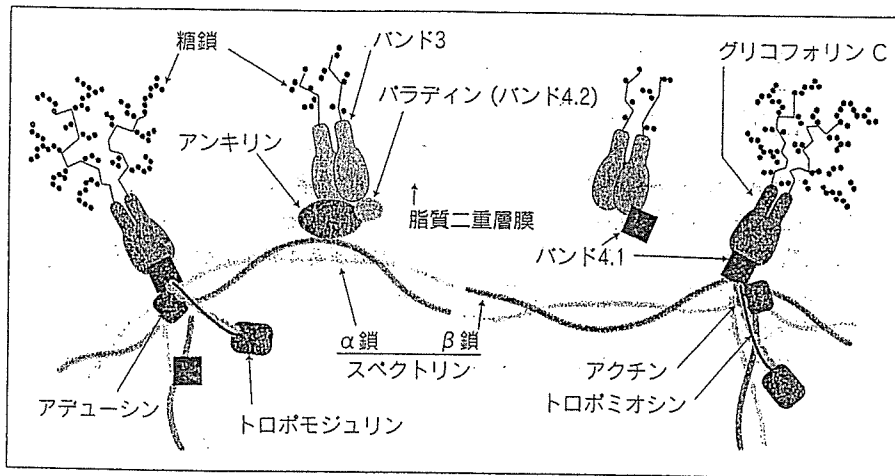


図1 赤血球の膜骨格

赤血球の膜裏打ち骨格と構成分子の代表的なものを描いた。グリコフォリンなどの膜蛋白質と膜表面にあるバンド4.1などの蛋白質複合体に、12~18個くらいのGアクチンからなる重合体が結合して、膜表面から33 nm程度伸びだしている<sup>3,4)</sup> (向きは確定的でない。膜に沿って存在している可能性もある<sup>5)</sup>)。この短いアクチンフィラメントはトロポミオシンに結合して、Gアクチンの個数はトロポミオシンの長さの分だけある。トロポモジュリンは短いアクチンフィラメントのpointed endでトロポミオシンと結合して、他のアクチン結合蛋白質とともにフィラメントを安定化させるといわれている。このように短いアクチンフィラメントが膜表面から杭のように出ているが、それらの杭の間を横につないでいるのがスペクトリンの4量体である。スペクトリンは線維状のα鎖とβ鎖が横どうしで結合して2量体をつくり、それらが頭どうしで結合して4量体となっている。

クチンフィラメントを束にしたり<sup>8)</sup>、70°の角度で分岐させたり<sup>9)</sup>、直角に結合させたり<sup>10)</sup>する。このようにしてつくられたアクチンフィラメントのネットワークが、赤血球と違って細胞膜の内側表面から細胞質へと3次元的に広がっている。これを皮質アクチン(cortical actin)とよぶ。これが、白血球の変形能、血管での柔らかさと耐力性能を担っていると考えられている。細胞外から刺激をすると、板状の突起を激しく出し入れ(ラフリングとよぶ)したり、マクロファージのように、自分と同じくらい大きなものを飲み込もうとして変形したりするのも、皮質アクチンのはたらきによる。

血球系以外の細胞では、細胞質中に発達した細胞骨格がある。アクチンフィラメント、ケラチンフィラメントなどの中間径フィラメント、微小管(microtubule)の3種のうちで、とくにアクチンフィラメントが、細胞膜までネットワークを広げていて、細胞膜との相互作用が強い(諸根ら、投稿準備中)。このように、細胞骨格と膜骨格は連続しているので、はっきりとした定義は難しいが、アクチン細胞骨格の、細胞膜から数十ナノメートルの範囲が、しばしば“膜骨格”とよばれる。単に“細胞骨格”ではなく、“膜骨格”という言葉が使われるのは、以下

の理由による。

(1) その部分は、細胞膜と共同して機能することが多く、機能的には細胞膜の一部と考えたほうがよいことが多い。

(2) 細胞膜との相互作用のため、バルクの細胞骨格とは違う種類の蛋白質が存在し、また違った構造をとっている。アクチンフィラメントが細胞膜と相互作用するとき、多くは、速く重合するbarbed end側を細胞膜に向けて細胞膜(またはその内側表面)にある分子と相互作用していることに注意されたい。アクチンフィラメントは、barbed endを膜に向けて、その逆側(pointed end)から細胞質に向かって伸び出す。一部はその後、横に曲がって、細胞膜とその側面で結合する。

これらの細胞でも、膜骨格は、細胞膜の形を決めたり、変えたり、維持したり、浸透圧に抗したりするのに大きな役割を果たしているようである。しかし、いずれの細胞でも、膜骨格が細胞膜のシグナル変換やシグナルの空間制御にも役立っているらしいことがわかってきた。これについては、本稿の終わりのほうで述べる。

## I. 膜骨格の蛍光顕微鏡観察?

ここで簡単に、蛍光顕微鏡を用いた膜骨格や細いアクチンフィラメントのネットワークの可視化について説明しておきたい。非常に初歩的な誤りが多いからである。スペckルを見る場合を除いて、1本のアクチンフィラメントや、アクチンフィラメントからなるネットワークは、通常の蛍光顕微鏡法では線維やネットワークとしては見えない。シグナルが弱いうえに、光学顕微鏡の分解能300 nmの中に線維が複数本あって1本ずつは見えない。したがって、細胞全体がぼんやりと光っているように見えるのが、実は、1本の、あるいは、少数のアクチンフィラメントからなる細い線維のネットワークなのである。したがって、通常の蛍光顕微鏡で膜骨格の挙動を

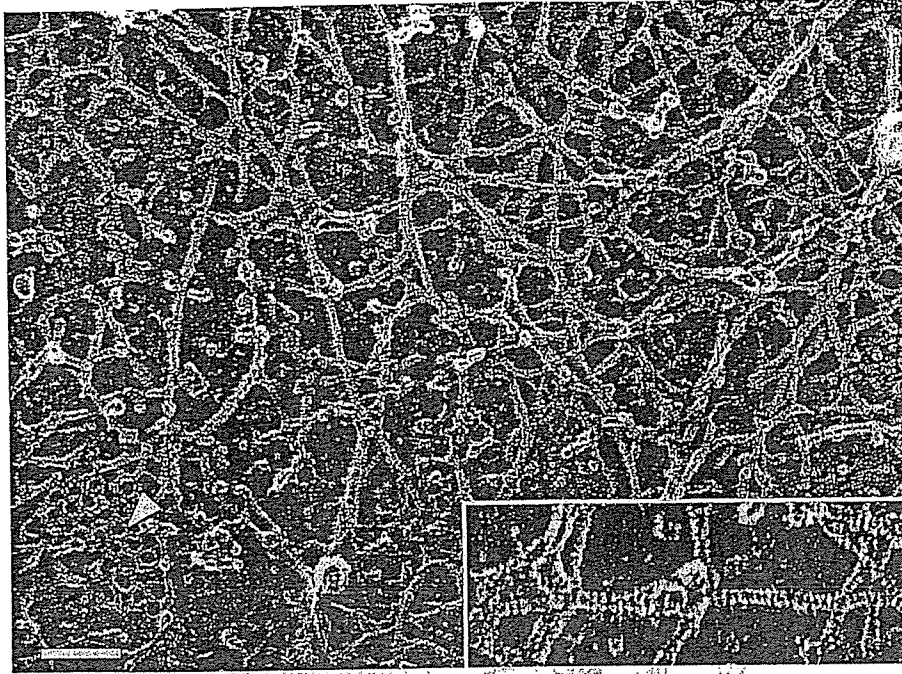


図2 膜骨格の電子顕微鏡写真

ラット由来のFRSK細胞の細胞膜を細胞質側からみた。網目状の膜骨格構造がみられる。1本1本の線維は斜めに細い縞模様をもつ(拡大図)ことから、膜骨格はおもにアクチンフィラメントからなることがわかる。なおこの写真では、六角形の格子が特徴的なクラスリン被覆ピットもみられる(矢頭)。スケールバー: 100 nm.

