

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590149

研究課題名（和文）難治性てんかんに関わるコンタクチン関連蛋白質の分子間相互作用の解析

研究課題名（英文）Analysis for molecular mechanism of contactin associated protein on intractable epilepsy

研究代表者

武田 泰生 (TAKEDA YASUO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・准教授

研究者番号：60245462

研究成果の概要（和文）：跳躍伝導の K チャネルの局在に関与する Caspr2 の細胞内部分と直接結合する分子として小胞体への蛋白質パッケージングに関わる carboxypeptidase E (CPE) を同定した。これら両者間の相互作用を検討した結果、Caspr2 と CPE はともにラット大脳皮質 2, 3 層の apical dendrites に共存し、細胞内のゴルジ/小胞体に共局在しており、Caspr2 の膜輸送は CPE を介した trans-Golgi network によることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To investigate the molecular mechanism for trafficking of Contactin-associated protein (Caspr) 2 to the cell membrane, we identified carboxypeptidase E (CPE) as a binding partner of Caspr2. Both Caspr2- and CPE-like immunoreactivities (IR) were found to co-localize in the apical dendrites and cell bodies of rat cortical neurons. In subcellular localization analysis, Caspr2- and CPE-like IRs were comigrated in the fractions of Golgi/ER. When Caspr2 cDNA was transfected into COS-7 cells with or without CPE cDNA, Caspr2 localized only in Golgi/ER without CPE, but localized in both Golgi/ER and plasma membrane with CPE. Our data suggest that CPE may be a key molecule to regulate Caspr2 trafficking to the cell membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2006年度			
2007年度			
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総 計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療薬学

キーワード：臨床薬学、難治性てんかん、コンタクチン関連蛋白質、トランスゴルジ輸送系

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷を初め、種々の神経障害後の機能再生過程において、正常かつ迅速な情報伝達を回復するためには、再生された神経軸索での効率よい跳躍伝導が必須であり、軸索を取り巻くミエリンの再形成とイオンチャネル

の適切なクラスタリングならびに局在化が重要である。これらを規定する分子群として、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子コンタクチン群（コンタクチン、TAG-1、BIG-1、BIG-2、NB-2、NB-3 の6種）およびコンタクチン関連蛋白質群（Contactin-Associated Protein, Caspr 1-5

の5種類)が知られている。これまでの研究から、Caspr1は軸索上でコンタクチンと会合しグリア細胞側のNeurofascin(NF)155と結合してパラノード形成に、一方、Caspr2はTAG-1と結合してKチャンネルのクラスター形成とジャクスタパラノードへの局在に関与することが明らかにされている。しかし、これらの分子間相互作用の詳細については明らかにされていない。

Caspr分子群は5つのうち4つの分子がそのC末端部にPDZ(PSD-95, Disk, ZO-1)ドメイン結合配列を持つ。PDZドメインとは、その構造がポケット様であり、特異的な配列(PDZ結合配列)を持つ分子がそのポケット様構造にすっぽりと結合するというドメイン構造である。従って、PDZドメイン分子群は、種々の蛋白質を会合させたり輸送したりする働きを持つ、いわゆる足場蛋白質として知られる。たとえば、NMDA受容体をシナプス膜に輸送し固定するPSD-95などが有名である。Caspr分子群はC末端のアミノ酸配列からタイプIIとタイプIIIに分類される。一方、KチャンネルはタイプIに属する。

