

論文要旨

Contactin-associated protein (Caspr) 2 interacts with carboxypeptidase E in the central nervous system

〔 中枢神経系におけるコンタクチン関連蛋白質 (Caspr) 2 と Carboxypeptidase E との相互作用 〕

大磯 茂

【序論および目的】

中枢神経系における神経の発達や神経ネットワークの形成には、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する分子をはじめとする多くの接着分子が関与している。コンタクチンは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-アンカー型の神経接着分子で、ミエリンのパラノード接着構造の形成と維持において非常に重要な役割を果たしている。哺乳動物におけるコンタクチンサブグループには6つの分子 (コンタクチン, TAG-1, NB-2, NB-3, BIG-1, BIG-2) の存在が知られており、これらの分子群は神経系構築の様々な局面で機能していることが示唆されている。一方、ミエリンのパラノード部位においてコンタクチンとシス型に相互作用する分子として、膜貫通型タンパクであるコンタクチン関連蛋白質 (contactin associated protein : Caspr) 1 が知られている。Caspr ファミリーには、ホモロジーの高い5つの分子 (Caspr1, Caspr2, Caspr3, Caspr4, Caspr5) が存在し、このうち Caspr1 は膜上においてコンタクチン, neurofascin 155 と複合体を形成しパラノード部位の接着に関係していること、また Caspr2 はジャクスタパラノード部位の膜上において TAG-1 と相互作用し、跳躍伝導に重要な K^+ チャンネルの局在化に関係していることが示されている。

Caspr2 に関しては、臨床的な疾患との関わりについても報告がある。Gilles de la Tourette 症候群は運動性チックや音声チックを主症状とする神経精神疾患であるが、染色体の転座による Caspr2 の発現欠損が関連しているという報告がある。また、皮質異形成焦点性てんかんを患ったアーミッシュにおいて、脳に発現している Caspr2 の細胞内部分欠損による変異と K^+ チャンネルの海馬への異常集積の関与が報告されている。この報告は Caspr2 の細胞内部分が K^+ チャンネルの正常な分布に重要であることを示唆するものであるが、Caspr2/ K^+ チャンネルのジャクスタパラノードへの局在化に関する分子機構の詳細については明らかにされていない。その分子間相互作用の詳細な機構の解明を最終目的に、酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングを行い、Caspr2 の膜への細胞内輸送に関わる細胞内相互作用分子の候補の一つとして carboxypeptidase E (CPE) を同定し、Caspr2 との相互作用について検討を行ったので報告する。

【方法】

- 1) 酵母 two-hybrid スクリーニング : MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 を用いた。Bait には pGBKT7 に Caspr2 細胞内部分を組み込んだ遺伝子 (pGBKT7-hCaspr2ICD) を用いた。
- 2) GST-pull down アッセイ : GST 融合 Caspr2 細胞内部分 (GST-Caspr2ICD) と CPE を強制発現させた細胞のライセートを用いた GST-pull down アッセイにより、Caspr2 と CPE の相互作用を調べた。

- 3) 免疫沈降：ラットの大脳から作成したライセートと Caspr2 に対する特異的抗体を用いた免疫沈降法により, Caspr2 と CPE の相互作用を調べた。
- 4) 組織および脳部位内分布：ラットの各組織および各脳部位における Caspr2 および CPE の発現をウエスタンブロット法により検出した。
- 5) 免疫組織化学染色：ラットの大脳から作成した脳切片に Caspr2, CPE 及び K^+ チャネルの抗体を使用させ, peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法により特異的染色像を検出した。
- 6) Subcellular fraction 分布：ラット大脳皮質から作成した, ミエリン, Golgi/ER, シナプトゾーム, ミトコンドリア, 膜, 可溶性画分における Caspr2 及び CPE 発現をウエスタンブロット法により検出した。
- 7) Caspr2 及び CPE の cDNAs を導入した COS-7 細胞における各分子の分布：COS-7 細胞に Caspr2 及び CPE を単独あるいは共発現させ, 特異的抗体を用いた蛍光染色法により細胞内分布を検出した。

