

【総説】

視神経軸索の再生を促進するタンパク質因子について

The protein factors which promote optic nerve regeneration.

金沢大学大学院医学系研究科
脳情報分子学分野

松 川 通

はじめに

一般的には哺乳類の中樞神経はその軸索が損傷されると、逆行性の細胞死を引き起こす。ところが、魚類等下等な脊椎動物の中樞神経細胞は軸索損傷後も死ぬことはなく、損傷された軸索が伸長することが知られている¹⁾。我々はヒト中樞神経軸索の損傷からの回復を最終目標に、サカナ視神経をモデルシステムとして、神経軸索の再生過程を分子生物学的、形態学的、電気生理学的、行動学的にと多角的に研究している。サカナの視神経は視蓋と呼ばれる脳の一部へ投射している。網膜からの視蓋への投射には規則性があり、網膜神経節細胞の視蓋への投射位置は決まっている。成体キンギョ視神経を切断すると、数日後に軸索が伸展し始め約1ヶ月後には視蓋へ到達する。しかし、視蓋へ到達したばかりの時期は、視蓋への投射位置がランダムで視蓋全体に拡がっている。それが徐々に改善され本来の正しい位置への投射に収束されていく。このようなことから、我々は、キンギョ視神経軸索の再生過程を3つの時期に分けて考えている。1) 視神経切断から5日ないし1週間後の期間、軸索再生誘導期、2) 視神経切断後1週間から1ヶ月ほどの期間、軸索伸長期、3) 1ヶ月から5~6ヶ月後の期間、視蓋に形成されたシナプスのリファインメント期。ここでは、1) と2) の時期において軸索再生に深く関わっていると考えられるタンパク質因子について、我々の研究室で得られた成果を中心に紹介したい。

神経節細胞の生存に関わるタンパク質因子

ラットの視神経を切断すると網膜神経節細胞はアポトーシスを起こして死んでしまうが、キンギョ視神経を切断しても神経節細胞は死ぬことはない。キンギョ視神経軸索再生の初期過程は、1) 網膜神経節細胞の生存、2) 視神経軸索伸長の誘導の二つの過程に分けるのが妥当と思われる。Koriyamaらは神経節細胞の生存に関わる因子について検討した²⁾。現在たくさんのアポトーシス誘導因子とアポトーシス抑制因子が知られているが、それらの内アポトーシス誘導因子としてBax、アポトーシス抑制因子としてAktリン酸化体 (p-Akt)、Badリン酸化体 (p-Bad) およびBcl-2について成体キンギョ視神経切断後の動向を調べた。p-Aktとp-Badは、視神経切断後3日で3倍ほどに増加し、更に10日後には8倍ほどに増加した。また、Bcl-2は約2倍程度の増加が見られた。しかし、Baxの量はほとんど変化がなかった。このように、キンギョにおいてはアポトーシスを抑制する因子の活性化が起きていることが分かった。インシュリン様増殖因子-I (IGF-I) がフォスファチジルイノシトール3リン酸キナーゼ

(PI3K)/Akt系を活性化するシグナルとして知られている。IGFはプロインシュリン様の構造を持つ小さなタンパク質で、ヒトIGF-Iは70個のアミノ酸より成っている。キンギョ網膜におけるIGF-Iの変化を調べると、mRNAは視神経切断1日後に増加し始めた。またIGF-Iタンパク質も切断後すぐに増加し、5日後に2倍になった。また、PI3K阻害剤ワートマニンによって、視神経切断後のp-Akt増加が抑制された。このことから、キンギョ網膜の神経節細胞のアポトーシス誘導阻害にはIGF-Iが一役買っていることが予想された。

次いで成体ラット網膜について、同様のことを調べた³⁾。視神経切断後、アポトーシス抑制因子p-Aktとp-Badは速やかに減少し、12日後にp-Aktは20%に、p-Badは6日後に10%に減少した。一方アポトーシス誘導因子、Baxは6日後に5倍に増加した。p-Aktとp-Badの挙動はキンギョとは全く逆であり、また、キンギョでは変化の無かったBaxは増加していた。更に、キンギョで増加していたIGF-Iは減少していた。ラット網膜神経節細胞のアポトーシスの誘導にはこれらの因子が関わっていると思われた。そこで、ラット眼球にIGF-Iを注入したところ、視神経切断後の神経節細胞のアポトーシスが抑えられた。ラット網膜神経節細胞のアポトーシス誘導はIGF-Iの減少によっていることが分かった。更に成体ラット網膜を単離し、はさみで刻んで切片にしそれを培養する実験を行った。培地中にIGF-Iを加えたところ、ラット網膜切片からの神経突起伸長を誘導した(図1)。IGF-Iが成体ラットの網膜切片から、神経突起の伸長を促すことが分かった。