観察するのは非常に難しい。

蛍光顕微鏡下で、はっきりと線維状に見えるものの多くは、多数のアクチンフィラメントが束になっているストレスファイバーである。ストレスファイバーの特徴は、線維が曲がらず、10 $\mu$ m以上にわたって直線的なものが多いことである。とくに、ファロイジンを用いた染色では、ストレスファイバーが強調されて可視化される(抗体では、ファイバー内へ入り込むのが難しいためか、それほどではない)。したがって、蛍光標識、とくに蛍光ラベルファロイジンを使ってアクチンを観察すると、多くの場合、アクチンフィラメントのほんの一部であるにすぎないストレスファイバーだけを見てしまうことになる。ストレスファイバーの様子だけから、アクチンフィラメント全体の挙動を推定することは不可能である。ストレスファイバーの増減は、1本の細いアクチンフィラメントの増減と相関しないことが多いからである。たとえば、アクチン重合阻害剤であるラトランキュリンをごくうすい濃度で含む培養液中に細胞を入れると、細いアクチンフィラメント(膜骨格のほとんどがこの1本のアクチンフィラメントからなる)の脱重合が急速に進むにもかかわらず、ストレスファイバーは長時間安定で、蛍光顕微鏡では、アクチンフィラメント(たとえば膜骨格)に変化がないように見えてしまう。また、アクチン分子を多く発現している細胞を長時間ラトランキュリン溶液とインキュベートしておく、今度は、ス

トレスファイバーが分解して、アクチン余り現象が起こり、細いアクチンフィラメントのネットワークができ始めることがある。このときは、蛍光顕微鏡ではアクチンフィラメント(実はストレスファイバー)がないように見えるのに、実は、細いアクチンフィラメントのネットワークが再生しているという状況になる。

## II. 膜骨格はおもにアクチンフィラメントからなる：電子顕微鏡観察

図2は、培養細胞を用いて細胞膜の内側表面を電子顕微鏡で観察したものである。急速凍結-ディープエッチ-白金炭素蒸着、という方法で試料を準備した(実際には以下のプロセスを用いる。ガラス表面に培養した生細胞の上からもう1枚のカバーガラスを押しつけてからはがすと、細胞の上側の膜が剝離して付いてくる。すなわち、細胞膜の細胞質側表面が、ガラスと反対側に向けて露出した状態になる。このガラスを細胞膜を下にして、液体ヘリウムで-253 $^{\circ}$ Cまで冷やした純銅ブロックに押しつけて、細胞膜を急速に凍結させる。真空中-120 $^{\circ}$ Cでガラスナイフによって余分な氷を削り落とした後、-100 $^{\circ}$ C付近で残った氷を昇華させ、表面から200nmくらいまでの構造を真空中に露出させる。このままでは電子線を散乱できずコントラストがつかないので、そこに、白金と炭素を蒸着させ、試料表面の構造を透過型電子顕微鏡

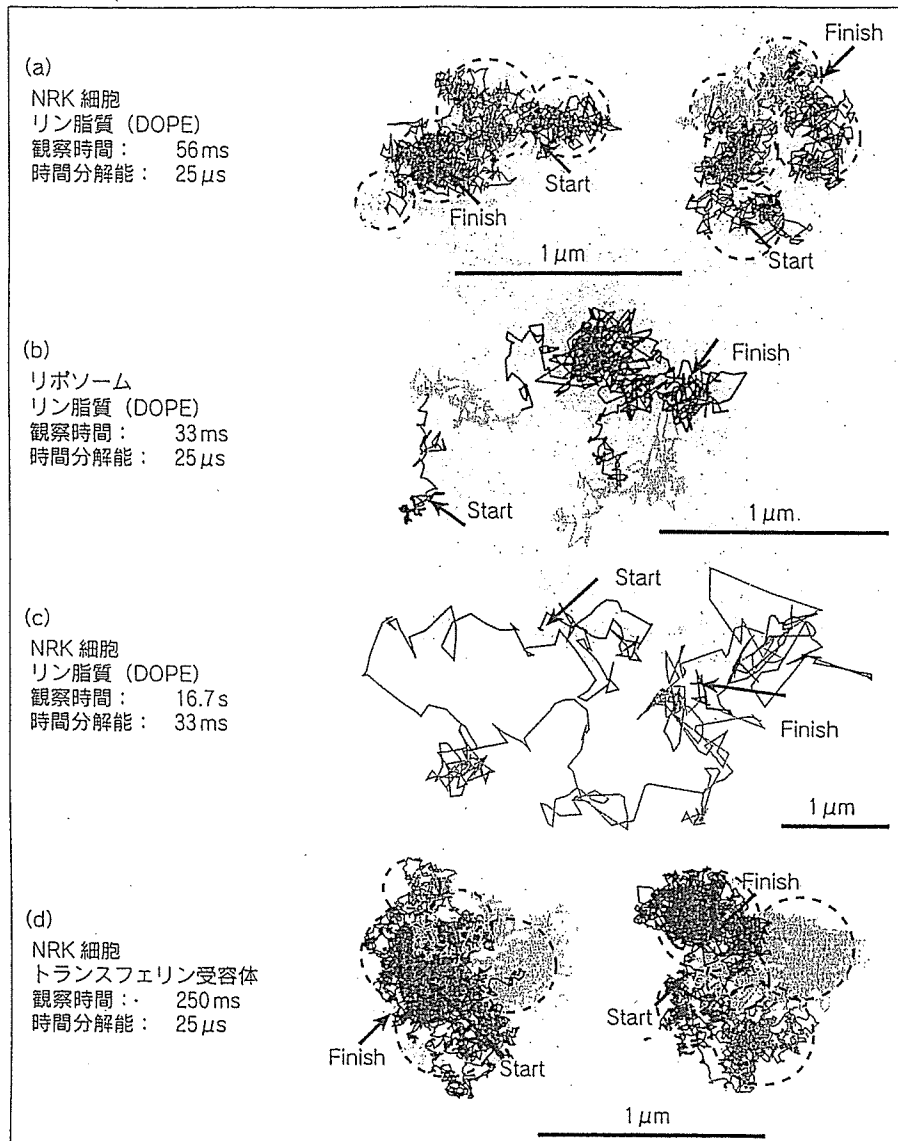


図3 膜分子の1分子ごとの動きをみる

リン脂質 (a~c) および膜蛋白質であるトランスフェリン受容体 (d) の, NRK 細胞膜上 (a, c, d) またはリボソーム膜上 (b) での典型的な運動を軌跡で示した. 矢印で Start と示した場所が軌跡の開始点で, そこから紫→青→緑→黄色→赤の順に軌跡が移動している. 観察の時間分解能が 25  $\mu$ s のとき, 細胞膜上では 2 種類の膜分子とも, 同様の大きさのコンパートメントに一時的に囲い込まれたホップ拡散をしている (点線でコンパートメントのおおよその境界を示した). 時間分解能が 33 ms である通常のビデオカメラでは, 細胞膜上のリン脂質は遅い単純ブラウン運動にみえることに注目されたい (c). また, 同じ数のコンパートメントを移動するのにかかる時間 (観察時間) から, 膜蛋白質のほうが 1 つのコンパートメントに囲い込まれる時間が長いために複数のコンパートメントを飛び越えて長距離を拡散するのに時間がかかることがわかる. 膜骨格をもたないリボソームではホップ拡散はみられず, 速い自由拡散を行う (b).

で観察する). 図 2 で, 左下のほうにはクラスリン被覆ピットが見える (矢頭) ので, 細胞膜の細胞質側表面を見ていることがわかる. 真ん中から右のほうにかけてとくに多くなっている線維状網目構造が膜骨格である. それぞれの線維を見ると, 5.5 nm ごとに線維にはほぼ垂直に縞模様が見える (拡大図). これはアクチンフィラメントの特徴であることから, 膜骨格のほとんどがアクチンフィラメントであることがわかる. 抗アクチン抗体で被覆した金粒子の標識を用いても, これは確認された. さらに, スペクトリンやアンキリンなどのアクチン細胞骨格に局在する蛋白質も見い出されている. また, このようなアクチンフィラメントの網目構造は, 細胞膜全面にわたって存在した.

### III. リン脂質の奇妙な動き: 細胞膜構造のパラダイムシフト

このような膜骨格の存在は, 細胞膜中の分子の運動にも大きな影響を与えている可能性がある. これを調べるために, 筆者らは不飽和リン脂質の DOPE に蛍光分子あるいは金コロイド粒子のプロープをつけ, 細胞膜上でプロープの挙動を観察した<sup>11)</sup> (mini-Column 参照).