ミエリン形成ならびに跳躍伝導に関わる分子機構の解析は、国内外において盛んに進められている。特に、パラノード接着に関わる役者は揃いつつあると言っても過言ではない。その中で、コンタクチン群のコンタクチン、NB-3、TAG-1、およびCaspr群のCaspr1、Caspr2は特に重要であり、これら各分子の遺伝子欠損マウスは、パラノード部の接着構造が崩れ、Kチャンネルの局在の変化が観察されると共に跳躍伝導の異常が報告されている(Neuron, 2001; J. Neurosci., 2001)。このように、パラノードの接着構造およびチャンネルの局在化にこれら分子群の重要性は明らかにされたが、これらの分子間相互連関やこれら分子を機能的につなぐ細胞内足場蛋白質の存在に関する知見は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、皮質形成異常を伴う難治性てんかんの原因遺伝子として同定されたミエリン膜蛋白質コンタクチン関連蛋白質2(Caspr2)に焦点を当て、跳躍伝導の要であり、かつ、種々の神経精神疾患の原因でもある「ミエリン構造の形成ならびにイオンチャンネルの正常なクラスターリングにおけるCaspr2の機能を解明する」ことを目的とし、Caspr2/Kチャンネルと標的とした難治性てんかんの薬物療法の確立と脱髄疾患の再ミエリン化への治療応用の実現を目指す。これらの一貫した治療戦略の開発の中で、本申請では、Caspr2およびKチャンネルのC末端部(PDZ結合ドメイン)と結合し得るPDZド

メイン蛋白質(蛋白質の機能的複合体形成の足場蛋白質となる)の探索を行い、ナトリウム(Na)チャンネルとカリウム(K)チャンネルのクラスターリングおよび局在化の分子機構を明らかにすることを研究課題とする。本研究で標的としているこのPDZドメイン蛋白質が、これら分子複合体のソーティングやクラスター形成に極めて重要である可能性が高い。従って、当該研究により得られる成果は、神経グリア細胞間クロストークの機能的役割を解明するブレークスルーに値する研究成果であると期待している。

3. 研究の方法

1) Two-Hybrid systemを用いたCaspr2と結合する機能蛋白質群の探索と同定

酵母Two-Hybridスクリーニングシステム(MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3, CLONETECH)を用いて、Caspr2細胞内部分に結合する分子の探索を行った。バイトにはpGBKT7にCaspr2細胞内部分47アミノ酸をコードする遺伝子(Caspr2ICD)を組み込んだプラスミド(pGBKT7-Caspr2ICD)を用いた。Caspr2ICDはSH-SY5Y細胞のtotal RNAを素材にしたRT-PCR法により作成した。一方、プレイとしてヒト脳cDNAライブラリー(CHLONETECH)を用い、キャリアのニシン精巢DNAと共に、酵母(AH109)に形質導入した。3.5 x 10⁶個形質導入酵母をX-αGALを含む4アミノ酸(Ade, His, Leu, Trp)欠損SD培地(SD-AHLT培地)上で、30℃、4~5日間培養した。生育したコロニーからプラスミドを回収し、スクリーニングされた遺伝子を同定した。特に、PDZドメインを有する蛋白質に焦点をあてた。

2) Caspr2および標的分子の局在と複合体形成の解析

GST-pull down assayやcaspr2特異抗体ならびに標的遺伝子産物の特異抗体を用いた免疫沈降実験を行い、Caspr2と標的遺伝子産物の直接結合を検討した。さらに、Kチャンネル(Kv1.1、Kv1.2)と結合するか否かについても調べた。次に、各種の特異抗体を用いた免疫組織染色を行い、標的分子とcaspr2ならびにKvチャンネルの共局在について検討した。具体的には、ラット大脳皮質および視神経束の凍結切片を作製し、各々の特異抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、それらの局在を比較検討した。次に、ラット大脳皮質から蔗糖密度勾配遠心分離法を用いて、細胞小器官の分画を行い、Caspr2、標的分子、Kvチャンネルの分布状況を比較検討した。

3) Caspr2 および標的分子の相互作用解析

および Kv チャネル局在化機構の解析

pcDNA4 プラスミドに Caspr2、標的分子および Kv チャネル遺伝子を組込んだ強制発現ベクターを構築した。これらを単独あるいは複数でサル腎細胞由来の COS-7 細胞に導入し、強制発現させたこれら分子の局在を、特異抗体および各種の小器官マーカーを用いて蛍光二重免疫染色を行い、細胞内局在を検討した。