神経突起伸長を開始させるタンパク質因子

プルプリン (purpurin) は、ニワトリ胎児の網膜から網膜培養細胞の接着や生存を増強する因子として単離された⁴⁾。プルプリンは網膜特異的な分泌タンパク質で、レチノール結合活性が



図1 ラット網膜培養切片からのIGF-Iによる神経突起伸長
A)コントロール, B)100nMのIGF-I添加。スケールバーは200 μ m。文献2より改変。

あり、視細胞で作られ分泌されている。そのアミノ酸配列からレチノール結合タンパク質ファミリーの一つに分類されている。purpurinと言う名前はプルプリンをポリアクリルアミドゲル電気泳動し、銀染色したときに紫色 (purple) に染まる事由来しており、パープリンのほうが英語の実際の発音に近い表記と思われるが、我々はプルプリンとよびならわしている。

ディファレンシャル・ハイブリダイゼーションにより、成体キンギョの視神経切断後、網膜で増加するcDNAをいくつもクローニングし塩基配列を決定したところ、その内の一つがプルプリンであった⁶。塩基配列から推定されるアミノ酸配列を見ると、キンギョのプルプリンはニワトリと同じ196アミノ酸残基から成る小さなタンパク質で、魚類とトリにおいて全く同一のアミノ酸残基は80%であり、進化的にかなり保存されたタンパク質であることが分かる。キンギョプルプリンのN末端からの21アミノ酸残基は分泌シグナルであると予想されている。また、プルプリンの発現はキンギョでも網膜特異的であった。

ゼブラフィッシュは遺伝学的にそして分子生物学的にもっとも良く調べられているサカナであり、更にゲノムの塩基配列が大部分解明されており、分子生物学的な研究には有利なサカナである。そこで、ゼブラフィッシュのプルプリンcDNAもクローニングした⁷。我々はこのプルプリンmRNAがキンギョとゼブラフィッシュの網膜において、視神経切断後増加することを見出した (図2にゼブラフィッシュ網膜での視神経切断後のPur

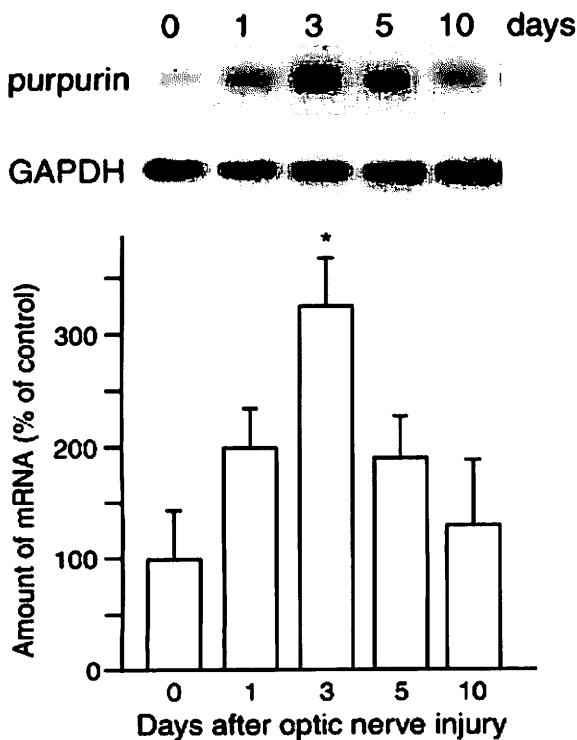


図2 ゼブラフィッシュプルプリン mRNAの視神経切断後の変化。ノーザンブロットハイブリダイゼーションのオートラジオグラム。プルプリン (Pur) mRNAのバンドとGAPDH (グルコース-6-フォスフェートデヒドロゲナーゼ) mRNAのバンドを示す。全RNAは視神経切断後、0, 1, 3, 5, 10日目にゼブラフィッシュ眼球 (レンズは取り除いた) より調製した。下はプルプリン mRNAの量をグラフ化したもの。文献7より改変。

mRNAの変化量を示した)。プルプリン mRNAは視神経切断後1日目で2倍、3日目に3倍強に増加し、5日目で減少、10日目ではほぼ元のレベルに戻っていた。このようにプルプリンmRNAは視神経切断後すぐに増加し、そして速やかに減少する発現パターンを示した。このことから、プルプリンは軸索再生の初期過程に関与している事が示唆された。