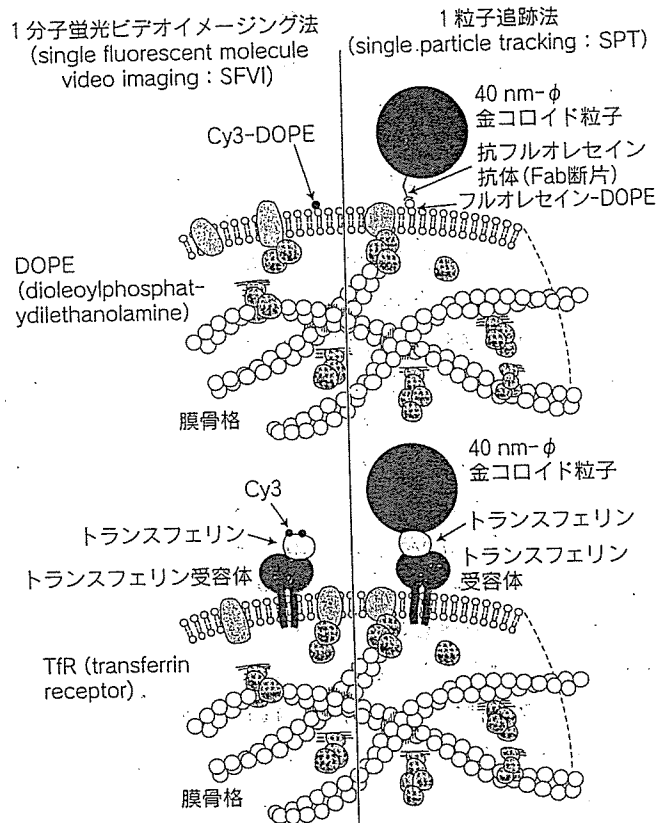
図 3a は, ラット線維芽細胞 (NRK) の細胞膜で, 1 分子の DOPE 分子が熱拡散運動するのを追跡した典型的な軌跡である. それらは高速ビデオカメラを用いて, 分子の位置を 25  $\mu$ s おきに決め (15 nm 程度の精度), そ

### 1 分子観察法に用いるプローブの概要

図の左側は1分子蛍光ビデオイメージング法 (SFVI) で観察するときのプローブ。リン脂質を観察するためには、リン脂質のDOPEに蛍光分子Cy3を結合したものを合成し (Cy3-DOPE)、細胞膜外層に導入した。膜蛋白質のトランスフェリン受容体を観察するためには、リガンドであるトランスフェリンをCy3で標識した。蛍光分子はCy3に限らず、さまざまな分子を用いることができる。その際、高いモル吸光係数および量子収率をもち (明るい)、光褪色しにくい蛍光分子が観察しやすい。またGFPなどの蛍光蛋白質をプローブとすることも可能である。細胞膜上のこれらのプローブからの蛍光シグナルを増倍度の高いイメージンシファイアーを通して高感度CCDカメラで検出し、その運動を観察することにより、知りたい分子の1分子ごとの運動を比較的簡便に調べることができる。SFVIのおもな利点は、分子の標識が簡便なことと、有機化合物の場合はプローブ自体の大きさが比較的小さいので、立体障害を与えにくいことである。

右側は1粒子追跡法 (SPT) で用いるプローブ。直径40 nmの金コロイド粒子表面に抗体やリガンドを結合させ、目的の分子を標識する。金コロイド粒子は細胞や膜構造に比べて散乱が強いので、高輝度の照明を用いた明視野照明系で画像を取得し、さらにコントラストを増強することによって黒い点として検出できる。この方法の利点は、コントラストが

強いので、高速ビデオカメラを用いることによって高時間分解能で分子の微細な運動を観察できること、また、蛍光分子のように褪色しないので長時間観察できることである。



の座標を時間順につないだものである。リン脂質分子は、速い熱運動をするが、ある領域に閉じ込められたように振る舞い、しばらくすると隣の領域に移ってふたたびその内部で速い運動をし、また次の領域に飛び移る、という運動をしていた。統計的な解析の結果、このような運動はランダムな熱運動ではありえない特徴的なものであることがわかった。これを筆者らはホップ拡散とよんでいる。リポソーム膜ではこのような運動は観察されない (図3b)。

NRK細胞膜では、リン脂質が感じる細胞膜上の仕切りの大きさは平均230 nmであり、その内部ではリポソ

ーム膜と同じ  $5 \sim 10 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  という大きい拡散係数のブラウン運動をしていた。仕切りで囲まれた一つの区画 (コンパートメント) に滞在する時間は、平均11 msであった。これらの結果は、以下の2つのポイントを明らかにしている。

第1に、上でみられたコンパートメントの中に、さらに小さなコンパートメントがあるという可能性は低い。なぜなら、コンパートメント中の拡散係数はリポソーム中のそれとほぼ同じであったからである。

第2に、細胞膜の研究者は、この30年くらい、「なぜ、細胞膜上での拡散係数がリポソーム膜中のそれに比べて

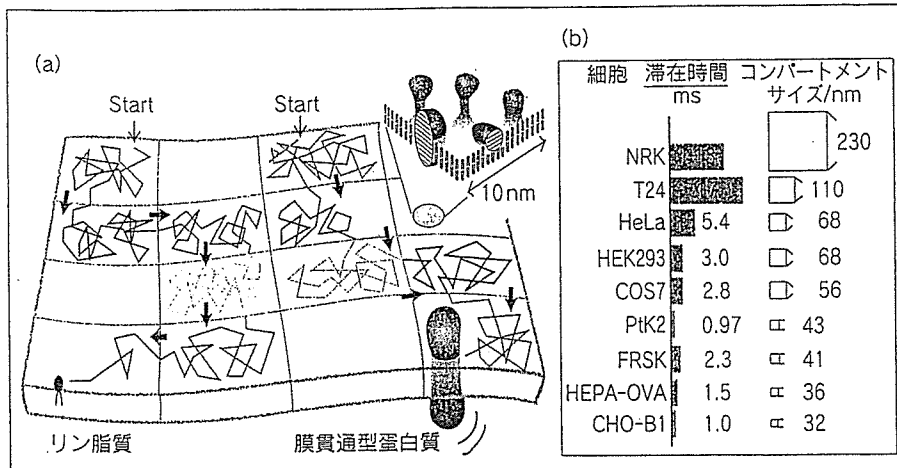


図4 シンガー-ニコルソンの流動モザイクモデルとホップ拡散

(a) 細胞膜は膜蛋白質およびリン脂質の拡散に対してコンパートメント化している。SingerとNicolsonの「流動モザイクモデル」<sup>12)</sup>は、コンパートメントよりも小さい、10 nm程度の微視的な環境において成り立っているといえる。

(b) これまでに調べた哺乳類細胞の細胞膜はすべてコンパートメント化していた。リン脂質の1分子観察によって調べたさまざまな細胞膜のコンパートメントサイズと平均滞在時間。

5～50倍も遅いのか」という難問に悩まされてきたが、上の結果は、その難問を基本的に解いてしまうものであった。すなわち、微視的な熱運動そのものはリボソームと変わらないが、細胞膜に仕切りが入っている（細胞膜がコンパートメント化されている）ため、隣のコンパートメントにホップするまでに時間がかかり、結果的に巨視的拡散が遅く見えていた、ということである。

なぜ、30年間もわからなかったことが、このように簡単にわかってしまったのであろうか？ これにも2つのポイントがある。第1に、「1分子追跡」である。2分子以上の運動の平均値をみると、ホップが起こっていることは平均操作の中で埋もれてしまう。第2に、「時間分解能を十分に上げたこと」である。ホップが11 msに一度起こるような条件では、33 ms分解能（ビデオレート）での観察は遅すぎる（コンパートメントを2～3回通過してしまう、一つのコンパートメント内にせめて50点くらいはほしいので、最低でも時間分解能0.2 msはほしい）。論より証拠。図3cにビデオレートで追跡したリン脂質の細胞膜上での拡散運動の典型的な軌跡を示しておく。あたかも遅い単純ブラウン運動をしているかのように見えるであろう。これでは、ホップ拡散に思い至らなかったもの無理はない。

