

グリアによる神経軸索上機能分子の発現および局在化調節機構の解明

馬場広子

東京薬科大学・薬学部・機能形態学

有髄神経軸索の興奮伝導は、絞輪およびその周囲への電位依存性イオンチャネルの集積が重要である。本研究では、1) paranodal axo-glia junction (PJ) の形成・維持に関連する分子と神経軸索調節、2) 軸索-グリア間相互作用関連分子のプロテオミクス解析を行い次のことを明らかにした。

1) PJの形成・維持に関連する分子と神経軸索調節

髄鞘主要糖脂質であるスルファチドを欠損したマウスでは、中枢神経系 (CNS) ,末梢神経系 (PNS) 共にパラノード部分での軸索と髄鞘間の結合であるPJのみが欠損し、コンパクトミエリンは保たれているにもかかわらず伝導速度が低下する。このマウスのCNSの解析から、軸索絞輪およびjuxta-paranodeへのNa⁺チャネルおよびK⁺チャネルの局在維持にはスルファチドによるPJ形成が重要であることを示した。また、絞輪のNa⁺チャネルは発達段階でNav1.2からNav1.6に変換し、これが絞輪機能に影響するが、PJ形成自体がCNSではこのサブタイプ変換が不十分であることを明らかにした。また、脊髄白質では絞輪Na⁺チャネルの変化に一致して

Hsp27および1-Cys peroxiredoxinの著明な発現増加およびアストロサイトの活性化を認め、髄鞘とアストロサイト間のGap Jの変化が見られた。マイクロアレイ解析から、種々のサイトカインの増加と共に、細胞内におけるPI3キナーゼの上昇およびCa²⁺関連シグナル伝達系および細胞外マトリクスの構成成分の変化がみられ、これらの軸索機能変化への関与が示唆された。一方、PNSでは約半数のPJは形成されていないにも関わらず、Na⁺チャネルの絞輪集積は保たれ、CNSで見られるようなサブタイプ異常はみられなかった。電顕による詳細な解析を行った結果、絞輪周囲を覆うシュワン細胞微絨毛のPNSのチャネル局在化への関与が示された。さらに、このマウスでは、著明にSchmidt-Lanterman切痕 (SLI) が増加することがわかった。SLIに接する軸索面にはK⁺チャネルが集積し、SLIはGap結合があることから、パラノードと共にK⁺の排除に関わると考えられている。この形成にスルファチドが関与することが明らかになった。興味深いことに、PJ欠損マウスのPNS絞輪の電顕観察によって、絞輪部分のミトコンドリアが巨大化していることがわかった。これらのミトコンドリアは、Complex IからVなどミトコンドリアの電