4. 研究成果

1) Caspr2 細胞内部分に結合する蛋白質

酵母 Two-Hybrid スクリーニングにより、Caspr2 細胞内部分と結合する分子を検索した結果、78 個の陽性クローンが得られた。それらのうち、12 個は carboxypeptidase E (CPE) の C 末端側をコードするクローンであった (図 1)。さらに興味ある分子として、分子構造内に PDZ ドメインを 1 個持つ protein associated with Lin-7 (Pals-2) と PDZ-GEF2B が得られた。このうち PDZ-GEF2B はノンコード部分をコードしていたため除外した。従って、上記の Pals-2 および CPE に着目して Caspr2 との相互作用を検討することにした。

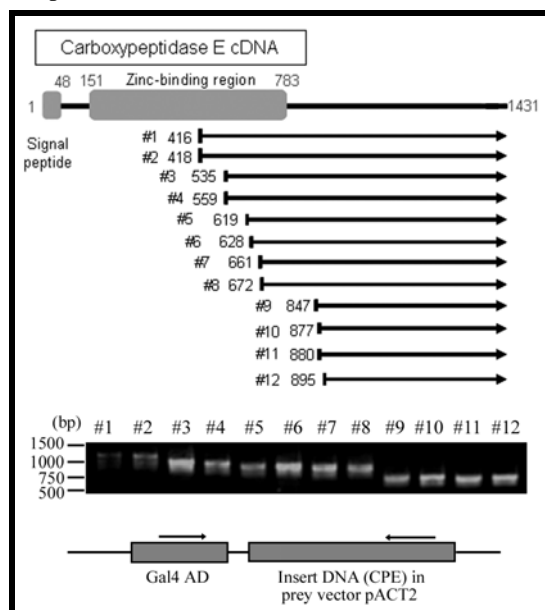


図 1. 酵母 Two-Hybrid スクリーニングで得られた CPE 遺伝子をコードする 12 クローン

2) Caspr2 と Pals2、Caspr2 と CPE の結合

Caspr2 と Pals2 および CPE の相互作用を GST-pull down アッセイと免疫沈降法にて検討したところ、Caspr2 と上記 2 分子は直接結合することが明らかとなった (図 2)。スクリーニングにより得られたクローンのすべてはコーディング領域の一部を認識したクローンであったため、ヒト脳 cDNA ライブラリーから全長の遺伝子スクリーニングを行った。CPE 遺伝子の全長は得られたが、Pals-2

は得ることができず、以後の研究は CPE を対象に行った。一方、CPE と Kv 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できなかった。

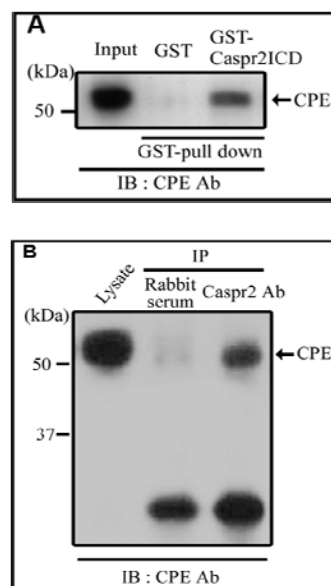


図 2. A) GST-pull down assay、B) 抗 Caspr2 抗体を用いてラット脳ライセートから免疫沈降した産物を抗 CPE 抗体でウェスタンブロット解析した。

3) Caspr2 および CPE の発現と局在

Caspr2 及び CPE の臓器別分布を調べたところ、両分子とも脳に高い発現が見られた。さらに脳各部位における発現を検討した結果、両分子ともに広く分布していた。ラット大脳皮質の凍結切片で Caspr2、CPE、Kv チャネルの分布を調べたところ、いずれも皮質の錐体細胞及び樹状突起 (apical dendrite) に免疫染色像が認められた。また視神経のミエリン部位においては、ジャクスタパラノード部に Caspr2 の染色を確認できたが、CPE は検出できなかった (図 3)。Kv チャネルの発現については鮮明な染色像が得られずはっきりした結果を得ることができなかった。