これらの結果は、今までの細胞膜の構造と細胞膜中での分子運動の概念に大きな変革、パラダイムシフト、が必要であることを示している。すなわち、コンパートメントの仕切りに出合わないような10 nm程度までのスケールでは、今までのパラダイムであったSingerとNicolsonの流動モザイクモデル<sup>12)</sup>が成立するが（図4）、より広範囲で起こる現象を調べるときは、細胞膜のコンパートメントを考慮に入れる必要がある。ところで、

SingerとNicolsonの論文<sup>12)</sup>にある有名なマンガであるが、そのサイズがちょうど10 nm四方程度の大きさを示すように描いてあるのは、偶然とはいえ面白いことである。

#### IV. 膜蛋白質もホップ拡散している

話が前後するが、膜貫通型蛋白質がホップ拡散を行うことは、リン脂質のホップ拡散より以前に見い出されていた<sup>13-17)</sup>。図3dに軌跡の例を示した。ここではトランスフェリン受容体の例が示してあるが、 $\alpha_2$ -マクログロブリン受容体、バンド3、E-カドヘリン、CD44といったこれまでに観察したすべての膜蛋白質において、ホップ拡散が見い出された。

では、膜蛋白質やリン脂質に対する細胞膜上の仕切りはどのようにしてできるのだろうか？

まず、膜蛋白質について。膜骨格が細胞膜に接しており、膜蛋白質の細胞内ドメインは膜骨格にぶつかるため、膜骨格の網目に閉じ込められたようになることがわかってきた（膜骨格フェンスモデル、図5左）。非常に多くの実験を行ったが、いくつかをここに挙げる（さらに詳しくは、文献18を参照）。カドヘリンとバンド3の場合、蛋白質の細胞質部分を小さくすると隣の領域へホップする頻度が増える<sup>13,14)</sup>。また、本当に膜蛋白質が膜骨格にぶつかっているかを確かめるために、光ピンセットを用いて、膜骨格全体を地引網のように引っ張る操作を行ったところ、膜上で拡散している膜蛋白質も一緒に引きずられていき、移動した先でふたたび拡散運動を繰り返した<sup>13-15,17)</sup>。

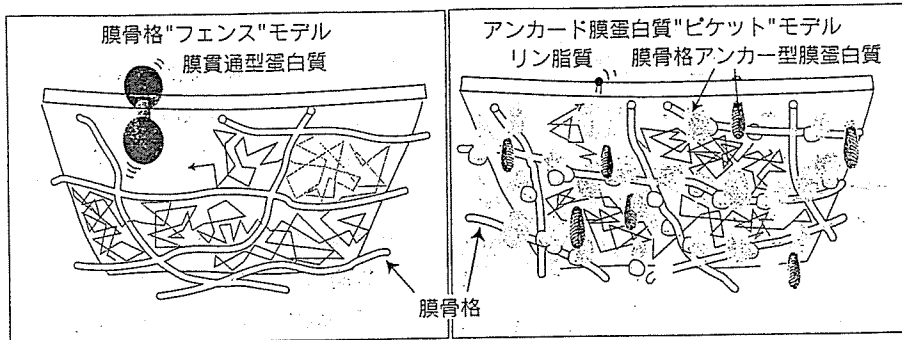


図5 膜骨格による膜分子の拡散抑制機構のモデル  
本文参照。

## V. 脂質の閉込め機構：アンカー膜蛋白質 ピケットモデル

では、脂質分子はどのようにコンパートメントに閉じ込められ、ホップ拡散するのか<sup>11,18,19</sup>? 細胞外マトリックスと膜蛋白質の細胞外領域をトリプシンによって除去しても、コレステロールを除去してラフト様ドメインを分散させても、リン脂質に対するコンパートメントの大きさとホップ頻度は変わらなかった。一方、アクチンフィラメントの重合や膜との相互作用を阻害する薬剤を用いて、細胞を非常にマイルドにしかも短時間処理すると、コンパートメントの平均サイズが大きくなり、逆にアクチンフィラメントを安定化する薬剤では、ホップ頻度が減少した。さらに、同じ細胞では、リン脂質と膜蛋白質を感じる仕切りは同様の大きさであった。これは膜骨格フェンスがリン脂質の拡散をも抑制していることを示唆する。これは、非常に驚くべき結果である。われわれが観察しているリン脂質は、細胞膜の二重層の外層にある（とくに金粒子プローブは細胞内にはいる可能性はほとんどない）。一方膜骨格は、細胞膜の細胞質側表面にあり、両者は直接には相互作用できない。

この矛盾を説明するため、筆者らは、“アンカー膜蛋白質ピケットモデル（図5右）”を提案している。これは、筆者らが1分子追跡したすべての膜蛋白質には、アクチン膜骨格に結合するためと考えられる運動しない成分、または、短時間運動が止まる成分があるという観察に基づいている。また、膜のように粘性の高い液体中（膜の粘性は水の約100倍程度）に動かない物体があると、それらは流体力学的な摩擦効果によって周囲（10 nm程度）の脂質や蛋白質の運動を大きく抑制することが知ら

れていた<sup>20-24</sup>。筆者らの作業仮説は次のようなものである。「アクチン膜骨格上では、多数のさまざまな種類の膜蛋白質が結合して（短期のものも含めて）運動を停止しており、それらの立体障害効果と周囲に対する摩擦効果、さらには、それらが10 nm以内の間隔で膜骨格上に配列することによって膜骨格上にピケットラインが形成され、脂質をも通しにくい拡散

抑制障壁となる。」膜骨格に結合した膜蛋白質が杭（ピケット）のように並んでいるので、“アンカー膜蛋白質ピケットモデル”とよんでいる。ポイントは、ピケットが少なくとも10  $\mu$ s（脂質がコンパートメント境界近くに滞在する時間）くらいは動かないこと、それらが膜骨格に沿って並んでいることである。このピケットラインは、脂質に対しても膜蛋白質に対してもはたらく。したがって、膜蛋白質には“膜骨格のフェンス”と“アンカー膜蛋白質のピケット”の両方の効果がはたらくことになる（両方とも、膜骨格と同じ場所に境界をつくる）。

ピケットの効果で脂質の運動を抑えるためには、膜骨格上にびっしりとピケット（アンカー膜蛋白質）が立ち並ぶ必要があると誤解されることがときどきある。しかし、その必要はない。上で述べたように、動かないピケットのまわりには、粘性の高い液体に対する摩擦効果のため、10 nm程度の動きにくい領域が生ずるからである。モンテカルロシミュレーションでは、コンパートメントの境界の15~30%程度がピケット蛋白質で覆われると、閉込め効果が生ずる。概算すると、これは、膜貫通型蛋白質全体の15%の分子が膜骨格に結合していることに匹敵し、以前から推定されていた値に近い<sup>22</sup>。さらに、繰返しになるが、これらのピケットは、長時間、膜骨格に結合しているのではないことに注意してほしい。1回の結合時間がたとえ100  $\mu$ sでも、脂質がその付近にいる時間より長いので、十分ピケットとして機能するのである。

## VI. 細胞膜の仕切りは一般的にみられる

これまで筆者らは、9種の哺乳動物の培養細胞を用いて、細胞膜中の脂質の運動を追跡し、すべての細胞で、脂質がホップ拡散することを見出した。ただし、コン

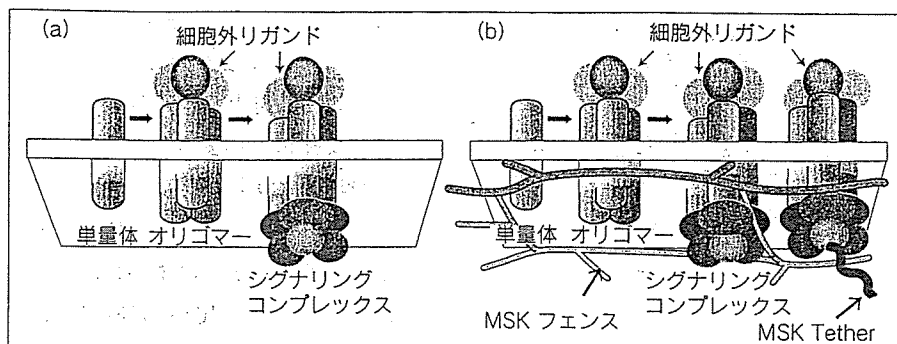


図6 Oligomerization-induced trapping model

膜分子が複合体を形成することによって、コンパートメントに囲い込まれる効果が増大することを示すモデル。細胞膜において膜分子複合体がコンパートメントの境界を乗り越える（ホップする）確率は、一つひとつの膜分子が同時に膜骨格のフェンスを乗り越えなくてはならないため、単独で膜に存在する場合のホップ確率に比べて大幅に小さくなる（b）。さらに、複合体は細胞内のシグナル伝達分子と結合し、それによって（一時的であっても）細胞骨格にアンカーされやすくなるため、拡散が抑えられる。膜骨格がない膜では（a）、膜分子の直径は拡散速度にそれほど影響しない<sup>12,24)</sup>ので、これらの効果はみられない。

