

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏 名 細田 能希

学位論文名 神経系におけるプロサポシンの局在と mRNA 発現部位

学位論文の要約

【緒言】

プロサポシン(PS)は4種類のスフィンゴ脂質活性化蛋白(サポシンA,B,C,D)をドメインとして含む524個のアミノ酸残基からなる蛋白質である。サポシンは肝臓、脾臓に豊富に存在しているのに対して、PSは脳、筋肉、脳脊髄液などに豊富に存在している。PSはライソゾームへと運搬されサポシン群まで分解されるが、一部の細胞では分解されず細胞外へ放出される。PSは中枢神経系の正常な発育に不可欠であり、特に脳では発生期に豊富に出現し、脳脊髄液等の細胞外液にも豊富に存在するため、神経細胞の分化・保護・生存に関わる神経栄養因子であると考えられている。我々は、既に虚血性神経細胞死モデルにおいてPSの神経保護作用を確認し、免疫組織化学染色により神経細胞にPSが特異的にみられることを明らかにした。さらにラット顔面神経切断後に顔面神経細胞のPSとそのmRNAが増加することも報告した。またPSノックアウトマウスでは中枢および末梢でのミエリン形成が抑制されている。ヒトでPSが欠損した場合、スフィンゴ脂質活性化能低下、及び神経栄養因子活性低下による異常が現れることが想定され、Gaucher病との関連が注目されている。以前、我々のグループは、サポシンC抗体を用いて中枢神経内でのPSの分布を報告した。本研究では、神経系におけるPSの細胞内局在を免疫電顕法により、PSmRNAの局在を*in situ* hybridizationによりそれぞれ同定し、発現細胞およびその発現様式の解析を行った。

【実験方法】

8週齢雄ウイスターラットの神経組織をホモジナイズし60℃で10分間加熱、遠心し上清をSDS-PAGEにかけ抗サポシンD抗体でウエスタンブロットを行った。免疫染色ではラットを4%パラフォルムアルデヒドで還流固定し、大脳、三叉神経節、後根神経節を採取しパラフィン切片を作成し、抗サポシンD抗血清を用いた。免疫電子顕微鏡用の試料は還流固定後、三叉神経節、後根神経節、交感神経節、ラセン神経節等を採取し、10%、20%、30%のグリセリン溶液に2時間浸漬させた後、冷却無水アルコールで急速凍結した。その後-80℃冷却5%酢酸ウランにより凍結置換し、LR whiteにて重合させた。チタン製メッシュ上の超薄切片の片側を抗サポシンD抗体、15nm金コロイドで標識した。洗浄、乾燥の後に切片の他側を抗カテプシンD抗体と5nm金コロイド

で標識した。 *In situ* hybridization は定法に従い、凍結切片に希釈した各プローブを 200 μ l/slide 滴下し、42 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。暗箱に入れ 4 $^{\circ}$ C で3週間感光させ現像し、顕微鏡で検鏡した。

【結果】

後根神経節、三叉神経節のウエスタンブロットでは約 66 kDa の単一バンドが見られ PS と考えられた。蝸牛組織では約 39 kDa の弱いバンドも見られた。免疫電顕での二重染色ではほとんど全ての PS 陽性反応はライソゾームマーカーであるカテプシン D 陽性反応と同じ細胞内小器官に存在した。逆にカテプシン D 陽性反応は必ずしも PS と共存しなかった。大脳皮質の免疫反応は、光学顕微鏡ではライソゾーム様構造として認められた。電子顕微鏡では比較的境界明瞭な 200-500nm 程度のライソゾーム内と共に、小型のライソゾームにも PS 反応が認められた。大型ライソゾーム内の PS 反応は不均一で電子密度の高い部分に密集し、低電子密度部分にはほとんど認められなかった。三叉神経節、後根神経節、交感神経節において神経細胞体にハイブリダイゼーションシグナルが認められた。空腸では筋間神経叢に弱いシグナルが認められた。

【考察】

抗サポシン C 及び D 抗血清を用いた脳、後根神経節、三叉神経節のウエスタンブロットでは約 66 kDa の場所に単一の PS と思われるバンドが見られた。このことから、神経系ではサポシンはほとんど含まれず、PS の形で存在すると考えられ、本研究での免疫反応はほぼ PS の反応といえる。さらに免疫電顕所見では PS がライソゾーム内に未分解で存在していると考えられ、興味深い現象であり、神経細胞中のライソゾーム内では PS の分解が進まない何らかの機構が有ると考えざるを得ない。血小板では PS がライソゾーム酵素とともに分泌されることが報告されており、神経系においても自己分泌の可能性も高い。PS は神経細胞におけるアポトーシス抑制効果を有する。本研究でも、PS mRNA は主に神経細胞に認められたため、PS は軸索伸長やミエリン形成の促進に加えて、自己分泌機構により神経細胞自身のアポトーシスを防いでいるのではないかと考えられる。本研究結果は、PS が中枢神経系のみならず末梢神経細胞でも産生されることを示した。なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済である。

主論文

Yoshiki Hosoda · Kyoji Miyawaki · Shouichiro Saito · Jie Chen · Xue Bing · Takehiro Tera shita · Naoto Kobayashi · Nobukazu Araki · Tetsuya Shimokawa · Fumihiko Hamada · Akira Sano · Hirotaka Tanabe · Seiji Matsuda : Distribution of prosaposin in the rat nervous system. Cell and Tissue Research, 330, 197-207, 2007