プルプリンmRNAはニワトリ同様、サカナでも視細胞で特異的に発現しており、視神経切断後その発現量が増加していた (図3にキンギョ網膜におけるプルプリンmRNA *in situ* ハイブリダイゼーション像を示す)。プルプリンタンパク質もやはり視神経切断後増加していた。網膜組織切片を用いて、免疫染色を行うと、mRNAとは異なり、タンパク質は網膜全体に拡がっており、細胞と細胞の間隙が良く染まっていた。これは、プルプリンがキンギョでも視細胞から分泌され網膜全体に拡散していることを示している。視神経切断後は網膜全体が強く染まっていたことから、視神経切断後は視細胞でのプルプリン生産量、分泌量が増加し、網膜全体の分布量を押上げていることが分かった。

プルプリンが軸索再生の初期過程に関与しているのではないかと思われたので、軸索伸長に対するプルプリンの影響を調べることにした。キンギョ網膜を単離しその組織切片を培養すると切片から神経突起が伸び出してくる事が知られている。その際に前処理、網膜単離の5日~7日ほど前にあらかじめ視神経を切断する処理 (プライムしたと称している) を行うこともある。プライムした網膜切片からは培養開始後すぐに神経突起伸長が観察される。しかし、無処理の (アンプライム) 網膜から調製した切片からは神経突起伸長が見られず、培養開始5~7日ほど経ってからやっと突起伸長が観察されるようになる。キンギョ網膜の切片培養を行い、プルプリンの軸索伸長への影響を調べた。プルプリンは大腸菌由来チオレドキシンの融合タンパク質として大腸菌で作らせ、精製したものを用いた。培地に精製したプルプリンだけ、あるいはレチノールだけを加えて、アンプライム網膜切片を5日間培養しても、効果は見られなかった。しかしプルプリンとレチノールを同時に加えると神経突起の伸長を著しく促進し (図4A, B)、プライムした網膜とほぼ同様の突起伸長が観察された。しかし、プライムした網膜から調製した切片へ加えても効果はなく、神経突起伸長そのものを促進しているわけでは無いことが分かった。プルプリンは視神経切断

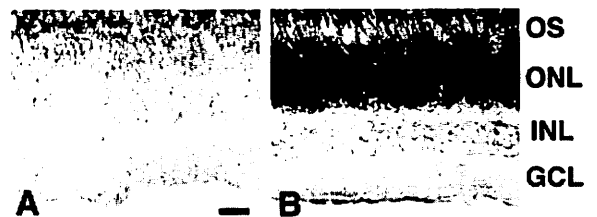


図3 キンギョプルプリンmRNAの*in situ*ハイブリダイゼーション像。キンギョ網膜を視神経切断0日 (A) あるいは5日後 (B) に単離した。プルプリンのアンチセンスcRNAをプローブにしてハイブリダイズさせた。5日目のONLがよく染まっている。文献6より改変。スケールバーは20µm。OS: 外節, ONL; 外顆粒層, INL; 内顆粒層, GCL; 神経節細胞層

直後に増加していることも考えると、神経突起伸長を開始する、もしくは開始を促進する働きがあると予想される。

ほ乳類動物のプルプリンの存在については現在のところはっきりしていない。ラット網膜からRNAを抽出しノーザンブロットハイブリダイゼーションを行っても、バンドは全く検出されていない。また、ヒト、ラットあるいはマウスのゲノミックデータベースを当たっても、それらしい遺伝子は見つかっていない。