コンパートメントの大きさと脂質のホップ頻度は細胞によってさまざまである（図4b）。このように、細胞膜に脂質の拡散をも抑えるような仕切りがあることは、細胞種によらず普遍的であるらしいことがわかってきた<sup>19)</sup>。

## VII. 細胞膜の仕切りの生理的意義

細胞間接着分子E-カドヘリンにGFPを結合した分子を1分子追跡することによって、GFP-カドヘリンの拡散運動が、会合度が進むにつれて大きく減少することが見いだされた<sup>25)</sup>。会合体の拡散係数が小さくなるのは当たり前だと読者は思われるかもしれないが、2次元拡散では、事情がまったく違っている。脂質二重層膜のような2次元の連続体中での拡散速度は、拡散する分子の大きさにあまり依存しない<sup>25)</sup>。たとえば、単量体が会合して1000量体をつくったとしても、拡散係数は1/6になるだけである。4量体になる程度では、変化を測定することさえも難しいであろう。

それでは、なぜ、GFP-カドヘリンが会合すると、細胞膜上での運動が劇的に減ったのであろうか？これは、ピケットとフェンスの効果であると考えられる。会合体がコンパートメントの境界を通り抜けるためには、膜と膜骨格の隙間、または、アクチンフィラメントが短期的に切れるとして、その隙間が単量体の場合に比べてはるかに大きくなくてはいけない。したがって、会合体が境界を通り抜ける頻度は大きく減少するのであろう。

このような、会合体形成によって、閉込め時間ははるかに長くなる現象を、oligomerization-induced trapping（オリゴマー化によって誘起されたトラッピング）と、筆者らは名づけた（図6）。

細胞外からやってきたシグナル分子が細胞表面の受容体に結合すると、受容体は会合したり、さらに、細胞質中のシグナル分子を結合して大きなシグナル複合体を形成することが多い。そうすると、これらの拡散係数は、シグナルを受容する前の受容体単量体に比べて劇的に減少し<sup>26-28)</sup>、シグナルを受け取ったコンパートメントの

周辺にトラップされることが予想される。これによって、シグナルを受け取った場所の情報がしばらくの間、保持される。このような空間情報の保持は、細胞骨格の極性をもった再編成や走化性を誘起するのに重要であろう。

第2の意義として、細胞が液体の細胞膜中にマクロスコピックな拡散障壁をつくるメカニズムがある。次項では、これを紹介する。

## VIII. 神経細胞の極性の維持

### 1. 神経細胞のイニシャルセグメント領域の細胞膜では脂質の拡散運動が止まる

神経細胞は、神経活動の入力を受ける樹状突起-細胞体領域と、出力担当の軸索という、2つのおもな領域からなる（図7）。また、この間には、イニシャルセグメント（IS）とよばれる境界領域が存在する。各領域には固有の膜分子が存在し（図7参照）、特異的な機能を担っている。これらの分子は、合成され細胞膜上に発現される際に選択的輸送機構により決められた領域に輸送される。しかし、細胞膜は一続きであり、しかも液体であるから、選択的に輸送された膜分子も、細胞膜上で拡散して混ざり合ってしまうように思える。

1992年に、Kobayashiらは入出力の境目にあたるISの細胞膜に、膜分子の拡散を妨げる拡散障壁が存在するという結果を示した<sup>29)</sup>。しかし、その後の追試や議論では結論が分かれてきた<sup>30-33)</sup>。とくに、液体の細胞膜

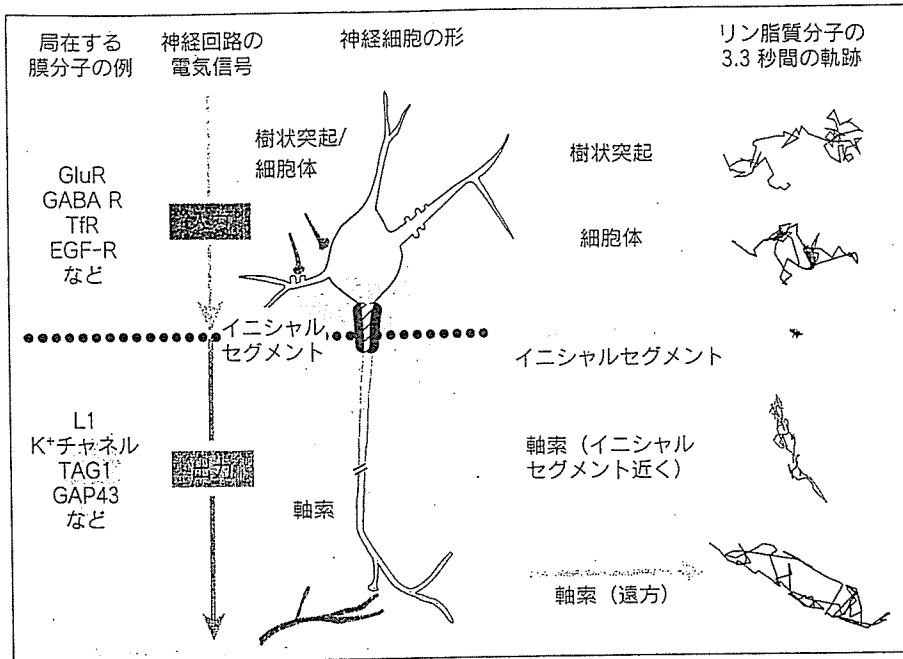


図7 神経細胞には機能極性がある

神経細胞の機能はイニシャルセグメントを境界として二分される。入力側・出力側のどちらかに局在すると報告されている膜分子の例を左に挙げた。右には培養海馬細胞の細胞膜上で観察したリン脂質の運動を軌跡として示した。イニシャルセグメントの膜上でリン脂質の運動がきわめて抑制されていることがわかる。

中でどのようにして脂質の拡散運動をも止めてしまうような拡散障壁がつけられうるのかが見当もつかなかったため、この問題の解明は進んでいなかった。筆者らは、これがアンカー膜蛋白質ピケットが極端になった場合として説明できるのではないかと考えた。すなわち、「膜蛋白質、膜骨格がIS領域に集積して結合し、非常に密なピケットラインが、10~30μmにわたるIS領域の細胞膜に形成される。このため、脂質を含む細胞膜分子は、非常に小さなコンパートメントに長時間閉じ込められ、IS領域を通過することはほとんど不可能になる」と考えた(図8)。

この仮説を検証するため、筆者らは、神経細胞の細胞膜において、リン脂質を1分子追跡した<sup>34)</sup>。生後すぐから10日間培養したラット海馬細胞の細胞膜中での、リン脂質の典型的な軌跡を図7に示す。樹状突起、細胞体、軸索の先のほうでは、リン脂質は速い拡散をしているのに対し、IS膜上ではほとんど拡散運動していない。さらに、リン脂質に結合させた金コロイドプローブを光ピンセットで捕捉して、細胞膜に沿って牽引しようとしたところ、ISではできなかった<sup>34)</sup>。これらの結果は、ISの細胞膜には拡散障壁が存在することを示している。

## 2. IS膜のマクロスコピックな拡散障壁の形成機構

次に、IS部から軸索の領域で膜骨格蛋白質の密度と脂質の運動との相関を調べた。図9からわかるように、膜骨格密度が高くなるほどリン脂質の拡散が大きく抑制された。また、アクチンフィラメントを脱重合させる薬剤で細胞を処理すると、ISにおける拡散抑制は解消された。