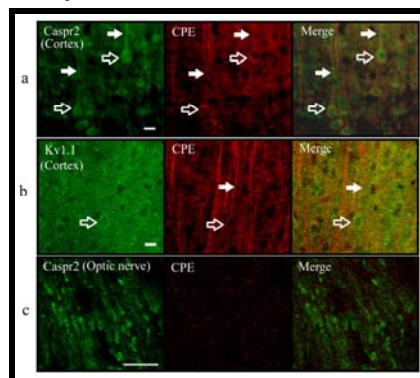


図 3. ラット大脳皮質切片 (a, b) およびラット視神経束 (c) を各種抗体による蛍光二重

疫組織染色像 a) Caspr2 と CPE、b) Kv1.1 と CPE、c) Caspr2 と CPE

さらに、大脳皮質のホモジネートを作製し、蔗糖密度勾配遠心分離法を用いた細胞内小器官分画において、ミエリン、Golgi/ER、シナプトゾーム、ミトコンドリア、膜画分、可溶性画分における Caspr2 及び CPE の局在を検討した結果、両分子が Golgi/ER に局在した。さらに、遺伝子を単独で COS-7 細胞に導入し強制発現させた結果、Caspr2 および CPE 共に、Golgi/ER に局在することが明らかになった (図 4)。

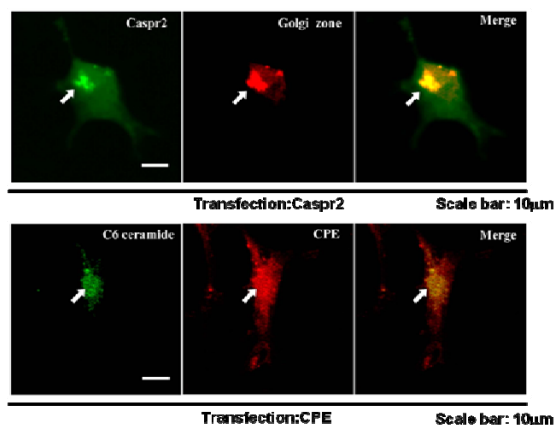


図 4. Caspr2 および CPE 遺伝子導入後の COS-7 細胞における局在 (上パネル) Caspr2 とゴルジ装置特異マーカーによる二重蛍光染色像。下パネル) CPE と C6 ceramide に対する蛍光二重免疫染色像

4) Caspr2 は TGN を介して膜輸送される

次に、COS-7 細胞に Caspr2 および CPE 遺伝子の両方を導入した。その結果、両分子を一緒に発現している細胞において、両分子が Golgi/ER に局在するのみならず、細胞膜に移送されている染色が認められた (図 5)。