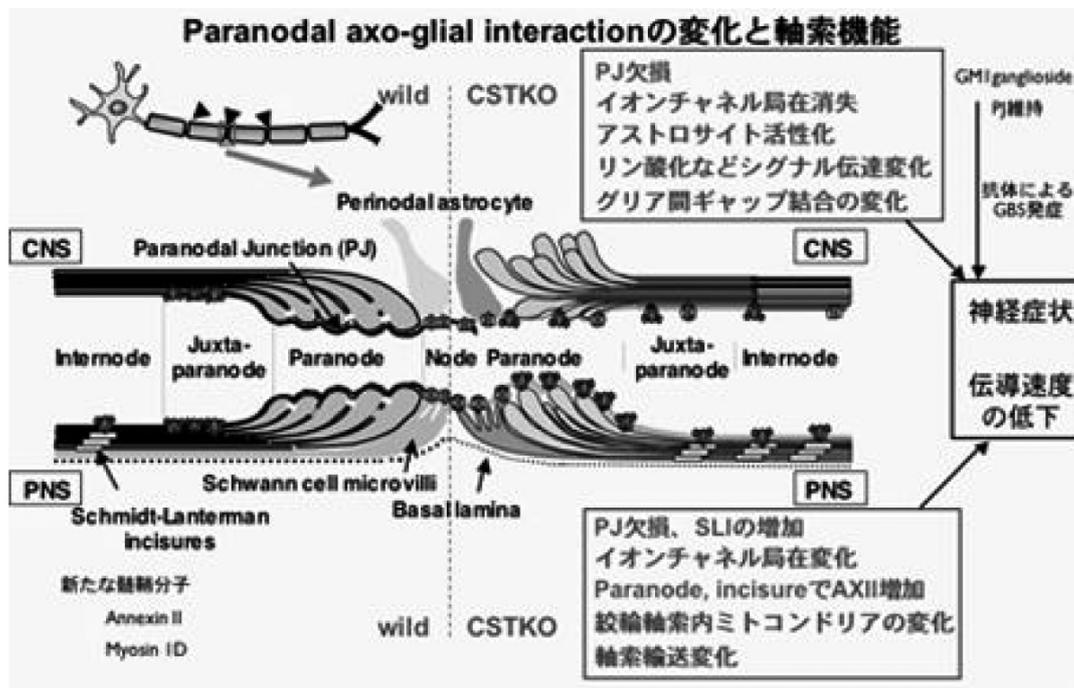


図 グリアと軸索間インタラクションによる軸索機能調節

有髄神経軸索は、その周囲のグリアとの相互作用によって機能維持がなされている。特に、パラノードにおける髄鞘-軸索間結合が消失すると、軸索ではイオンチャネル局在変化のみでなくチャネルサブタイプの変化やミトコンドリア巨大化、軸索輸送の変化を生じる。

子伝達系に関与する分子は存在することから変性過程ではなく機能していると考えられた。また、軸索輸送関連タンパク質の変化を認めたことから、髄鞘-軸索間の結合異常が軸索表面の機能タンパク質のみでなく、軸索内部の大きな変化を引き起こすことが明らかになった。軸索輸送変化とスルファチドとの関連性およびミトコンドリア巨大化について現在引き続き検討中である。このように重要な役割を果たすPJであるが、さらにGM1およびGD1a欠損マウスの解析から、これらの ganglioside がPJ維持に重要であることを示し、ヒトの軸索型ギラン・バレー症候群の発症に関与する抗GM1抗体の病態への関与の一端を明らかにした。

以上のことから、パラノードはPJ形成による電氣的シールドおよび膜タンパク質の側方拡散を防ぎ、さらに軸索輸送の維持に重要な役割を持つ。我々は、この髄鞘パラノードおよびSLI部分にCa²⁺依存性リン脂質結合蛋白質であるAnnexin II (AXII)が集積することを明らかにした。正常では髄鞘の各層間を結ぶオートジャンクションに局在し、PJ欠損など髄鞘異常に伴って発現が上昇することがわかった。坐骨神経内にリゾレシチンを投与した脱髄モデルマウスでは、脱髄周囲の残った髄鞘で著明にAXIIの発現が増加する。siRNA投与でAXIIの発現を抑えると脱髄部位は著明に縮小し、AXIIの脱髄保護作用を明らかにした。

2) 軸索-グリア間相互作用関連分子のプロテオミクス解析

髄鞘および軸索・髄鞘相互作用の異常を解析するには、タンパク質変化のプロテオミクス解析が用いられる。しかし、通常の固定化等電点電気泳動 (IPG) を用いた2次元電気泳動法 (2DE) では、髄鞘に多い膜タンパク質や塩基性タンパク質、高分子量のタンパク質の解析は困難であることが多い。そこで、多回貫通型膜タンパク質などに有効であると注目される陽イオン界面活性剤 (16-BAC) を用いた2DEを髄鞘解析用に改良し、さらに16-BACよりも膜タンパク質の可溶性に優れたC-TABによる2DEを開発した。スポットの質量分析を行った結果、Na⁺-K⁺ ATPaseのような多回膜貫通型タンパク質や髄鞘関連タンパク質の他に、ミオシン1Dが髄鞘画分に濃縮されていることがわかった。ミオシン1Dは従来の筋型ミオシンと異なり、unconventional myosinに分類され、膜輸送や再利用の過程などで働くと考えられている。脳での発現は髄鞘形成に伴って増加し、小脳では白質部分の軸索に沿って局在した。さらに、培養系ではある程度成熟したオリゴデンドロサイトに存在することがわかった。オ

リゴデンドロサイトは、髄鞘形成に伴い大量の膜脂質および髄鞘タンパク質分子を髄鞘に輸送する。ミオシン1Dの髄鞘形成や維持における機能に関して現在引き続き検討中である。