さらに、培養海馬細胞(出生後すぐ培養開始)の培養中での発生過程を追い、IS膜でのリン脂質の拡散係数と膜骨格蛋白質アンキリンG、および、膜貫通型蛋白質の電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネル(Nav1.2)のIS膜への集積との相関を調べた(図9c)。アンキリンGは、膜蛋白質である電位依存性

Na<sup>+</sup>チャンネルの細胞質部分に結合し、このチャンネルを膜骨格にアンカーすることが報告されている<sup>35)</sup>。若いニューロンではリン脂質は速い拡散をしていたが、培養後6日目ごろから拡散係数が低下し始め、10日目以降にはカバーガラスに吸着したプローブの見かけの拡散係数と同程度、つまりノイズの範囲まで拡散係数が低下した。すなわち、拡散障壁は生後すぐの神経細胞には存在せず、ニューロンの成熟に伴って生後10日目ころまでの間に形成されることがわかった。一方、Na<sup>+</sup>チャンネルとアンキリンGの密度は、培養後2~10日にかけて、10倍程度増加した(図9c)。しかし、これは、リン脂質の拡散係数低下とは、そこそこにしか相関していない。すなわち、これらの分子の集積が緩やかに終わりに達する時期に、脂質の拡散係数は劇的に下がっている。これは、ピケットとなる蛋白質や膜骨格蛋白質が集積し結合してピケットができてきても、そのときは、拡散に対する影響は小さく、集積が進んで、いよいよ本当にピケットが閉じ出してはじめて、拡散が劇的に抑えられることを示唆している。これは、モンテカルロシミュレーションによっても確認できた。以上の結果から、図8に示したような、膜骨格蛋白質およびピケットとなる膜蛋白質がIS



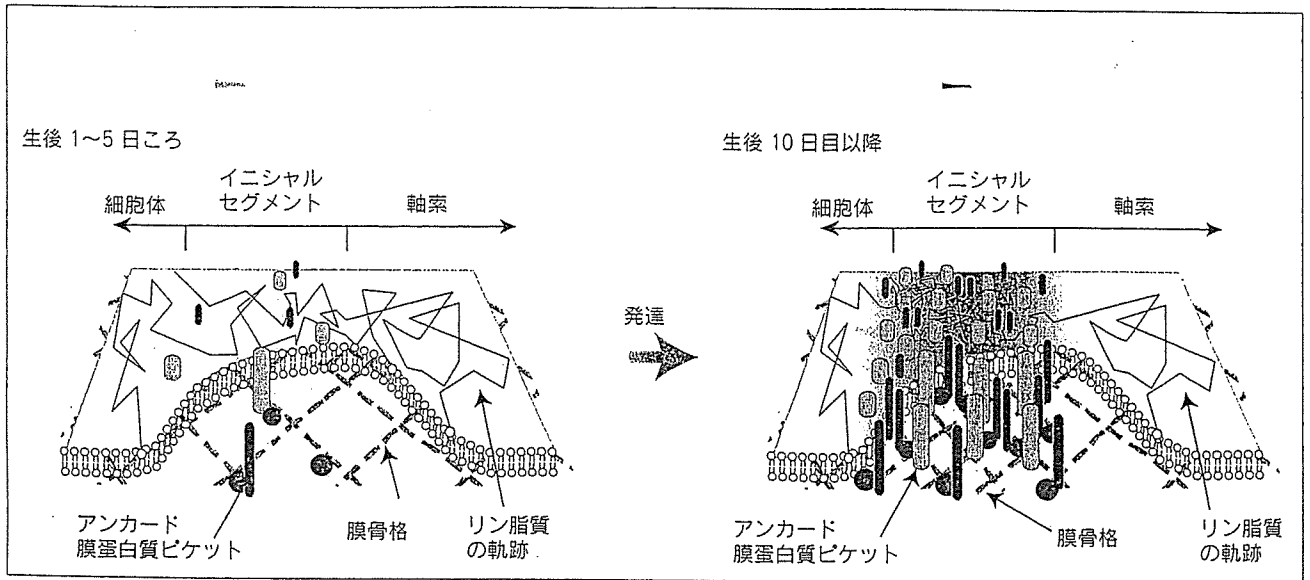


図8 拡散障壁ができる仕組み (作業仮説)

培養後間もない神経細胞のISには膜骨格や膜骨格に結合する膜蛋白質はまばらに存在しており、リン脂質の運動はそれほど制限されない。細胞の発達とともに膜骨格およびそれに結合する膜蛋白質が集積して高密度になるため、ピケット効果が大きくなり、リン脂質の拡散が大きく抑制される。このため、IS領域を通り抜けて拡散することがきわめてまれとなるので、ISの細胞膜はリン脂質の拡散に対して拡散障壁としてはたらく。

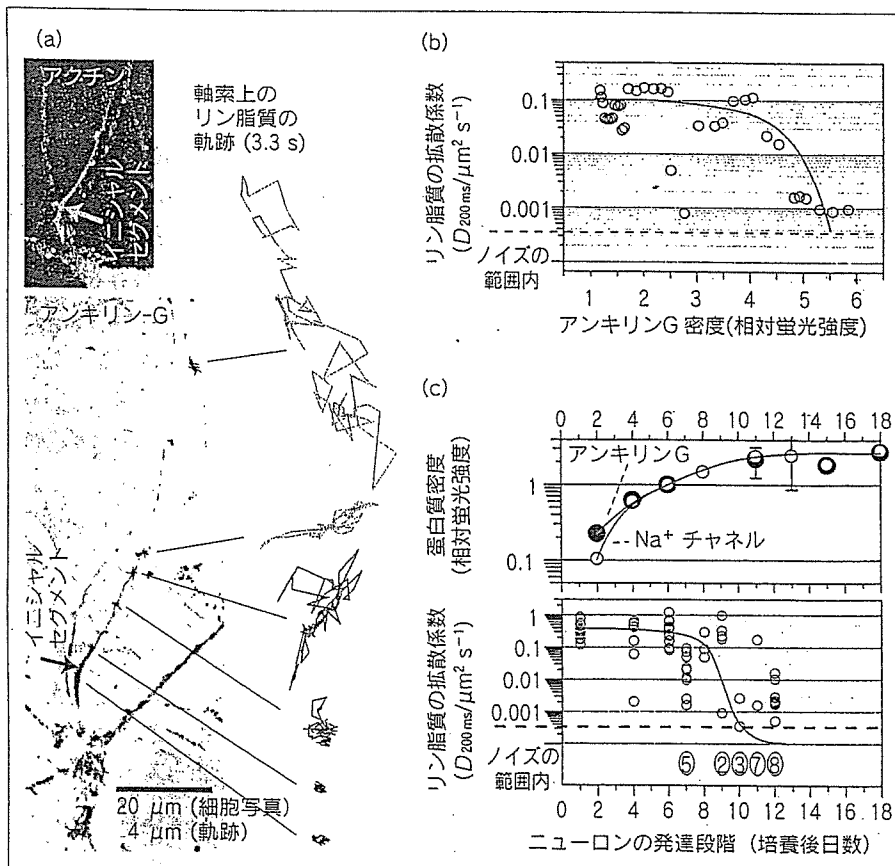


図9 拡散障壁は、膜骨格とピケット蛋白質の発達依存的な集積に伴って形成される

(a) ISにはアンキリン (写真赤) やアクチン (写真白) といった膜骨格が密に存在する。軸索上のさまざまな場所でのリン脂質の軌跡 (3.3秒間) をみると、イニシャルセグメントに近づくほど拡散が抑制される。

(b) IS付近で観察したリン脂質の拡散係数を、リン脂質が運動していた微小領域のアンキリンGの密度に対してプロットしたグラフ。アンキリン密度は、リン脂質の運動を観察した後、細胞を固定し、免疫蛍光抗体法により求めた。

(c) 培養後さまざまな日数を経過した細胞のISにおけるリン脂質の拡散係数(下)と、アンキリンGおよび電位依存性Na<sup>+</sup>チャネル (Nav1.2) のISにおける密度(上)の変化。拡散障壁は発達段階依存的に生成すること、かつ膜骨格および膜骨格結合型の膜蛋白質 (ピケット蛋白質) はニューロンの発達に伴い密度が増加することがわかる。図の下の丸付き数字は、ノイズレベルに落ちてしまう拡散係数が観測されたデータの個数を示す。