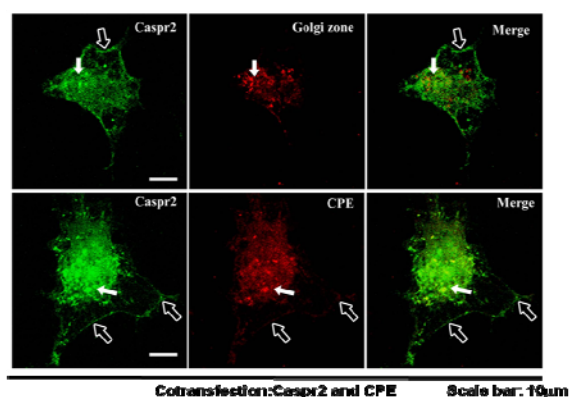


図 5. COS-7 細胞における Caspr2 と CPE の共発現による両分子の局在

以上の結果から、Caspr2 と CPE は Golgi/ER に共局在し、強制発現 COS-7 細胞において、

Caspr と CPE の両分子を導入した細胞で Caspr2 の細胞膜への局在が認められたことから、Caspr2 の細胞膜への細胞内輸送に CPE が関与していることが推察された。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の機能が報告されており、Caspr2 においても TGN における相互作用が考えられる。一方、樹状突起には小胞体やゴルジ体の小器官が分布しており、軸索にはそれらの小器官は分布していないことが知られている。このことは、今回、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ことにに対し、視神経のミエリン部位においては共局在が検出できなかったことと一致する。本研究において、Caspr2 と Kv チャネル分布の相互作用に関与する分子を見つけることはできなかったが、Caspr2 の細胞内輸送に関与する分子として、新規に CPE を見出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 29 件)

- ① Matsumoto, K., Takeshita, A., Ikawa, K., Shigemitsu, A., Yaji, K., Shimodozono, Y., Morikawa, N., Takeda, Y., Yamada, K., Higher linezolid exposure and higher frequency of thrombocytopenia in patients with renal dysfunction. Int. J. Antimicrob. Agents, 査読有, 36, 2010, 179-181.
- ② Sakurai, K., Toyoshima, M., Takeda, Y., Shimoda, Y., Watanabe K., Synaptic formation in subsets of glutamatergic terminals in the mouse hippocampal formation is affected by a deficiency in the neural cell recognition molecule NB-3., Neurosci. Lett., 査読有, 473, 2010, 102-106.
- ③ Iwashita, K., Ikeda, R., Takeda, Y., Sumizawa, T., Furukawa, T., Yamaguchi, T., Akiyama, S., Yamada, K., Major vault protein forms complexes with hypoxia-inducible factor (HIF)-1α and reduces HIF-1α level in ACHN human renal adenocarcinoma cells., Cancer Sci., 査読有, 101, 2010, 920-926.
- ④ Matsumoto, K., Kanazawa, N., Ikawa, K., Fukamizu, T., Shigemitsu, A., Yaji, K., Shimodozono, Y., Morikawa, N., Takeda, Y., Yamada, K., Determination of teicoplanin through concentration target and appropriate total dose during the first 3 days: a retrospective study in patients with MRSA