【結果】

- 1) 酵母 two-hybrid 法を用いた Caspr2 細胞内部分結合蛋白質の検索により, 78 個の陽性クローンが得られ, そのうち, 12 個は CPE の C 末端側をコードするクローンであった。
- 2) GST-pull down アッセイ及び免疫沈降法を用いた検討により, Caspr2 と CPE は直接的に結合することが示された。
- 3) Caspr2 及び CPE は, 両分子とも中枢神経系に優位に発現がみられた。さらに両分子とも脳の各部位に広範にわたって分布していた。
- 4) ラット脳において Caspr2, CPE, K^+ チャネルは, いずれも大脳皮質の錐体細胞及び樹状突起 (apical dendrite) に染色像が確認された。また視神経のミエリン部位においては, Caspr2 の染色像は確認されたが, CPE は検出されなかった。さらに, CPE と K^+ チャネルの相互作用を免疫沈降法にて検討したが, 直接的な結合は検出されなかった。
- 5) ミエリン, Golgi/ER, シナプトゾーム, ミトコンドリア, 膜画分, 可溶性画分において, Caspr2 及び CPE の両分子は Golgi/ER に共局在することが示された。
- 6) COS-7 細胞に Caspr2 及び CPE の cDNAs を単独導入した細胞では各々 Golgi/ER への局在が観察されたが, 両分子を共発現させた細胞では Caspr2 の一部が細胞膜へ局在することが認められた。

【考察及び結論】

Caspr2 の細胞内部分と相互作用する蛋白質の検索により得られた候補クローンから CPE について Caspr2 との相互作用の検討を行ったところ, GST-pulldown 及び免疫沈降により Caspr2 と CPE 両分子の直接的な結合が認められ, 生体内における相互作用が明らかとなった。また, 両分子は共に Golgi/ER 画分に局在し, 両分子を強制発現させた COS-7 細胞において Caspr2 の膜への輸送に CPE が関与していることが明らかになった。CPE は, 細胞の調節性分泌経路においてホルモン前駆体のトランスゴルジネットワーク (TGN) から分泌顆粒へのソーティングレセプターとして機能することが報告されており, Caspr2 においても TGN 輸送系を介した膜へのトランスポートに CPE が関与すると考えられる。樹状突起には小胞体や Golgi 体の小器官が分布しているが, 軸索にはそれらの小器官は存在しない。今回, 大脳皮質の錐体細胞から樹状突起における共局在が示された一方で, 視神経のミエリン部位で CPE の存在が認められなかったことから, 大脳皮質領域への Caspr2 分布と軸索への Caspr2 輸送/局在は異なる機構によることが示唆された。本研究において, Caspr2 と K^+ チャネル間の相互作用に関与する鍵分子の発見には至らなかったが, Caspr2 の細胞内輸送に関与する分子として, 新規に CPE を同定した。

論文審査の要旨

報告番号	医研第	680	号	氏名	大磯 茂
審査委員	主査	小澤 政之			
	副査	有田 和徳		宮田 篤郎	

Contactin-associated protein (Caspr) 2 interacts with carboxypeptidase E in the central nervous system

(中枢神経系におけるコンタクチン関連蛋白質 (Caspr) 2 と Carboxypeptidase E との相互作用)

神経系構築には多くのタンパク質の関与が知られている。コンタクチンおよびコンタクチン関連タンパク質 (Caspr) はその一つであるが、コンタクチンサブグループの一つである TAG-1 と Caspr ファミリーの一つである Caspr2 は、ミエリンのジャクスタパラノード部位において相互作用し、跳躍伝導に重要な K^+ チャネルの局在化に関与している。この Caspr2 と K^+ チャネルとの関連については、皮質異形成焦点性てんかんを患ったアーミッシュの脳において、遺伝子変異による Caspr2 の細胞内部分欠損と K^+ チャネルの海馬錐体細胞の細胞体への異常集積が見られるという臨床報告がある。このことは、Caspr2 の細胞内部分における分子間相互作用が K^+ チャネルの正常な分布に必須であることを示すものであるが、これまで Caspr2 の細胞内部分と相互作用するタンパク質はほとんど検討されておらず、その機構の詳細については明らかにされていない。

本研究では、Caspr2/ K^+ チャネルのジャクスタパラノードへの局在化に関する分子機構の詳細の解明を視野に入れ、まず Caspr2 の細胞内部分と相互作用する分子の検索とこれら分子の機能連関について検討を行っている。