に集積することによって、拡散障壁が形成されるという機構が浮かび上がってきた。

イニシャルセグメント膜にはNav1.2以外にもNrCAM, neurofascinなど、多種の膜骨格結合型の膜蛋白質の局在が知られている<sup>36)</sup>。これらが、IS膜上のピケットラインを形成しているものと思われる。イニシャルセグメントに集積する電位依存性Na<sup>+</sup>チャネルは活動電位の発生のために必要であるが、同時にピケット効果も発揮して拡散障壁の形成にも役立っているようである。

細胞膜上にあるマクロスコピックな拡散障壁の存在は、神経細胞以外でも数種の細胞で示唆されてきた<sup>37,38)</sup>。しかし、境界を見る手法の制約から、あまり研究が進んでいない。今後の研究課題である。

#### おわりに

細胞は、膜骨格を用いて、細胞膜上の分子の拡散を制御する仕組みをもっている。これは、膜分子の会合状態の制御とともに、細胞膜分子の膜上での編制を制御するための、細胞の重要な手段の一つではないかと思われる。

このように膜骨格は、細胞が機能するために必要な細胞膜上でのいろいろなイベント(会合や信号伝達、極性維持など)を達成するうえで必須の構造である。すなわち、細胞膜がはたらく仕組みを理解するためには、“流動モザイクモデル”という従来の細胞膜の概念だけではまったく不十分であり、“膜骨格とそこに結合する膜蛋白質による仕切りが入った流動モザイク膜”という、大きなパラダイムシフトが必要である。

#### 文 献

- 1) Takeuchi, M., Miyamoto, H., Sako, Y., Komizu, H., Kusumi, A. : *Biophys. J.*, 74, 2171-2183(1998)
- 2) Liu, S. C., Derick, L. H., Palek, J. : *J. Cell Biol.*, 104, 527-536(1987)
- 3) Picart, C., Dalhaimer, P., Discher, D. E. : *Biophys. J.*, 79, 2987-3000(2000)
- 4) Shen, B. W., Josephs, R., Steck, T. L. : *J. Cell Biol.*, 102, 997-1006(1986)
- 5) Fowler, V. M. : *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8, 86-96(1996)
- 6) Grum, V. L., Li, D., MacDonald, R. I., Mondragon, A. : *Cell*, 98, 523-535(1999)
- 7) McGough, A. M., Josephs, R. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5208-5212(1990)
- 8) Otto, J. J. : *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6, 105-109(1994)
- 9) Pollard, T. D., Blanchoin, L., Mullins, R. D. : *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 29, 545-576(2000)
- 10) Stossel, T. P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J. H., Noegel, A. *et al.* : *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 138-145(2001)
- 11) Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K., Kusumi, A. : *J. Cell Biol.*, 157, 1071-1081(2002)
- 12) Singer, S. J., Nicolson, G. L. : *Science*, 175, 720-731(1972)
- 13) Tomishige, M., Sako, Y., Kusumi, A. : *J. Cell Biol.*, 142, 989-1000(1998)
- 14) Sako, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Takeichi, M., Kusumi, A. : *J. Cell Biol.*, 140, 1227-1240(1998)
- 15) Sako, Y., Kusumi, A. : *J. Cell Biol.*, 129, 1559-1574(1995)
- 16) Sako, Y., Kusumi, A. : *J. Cell Biol.*, 125, 1251-1264(1994)
- 17) Tomishige, M., Kusumi, A. : *Mol. Biol. Cell*, 10, 2475-2479(1999)
- 18) Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K. *et al.* : *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 34, 351-378(2005)
- 19) Murase, K., Fujiwara, T., Umemura, Y., Suzuki, K., Iino, R. *et al.* : *Biophys. J.*, 86, 4075-4093(2004)
- 20) Sperotto, M. M., Mouritsen, O. G. : *Biophys. J.*, 59, 261-270(1991)
- 21) Almeida, P. F., Vaz, W. L., Thompson, T. E. : *Biochemistry*, 31, 6739-6747(1992)
- 22) Bussell, S. J., Koch, D. L., Hammer, D. A. : *Biophys. J.*, 68, 1836-1849(1995)
- 23) Dodd, D. S., Hammer, D. A., Sangani, A. S., Koch, D. L. : *J. Fluid Mech.*, 293, 147-180(1995)
- 24) Saffman, P. G., Delbruck, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 3111-3113(1975)
- 25) Iino, R., Koyama, I., Kusumi, A. : *Biophys. J.*, 80, 2667-2677(2001)
- 26) Hegener, O., Prenner, L., Runkel, F., Baader, S. L., Kappler, J. *et al.* : *Biochemistry*, 43, 6190-6199(2004)
- 27) Nelson, S., Horvat, R. D., Malvey, J., Roess, D. A., Barisas, B. G. *et al.* : *Endocrinology*, 140, 950-957(1999)
- 28) Roess, D. A., Horvat, R. D., Munnely, H., Barisas, B. G. : *Endocrinology*, 141, 4518-4523(2000)
- 29) Kobayashi, T., Storrie, B., Simons, K., Dotti, C. G. : *Nature*, 359, 647-650(1992)
- 30) Futerman, A. H., Khanin, R., Segel, L. A. : *Nature*, 362, 119(1993)
- 31) Winckler, B., Poo, M. M. : *Nature*, 379, 213(1996)
- 32) Winckler, B., Forscher, P., Mellman, I. : *Nature*, 397, 698-701(1999)
- 33) Fukano, T., Hama, H., Miyawaki, A. : *J. Struct. Biol.*, 147, 12-18(2004)
- 34) Nakada, C., Ritchie, K., Oba, Y., Nakamura, M., Hotta, Y. *et al.* : *Nat. Cell Biol.*, 5, 626-632(2003)
- 35) Zhou, D., Lambert, S., Malen, P. L., Carpenter, S., Boland, L. M. *et al.* : *J. Cell Biol.*, 143, 1295-1304(1998)
- 36) Davis, J. Q., Lambert, S., Bennett, V. : *J. Cell Biol.*, 135, 1355-1367(1996)
- 37) Takizawa, P. A., DeRisi, J. L., Wilhelm, J. E., Vale, R. D. : *Science*, 290, 341-344(2000)
- 38) James, P. S., Hennessy, C., Berge, T., Jones, R. : *J. Cell Sci.*, 117, 6485-6495(2004)

Minireview

## Anti-inflammatory effects of kinins via microglia in the central nervous system

Mami Noda<sup>1,\*</sup>, Helmut Kettenmann<sup>2</sup> and Keiji Wada<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pathophysiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

<sup>2</sup>Max-Deibücker Center for Molecular Medicine, D-13092 Berlin, Germany

<sup>3</sup>Department of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo 187-8502, Japan

\*Corresponding author

e-mail: noda@phar.kyushu-u.ac.jp

### Abstract

Kinins are important biologically active peptides that are up-regulated after lesions in both the peripheral and central (CNS) nervous systems. Microglia are immune cells in the CNS and play an important role in the defense of the neuronal parenchyma. In cultured murine microglia, bradykinin (BK) induces mobilization of intracellular  $Ca^{2+}$ , microglial migration, and increases the release of nitric oxide and prostaglandin  $E_2$ . On the other hand, BK attenuates lipopolysaccharide-activated TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  release. These results suggest that BK functions as a signal in brain trauma and may have an anti-inflammatory role in the CNS.

**Keywords:** bradykinin; IL-1 $\beta$ ; lipopolysaccharide; nitric oxide; prostaglandin  $E_2$ ; TNF- $\alpha$ .

### Introduction: bradykinin as a signal in brain trauma

The nonapeptide, bradykinin (BK), is an endogenous peptide produced via the kallikrein-kinin system and is widespread in the brain (Scicli et al., 1984; Chao et al., 1987; Walker et al., 1995; Raidoo and Bhoola, 1998). BK functions as a mediator of inflammation and as a vaso-depressor in both the periphery and brain and is released during brain trauma such as stroke (Abbott, 2000). BK receptors are present on neurons (Walker et al., 1995; Delmas et al., 2002) and all types of glial cells, namely astrocytes and oligodendrocytes (Ritchie et al., 1987; Gimpl et al., 1992; Hosli et al., 1992; Lin and Chuang, 1992; Stephens et al., 1993a), satellite glial cells (Hanani, 2005), and microglial cells (Noda et al., 2003).