- infections., J. Infect. Chemother., 査読有, 16, 2010, 193-199.
- ⑤ Shibayama, Y., Nagano, M., Fujii, A., Takeda, Y., Yamada, K., Safety evaluation of Black Rice Vinegar (Kurosu) from a Jar on food-drug interaction: 30-day ingestion study on expressions of drug metabolism enzyme and transporters in rats., J. Health Sci., 査読有, 56, 2010, 712-716.
 - ⑥ Oiso, S., Takeda, Y., Futagawa, T., Miura, T., Kuchiiwa, S., Nishida, K., Ikeda, R., Kariyazono, H., Watanabe, K., Yamada, K., Contactin-associated protein (Caspr) 2 interacts with carboxypeptidase E in the central nervous system., J. Neurochem., 査読有, 109, 2009, 158-167.
 - ⑦ Toyoshima, M., Sakurai, K., Shimazaki, K., Takeda, Y., Shimoda, Y., Watanabe, K., Deficiency of Neural recognition molecule NB-2 affects the development of glutamatergic auditory pathways from the ventral cochlear nucleus to superior olivary complex in mouse., Developmental Biol., 査読有, 336, 2009, 192-220.
 - ⑧ Sakurai, K., Ueda, H., Matsubara, K., Takeda, Y., Karagogeos, D., Shimoda, Y., Watanabe, K., Contribution of the neural cell recognition molecule NB-3 to synapse formation between parallel fibers and Purkinje cells in mouse., Developmental Neurobiol., 査読有, 69, 2009, 811-824.
 - ⑨ Matsumoto, K., Ikawa, K., Abematsu, K., Fukunaga, N., Nishida, K., Fukamizu, T., Shimodozono, Y., Morikawa, N., Takeda, Y., Yamada, K., Correlation between voriconazole trough plasma concentration and hepatotoxicity in patients with different CYP2C19 genotypes., Int. J. Antimicrob. Agents, 査読有, 34, 2009, 91-94.
 - ⑩ Toyoshima, M., Sakurai, K., Shimazaki, K., Takeda, Y., Nakamoto, M., Serizawa, S., Shimoda, Y., Watanabe, K., Preferential localization of neural cell recognition molecule NB-2 in developing glutamatergic neurons in the rat auditory brainstem., J. Comp. Neurol., 査読有, 531, 2009, 349-362.
 - ⑪ Shibayama, Y., Takeda, Y., Yamada, K., Effect of methotrexate treatment on expression levels of organic anion transporter polypeptide 2, P-glycoprotein and bile salt export pump in rats., Biol. Pharm. Bull., 査読有, 32, 2009, 493-496.
 - ⑫ 金子 生、猪川和朗、福原 慶、森川則文、福永直子、深水知英、松元一明、下堂 権洋、武田泰生、山田勝士、シクロスポリンおよびタクロリムスの TDM 研究支援ソフトウェアの開発、TDM 研究、査読有、26 巻、2009、52-58.
 - ⑬ Ma, Q.-H., Futagawa, T., Yang, W.-L., Jiang, X.-D., Zeng L., Takeda, Y., Xu, R.-X., Bagnard, D., Schachner, M., Furley, A.J., Karagogeos, D., Watanabe, K., Dawe, G.S., Xiao, Z.-C., A TAG1-APP signaling pathway through Fe65 negatively modulates neurogenesis., Nature Cell Biol., 査読有, 10, 2008, 283-294.
 - ⑭ Ye, H., Tan, Y. L. J., Ponniah, S., Takeda, Y., Wang, S.-Q., Schachner, M., Watanabe, K., Pallen, C.J., Xiao, Z.-C., Neural recognition molecules CHL1 and NB-3 regulate apical dendrite orientation in the neocortex via PTP α ., EMBO J., 査読有, 27, 2008, 188-200.
 - ⑮ Nishida, K., Kuchiiwa, S., Oiso, S., Futagawa, T., Masuda, S., Takeda, Y., Yamada, K., Up-regulation of matrix metalloproteinase-3 in the dorsal root ganglion of rats with paclitaxel-induced neuropathy., Cancer Sci., 査読有, 99, 2008, 1618-1625.
 - ⑯ Kusadome, C., Shibayama, Y., Nishi, Y., Takeda, Y., Yamada, K., Stability of high-dose methylcobalamin injection., J. Applied Ther. Res., 査読有, 6, 2008, 15-18.
 - ⑰ Ikeda, R., Tajitsu, Y., Iwashita, K., Che, X.F., Yoshida, K., Ushiyama, M., Furukawa, T., Komatsu, M., Yamaguchi, T., Shibayama, Y., Yamamoto, M., Zhao, H.Y., Arima, J., Takeda, Y., Akiyama, S., Yamada, K., Thymidine phosphorylase inhibits the expression of proapoptotic protein BNIP3., Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有, 370, 2008, 220-224.
- [学会発表] (計 90 件)
- ① 山口沙織、益田将吾、二川俊隆、鬼丸貴裕、末廣淑子、武田泰生、山田勝士、第 27 回日本薬学会九州支部大会、長崎、2010 年 12 月 11 日。
 - ② Futagawa, T., Onimaru, T., Chen, Z. C., Masuda, S., Suehiro, Y., Yamaguchi, S., Xiao, Z. C., Takeda, Y., Yamada, K., The 20th Japan-Korea Joint Seminar