本研究で得られた知見は以下の通りである

- ① Caspr2 と相互作用するタンパク質として、Carboxypeptidase E (CPE) が同定された。
- ② Caspr2 と CPE は、中枢神経において発現するが、特に、皮質の錐体細胞から樹状突起にかけて共局在が認められた。
- ③ CPE は、細胞のゴルジ体において Caspr2 と相互作用し、Caspr2 の膜への細胞内輸送に関与している可能性が示唆された。
- ④ CPE は、ミエリンには局在しておらず、また、 K^+ チャネルとの相互作用も認められなかったことから、Caspr2/ K^+ チャネルのジャクスタパラノードへの局在化には関与していないと考えられた。

本研究で検討された CPE について、ミエリンにおける Caspr2/ K^+ チャネル局在化への関与は認められなかったが、Caspr2 の細胞内輸送に関与する新規の分子として同定された。神経系形成において、Caspr2 は K^+ チャネルの正常な分布に重要なタンパク質であり、Caspr2 の細胞膜への輸送機構の解明に繋がる結果が得られた本研究の意義は非常に大きい。

よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 680 号	氏名	大磯 茂
審査委員	主査	小澤 政之	
	副査	有田 和徳	宮田 篤郎
<p>主査および副査の3名は、平成21年4月13日、学位請求者 大磯茂 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p>			
<p>質問1) 今回、Caspr2 のミエリン形成に関連して、酵母 two-hybrid 法を行っていますが、それに用いたライブラリーはミエリン形成について検討するに適した時期のものなのでしょうか？</p> <p>(回答) Caspr2 は、脳に局在しており、脳内のミエリン形成に関与していることが知られていたため、市販のヒト脳 cDNA ライブラリーを用いました。実際、発生数日後よりミエリンの形成が起こることを考慮しますと、発達初期のライブラリーが使えれば良かったのですが、この two-hybrid システムのライブラリーは特殊なベクターに組み込んであることもあり、発達初期のライブラリーを入手できなかったため、成人のライブラリーを使用しました。</p>			
<p>質問2) 発達段階で Caspr2 と CPE の発現はどのように変わっているのでしょうか？</p> <p>(回答) 今回の論文では示しておりませんが、生後 0, 1, 3, 7, 14, 21, 30 日目のラットの脳を採取し、発達段階での脳における Caspr2 と CPE の発現をウエスタンブロット法で調べてみたところ、Caspr2 は徐々に発現が高くなるのに対して、CPE の発現は生後 0 日から高いレベルであり、測定した期間を通して一定のレベルを維持していたという結果を得ています。</p>			
<p>質問3) CPE の C 末端部分が、相互作用に関与するとのことでしたが、CPE の酵素としての触媒部位との関連性はどのように変わっているのでしょうか？</p> <p>(回答) CPE の酵素活性とソーティングレセプターとしての機能は別々のものでありますが、今回推察された CPE の結合部位は酵素活性部位とは重なっておりません。</p>			
<p>質問4) 通常、カリウムチャネル異常とてんかんの発生はどのような関わりがあるのでしょうか？</p> <p>(回答) 一般的なカリウムチャネルの異常分布とてんかんの関わりは不明ですが、今回引用した Strauss らの論文では、海馬等におけるカリウムチャネルの異常分布が報告されており、そのことなどにより異常な脱分極を起こし、神経伝達に障害が生じたものと考えております。</p>			
<p>質問5) 今回視神経を用いて、蛍光染色を行っていますが、その部位がジャクスタパラノードであることが分かるのでしょうか？</p> <p>(回答) 視神経を用いた Caspr2 の蛍光染色の結果については、これまでに多くの報告がありますが、今回の染色でもそれらと同様に、パラノードを挟むような特徴的な染色像が得られましたので、その部位がジャクスタパラノードであると判断いたしました。</p>			
<p>質問6) CPE の器官別分布の検討で、中枢神経系と副腎で発現が認められており、内分泌臓器である甲状腺では認められなかったようですが、甲状腺では別のタンパク質の関与などの報告がありますか？</p> <p>(回答) CPE と同様に分泌顆粒による細胞内輸送に関与するタンパク質としてはクロモグラニン A がありますが、それは CPE による輸送とは無関係であることが報告されています。従いまして、CPE の発現が認められなかった甲状腺では、クロモグラニン A が関与する経路のような別の細胞内輸送系を介して、甲状腺ホルモンがソーティングされている可能性があると思います。しかしながら、これまでどのようなタンパク質が関与しているかの報告はありません。</p>			