BK receptors are coupled to several intracellular signal transduction cascades (Hall, 1992; Walker et al., 1995; Noda et al., 2004a). One pathway is the mobilization of

intracellular  $Ca^{2+}$  induced by inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ) and consequent activation of  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channels in NG108-15 cells (Higashida and Brown, 1988; Kim and Kim, 1998; Frieden et al., 1999). BK has been reported to induce the activation of phospholipase  $A_2$  and stimulate arachidonic acid release (Welsh et al., 1988; Yanaga et al., 1991). BK receptors also activate  $G_{i/o}$  protein (Liebmann et al., 1990; Liebmann, 2001). In astrocytes and oligodendrocytes, BK caused the release of arachidonic acid (Burch and Kniss, 1988; Kaeser et al., 1988),  $Ca^{2+}$ -dependent glutamate release (Papura et al., 1994) and IL-6 expression (Schwaninger et al., 1999).

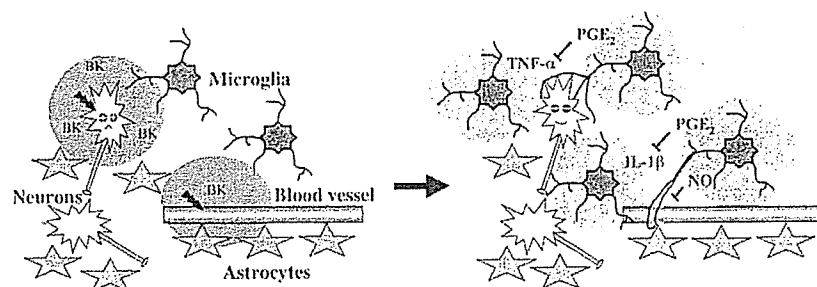
### Microglia as a sensor of brain pathology

Following any type of brain injury, such as lesion, stroke, neurodegenerative disorders and tumor invasion, microglia are rapidly activated. Microglia are the main immune effector-cell population of the central nervous system (CNS) and control immune cell recruitment (Perry et al., 1993; Kreutzberg, 1996; Kim and de Vellis, 2005). Activated microglia migrate rapidly to the lesion site, phagocytose dead cells and clear cellular debris. As recently shown by Nimmerjahn et al. (2005) and Davalos et al. (2005), even resting microglial cells scan their environment with their processes in the intact brain.

One important question relates to the signals that initiate and promote microglial activation. Davalos et al. (2005) recently reported that adenosine trisphosphate (ATP) is an early signal controlling rapid extension of the processes towards a lesion site. Additional and subsequent signals may promote the progression and regulation of microglial activation. BK is also a candidate for such a control element.

### BK induces a transient intracellular $Ca^{2+}$ increase in microglia

In astrocytes and oligodendrocytes, BK increases phosphoinositide turnover and raises intracellular  $Ca^{2+}$  concentrations (Ritchie et al., 1987; Gimpl et al., 1992; Lin and Chuang, 1992; Stephens et al., 1993b; Bernstein et al., 1996; He et al., 1996; Simpson et al., 1997). In murine primary cultured microglia, BK receptors are also expressed and linked to  $IP_3$  signaling, causing an intracellular  $Ca^{2+}$  rise and, as a consequence, activation of  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channels (Noda et al., 2003, 2004b). Only a subpopulation of 20% responded to BK, as assessed both by membrane current measurements using the patch-clamp technique and by  $Ca^{2+}$ -imaging.



**Figure 1** Proposed actions of bradykinin (BK) on microglia.

Left: in response to a pathologic event, neuropeptides, including bradykinin (BK), are released. Right: microglial cells are attracted to the lesion or inflammatory site. In response to BK, microglia release prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) and nitric oxide (NO). The release of inflammatory cytokines such as  $TNF-\alpha$  and  $IL-1\beta$  from microglia is down-regulated by BK-induced  $PGE_2$  as a potential neuroprotective mechanism. The impact of BK-induced microglial NO release is less evident, since it could both affect neurons and the vascular system (right).

As a reference, ATP was applied, which evoked an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  in all cells. The BK response was significantly smaller than the response to ATP. These results suggest that a minor population of cultured microglial cells express functional BK receptors.

### BK increases microglial motility and induces a chemotactic response

ATP receptor activation not only stimulates the movement of processes in resting microglia, but is also a chemotactic factor for amoeboid (cultured) microglial cells, which involves migration of the entire cell (Honda et al., 2001). Using time-lapse video microscopy, we have observed that BK also increased microglial motility, and that this was significantly blocked by an inhibitor of  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channels, charybdotoxin (Ifuku et al., 2005).  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channels in microglia are also important for lysophosphatidic acid (LPA)-induced migration (Schilling et al., 2004; Eder, 2005). While the BK-induced  $Ca^{2+}$  and current response rapidly desensitized, BK induced an increase in microglial motility over many hours. Since BK did not induce the increase in microglial motility in  $Ca^{2+}$ -free extracellular solution, we assume that the  $Ca^{2+}$  entry is an initial event followed by subsequent responses. As observed in thymus-derived lymphocytes (T-cells), depletion of internal  $Ca^{2+}$  stores induced by generation of  $IP_3$  may activate voltage-independent  $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  (CRAC) channels, and chronic  $Ca^{2+}$  influx sustains elevated levels of cytosolic  $Ca^{2+}$  (Fanger et al., 2001; Chandy et al., 2004).

Although ATP increased microglial motility over a similar time course as BK, ATP-induced migration was not dependent on  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channels. As reported by Honda et al. (2001), ATP-induced migration was inhibited by treatment of microglial cells with pertussis toxin (PTX), suggesting that activation of  $G_{i/o}$  protein induced by P2Y receptor was important. BK receptors have also been reported to couple to  $G_{i/o}$  protein (Liebmann et al., 1990; Liebmann, 2001). Nevertheless, the BK-induced increase in motility was not inhibited by PTX (Ifuku et al., 2005), suggesting that BK receptors in microglia may not couple to the same  $G_{i/o}$  protein, which can be activated by P2Y receptors. This indicates that ATP and BK control

migration via different mechanisms, one involving activation of  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channels via  $G_{q/11}$  signaling, and the other via  $G_{i/o}$  signaling.

### The motility response is mediated by $B_1$ receptors

BK activates two types of receptors,  $B_1$  and  $B_2$ . The  $B_2$  receptor is constitutively expressed in various mammalian tissues, while the  $B_1$  receptor is expressed at very low levels under normal conditions, but is up-regulated by treatment with lipopolysaccharide (LPS) or cytokines such as interleukin- $1\beta$  ( $IL-1\beta$ ). Using specific ligands, we demonstrated that the BK-induced increase in microglial motility resulted from activation of  $B_1$  receptors, but not  $B_2$  receptors (Ifuku et al., 2005). This is substantiated by the finding that mRNA for the  $B_1$  receptor was up-regulated by application of BK in rat primary cultured microglia when assessed by quantitative RT-PCR analysis (Noda et al., 2003).

### BK-induced release of nitric oxide and prostaglandin $E_2$ from microglia

Substances involved in the process of microglial activation also control the release of various substances from microglia, including cytokines, nitric oxide (NO) and prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ). Indeed, BK triggered the release of NO and  $PGE_2$ , but not pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  ( $TNF-\alpha$ ) and  $IL-1\beta$ , and reactive oxygen species, despite the fact that BK is considered to be a mediator of pain and inflammation. In contrast, the release of  $TNF-\alpha$  and  $IL-1\beta$  induced by LPS was attenuated by BK (300–1000 nM). The attenuation of LPS-induced  $TNF-\alpha$  and  $IL-1\beta$  release was likely due to the formation of  $PGE_2$ . We assume that  $PGE_2$  acts as an autocrine factor, activating prostanoid receptors in microglia. Indeed, microglial cells express predominantly  $EP_2$  and  $EP_4$  receptors, which are coupled to  $G_s$  protein activation, leading to an increase in intracellular cAMP. The expression levels of the  $EP_2$  and  $EP_4$  receptors, as well as BK receptors (Noda et al., 2003), were up-regulated by application of BK or LPS to microglial cells. The up-