- on Pharmacology, Nov 26, 2010, Kagoshima.
- ③ 末廣淑子、二川俊隆、益田将吾、鬼丸貴裕、山口沙織、武田泰生、山田勝士、第63回日本薬理学会西南部会、鹿児島、2010年11月26日.
- ④ Takeda, Y., 第20回日本医療薬学会、2010年11月13日、千葉.
- ⑤ Saito, S., Arima, J., Shimodozono, Y., Takeda, Y., Yamada, K., The 23rd Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress, Nov 6, 2010, Taiwan.
- ⑥ Takeda, Y., Matsumoto, K., Takeshita, A., Ikawa, K., Morikawa, N., Yamada, K., 日本薬物動態学会 第25回年会、東京、2010年10月8日.
- ⑦ Ushiyama, M., Ikeda, R., Miyawaki, A., Yamaguchi, T., Tazitsu, Y., Nishizawa, Y., Mataka, H., Nakamura, N., Takeda, Y., Yamada, K., 70th International Congress of FIP, Aug 30, 2010, Lisbon, Portugal.
- ⑧ 藤井寛樹、二川俊隆、益田将吾、石原義久、鬼丸貴裕、末廣淑子、山口沙織、武田泰生、山田勝士、第26回日本薬学会九州支部大会、福岡、2009年12月13日.
- ⑨ Takeda, Y., 2009 China-Japan Pharmacists' International Forum, Nov 14, 2009, Beijing, China.
- ⑩ Takeda, Y., Nishida, K., Yamada, K., Asian Federation for Pharmaceutical Sciences, Oct 16, 2009, Fukuoka.
- ⑪ Kondo, T., Matsumoto, K., Tanaka, S., Yamaguchi, T., Nishi, S., Ueno, K., Ogura, T., Takeda, Y., Yamada, K., 69th International Congress of FIP, Sep 5, 2009, Istanbul, Turkey.
- ⑫ 武田泰生、益田将吾、二川俊隆、西田健太郎、田畑祥、藤井寛樹、山田勝士、医療薬学フォーラム 2009、京都、2009年7月11日.
- ⑬ 田實裕介、池田龍二、岩下建一、武田泰生、山田勝士、第82回日本薬理学会年会、横浜、2009年3月17日.
- ⑭ Ikeda, R., Takeda, Y., Akiyama, S., Yamada, K., 22nd Federation of Asian Pharmaceutical Association Congress, Nov 8, 2008, Singapore.
- ⑮ Takeda, Y., Nishida, K., Yamada, K., The 19th Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology, Nov 7, 2008, Busan.
- ⑯ Takeda, Y., 68th International Congress of FIP, Sep 3, 2008, Basel, Switzerland.

- ⑰ 重永明恵、屋地慶子、上野恵、下堂蘭権洋、武田泰生、山田勝士、医療薬学フォーラム 2008年7月12日、東京、2008.

〔図書〕(計3件)

- ① 武田泰生、他、丸善出版、カッティング薬理学【原著10版】、分担執筆、2009、36-50, 51-64, 493-512, 513-527.
- ② 武田泰生、他、南山堂出版、パートナー形態機能学、分担執筆、2008、95-117.
- ③ 武田泰生、他、南山堂出版、病気と薬パースペクティブ BOOK 2008、分担執筆、2008、496-497, 501, 504, 508-509, 515-517, 520-521, 530-532, 536-537, 540-541, 547-548, 554.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 泰生 (TAKEDA YASUO)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・准教授
研究者番号：60245462

(2) 研究分担者

山田 勝士 (YAMADA KATUSHI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・教授
研究者番号：00037491

(3) 協力研究者

チーチェン シャオ (ZHI-CHENG XIAO)
Monash 大学・医学部・教授
オーストラリア
研究者番号：なし

二川 俊隆 (FUTAGAWA TOSHITAKA)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・薬剤師
研究者番号：なし

大磯 茂 (OISO SHIGERU)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・薬剤師
研究者番号：なし

益田 将吾 (MASUDA SHOGO)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・薬剤師
研究者番号：なし