質問7) 今回検討されたカリウムチャンネルは Kv1.1 と Kv1.2 のみですが、多くの種類があるカリウムチャンネル中で、この2つについて検討するのが一般的なのでしょうか？

(回答) ミエリンのジャクスタパラノードには Kv1.1 と Kv1.2 が局在していることと、これまでの Caspr2 関連論文で、Caspr2 と相互作用することが報告されているのは Kv1.1 と Kv1.2 であったため、この2つを選択いたしました。

質問8) Caspr2 と TAG-1 の相互作用は細胞外部分における作用とのことです、今回 Caspr2 とカリウムチャンネルとの相互作用の検討に細胞内部分を用いたのは何故でしょうか？

(回答) Caspr2 とカリウムチャンネルは同じ軸索側で発現しますが、Caspr2 とカリウムチャンネルの細胞外部分における相互作用はないことが報告されております。また、Caspr2 の細胞内部分を欠損させることによりカリウムチャンネルの分布が変わることから、細胞内部分での相互作用が重要であろうと考えました。さらに、Caspr2 の細胞内部分にもカリウムチャンネルの細胞内部分にも PDZ ドメイン結合モチーフの存在が知られており、PDZ 結合タンパクの関与があると考え、細胞内部分で検討しました。

質問9) 今回の two-hybrid 法により得られた陽性クローンの中には、PDZ 結合タンパク質はなかったのでしょうか？

(回答) 今回の陽性クローンの中に一つだけ、Pals-2 という PDZ 結合タンパク質が得られております。このタンパク質については、他の大学院生が研究を進めています。また、2008 年の論文で、別の研究グループが Caspr2 の細胞内部分と Pals-2 が結合することを報告しており、Pals-2 が Caspr2 とカリウムチャンネルとの相互作用に関連する可能性は高いと考えられます。

質問10) CPE は、分泌小胞へいろいろなペプチドをソーティングする機能を有しているということですが、これは基本的に小胞の内部で相互作用しているということだと思います。それに対して今回の Caspr2 との相互作用はこのタイプのものとは異なるタイプの相互作用ではないかと思いますが、いかがでしょうか？

(回答) おっしゃる通りだと思います。今回、実験的な証明はできておりませんが、Caspr2 の細胞内部分で相互作用の検討を行っていますので、CPE のコンフォメーションを考えますと CPE の C 末端側の細胞内部位と相互作用しているのではないかと推察しております。

質問11) スライドの最後の図は、小胞の中での相互作用のように見えたが、そうではないのですか？

(回答) 申し訳ございません。図を簡略化しすぎて、誤解を招く表現となってしまいました。小胞の内部ではなくて、C 末端側の細胞内部位における相互作用ではないかと推察しております。

質問12) 今回は、CPE がミエリン部位には発現していないという結果でしたが、もし存在するという結果であった場合に、どのような実験を想定していましたか？

(回答) もし CPE がジャクスタパラノードにも局在するという結果が得られた場合でも、今回の行った免疫沈降法による CPE とカリウムチャンネルとの相互作用について調べ、さらに膜輸送のみならず、クラスター形成への関与についても検討することになると思います。

質問13) TAG-1 が細胞外において Caspr2 と結合することにより、Caspr2 と CPE の相互作用が変わるかどうかの実験結果や報告がありますか？

(回答) これまでに TAG-1 が細胞外において Caspr2 と結合することにより、Caspr2 と CPE の相互作用が変化するという内容の報告はありません。また、私も TAG-1 と CPE に関する実験は行っていません。ただ、TAG-1 が欠損すると Caspr2 のジャクスタパラノードへの局在化がなくなるという報告はあります。もしミエリン形成に際して CPE が軸索上で Caspr2 と相互作用しているのであれば、TAG-1 により CPE も局在化する可能性はあると思います。しかしながら今回の結果から考えますと、TAG-1 と CPE の関連性は低いと思います。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。