【文献】

- 1) [Ishibashi T](#), Dupree JL, Ikenaka K, Hirahara Y, Honke K, Peles E, Popko B, Suzuki K, Nishino H, [Baba H](#). A myelin galactolipid, sulfatide, is essential for maintenance of ion channels on myelinated axon but not essential for initial cluster formation. *J. Neurosci.* 22: 6507-6514 (2002)
- 2) [Ishibashi T](#), Ikenaka K, Shimizu T, Kagawa T, [Baba H](#). Initiation of Sodium Channel Clustering at the Node of Ranvier in the Mouse Optic Nerve. *Neurochem. Res.* 28 (1): 117-125 (2003)
- 3) [Ishibashi T](#), Ding L, Ikenaka K, Inoue Y, Miyado K, Mekada E, [Baba H](#). Tetraspanin Protein CD9 is a Novel Paranodal Component Regulating Paranodal Junctional Formation. *J. Neurosci.* 24: 96-102 (2004)
- 4) Suzuki A, Hoshi T, Ishibashi I, [Hayashi A](#), [Yamaguchi Y](#), [Baba H](#). Paranodal Axoglial Junction is Required for the Maintenance of the Nav1.6-type Sodium Channel in the Node of Ranvier in the Optic Nerves but not in Peripheral Nerve fibers in the Sulfatide-deficient Mice. *Glia* 46: 274-83 (2004)
- 5) Kumada T, Hasegawa A, Iwasaki Y, [Baba H](#), Ikenaka K. Isolation of Cystatin C via Functional Cloning of Astrocyte Differentiation Factors. *Dev. Neurosci.* 26: 68-76 (2004)
- 6) Hoshi T, Suzuki A, Hayashi S, Tohyama K, [Hayashi A](#), [Yamaguchi Y](#), Takeuchi K, [Baba H](#). Nodal protrusions, increased Schmidt-Lanterman incisures, and paranodal disorganization are characteristic features of sulfatide-deficient peripheral nerves. *Glia* 55: 584-594 (2007)
- 7) Suzuki A, [Yamaguchi Y](#), Hoshi T, [Hayashi A](#), [Baba H](#). Differential Inductions of Small Heat Shock Protein 27 and 1-Cys Peroxiredoxin in Reactive Astrocytes in Sulfatide-Deficient Mouse Spinal Cord. *J. Neurosci. Res.* 85: 1921-1932 (2007)
- 8) [Hayashi A](#), Nakashima N, Yamagishi K, Hoshi T, Suzuki A, [Baba H](#). Localization of Annexin II in the Paranodal Regions and Schmidt-Lanterman Incisures in the Peripheral Nervous System. *Glia* 55: 1044-1052 (2007)
- 9) Susuki K, Rasband MN, Tohyama K, Koibuchi K, Okamoto S, Funakoshi K, Hirata K, [Baba H](#), Yuki N. Anti-GM1 Antibodies Cause Complement-Mediated Disruption of Sodium Channel Clusters in Peripheral Motor Nerve Fibers. *J. Neurosci.* 27: 3956-3967 (2007)
- 10) Susuki K, [Baba H](#), Tohyama K, Kanai K, Kuwabara S, Hirata K, Furukawa K, Furukawa K, Rasband MN, Yuki N. Gangliosides Contribute to Stability of Paranodal Junctions and Ion Channel Clusters in Myelinated Nerve Fibers. *Glia* 55: 746-757 (2007)
- 11) [Yamaguchi Y](#), Miyagi Y, [Baba H](#). Two-Dimensional Electrophoresis with Cationic Detergents: A Powerful Tool for the Proteomic Analysis of Myelin Proteins. Part 1: Technical Aspects of Electrophoresis. *J. Neurosci. Res.* 86: 755-765 (2008)
- 12) [Yamaguchi Y](#), Miyagi M, [Baba H](#). Two-Dimensional Electrophoresis with Cationic Detergents: A Powerful Tool for the Proteomic Analysis of Myelin Proteins. Part 2: Analytical Aspects. *J. Neurosci. Res.* 86: 766-775 (2008)