プルプリンの作用機構について

軸索再生にレチノイン酸が関与しているという報告がいくつかある⁹。我々はプルプリンがレチノイン酸によるシグナル伝達系を動かしているのではないかと考えた。レチノールはレチナールに転換され、レチナールからレチノイン酸合成酵素(RALDH)によりレチノイン酸が合成される。合成されたレチノイン酸は核内にあるレチノイン酸リセプター(RAR)に結合し、RARを活性化する。RARは転写因子であり、活性化されたRARは様々な遺伝子の転写を促進する。レチノイン酸合成にはRALDHの活性化が鍵となっている。現在多くの物質がシグナル伝達物質として知られているが、レチノイン酸はもっとも古くから知られているものの一つである。シグナル伝達物質は厳密にその放出なり合成なりが制御されており、たいいていのシグナル伝達物質はその制御物質も分かっている。しかし、まだ何がレチノイン酸のシグナル伝達系を活性化するかは分かっていないし、RALDHの活性化の機構もよく分かっていない。

切片培養の培地へレチノイン酸を加えるとプルプリンとレチノールを加えたときと同等の促進を示し(図4C)、レチノイン酸の関与が示唆された。前述のとおり、プルプリンとレチノールが共にあると神経突起伸長を促進したが、このときに更にRALDHの阻害剤ジスルフィラムも加えると、突起伸長の促進が全く見られなくなり、元のレベルへ戻ってしまった(図4D)。また、更に、レチノイン酸も同時に加えるとジスルフィラムによる阻害はみられなくなり、プルプリンとレチノールにを同時

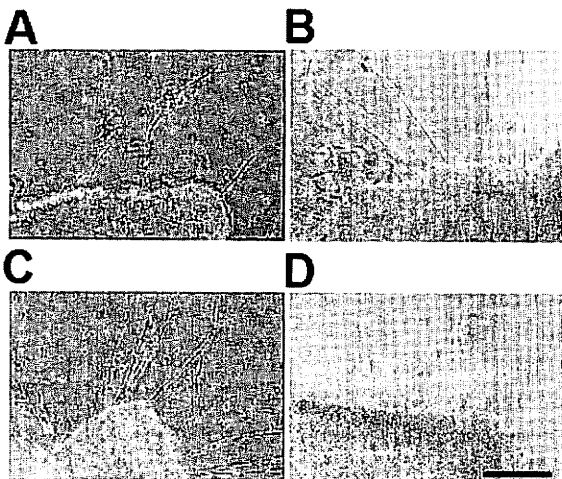


図4 キンギョ網膜培養切片からの神経突起伸長
プライムしていないキンギョ網膜切片を、プルプリン(Pur) (1 μg/ml)(A), Pur+レチノール(1 μM)(B), レチノイン酸(10 μM)(C), Pur+レチノール+disulphiram(10 μM)(D)を加えた培地で5日間培養した。スケールバーは200 μm。文献6より改変。

に加えたときに見られたレベルにまで回復した。これらのことから、プルプリンがレチノイン酸シグナル伝達系を活性化する分子であることが示唆された。

実際にキンギョ網膜で軸索再生にレチノイン酸が関与しているかどうかを確かめるために、RALDHやレチノイン酸分解酵素(CYP26)などのmRNA量の視神経切断後のキンギョ網膜における変動を調べた。RALDH mRNAは視神経切断後5日目まではほとんど変化しなかったが、7~10日目に約3倍に増加し、20日後にはほぼ元に戻った。また、CYP26 mRNAは視神経切断後すぐに減少し始め、5~7日後には4割程度に減少し、その後ゆっくりと回復した。また、RARは10日頃に増加していた。実際にキンギョ視神経軸索の再生にレチノイン酸が関与している事を示す結果が得られた。プルプリン、RALDHやCYP26のmRNAの増減を視神経切断後の日を追って模式的に表したのが図5である。この図は「増える」、「減る」と言うことを定性的に表わしたもので、定量的な正確さは無い。プルプリンの増加の後で、RALDHの増加、CYP26の減少が起きている。RALDHが増加しCYP26が減少する時期にレチノイン酸が蓄積しシグナルとして働いているのではないかと予想される。この結果はプルプリンがレチノイン酸のシグナル伝達系を活性化している事を示唆している。

軸索伸長を促進するタンパク質因子

トランスグルタミナーゼ(TG)(EC 2.3.2.13)はタンパク質リジン残基のアミノ基と別のタンパク質のグルタミン残基のカルボキシアミド基とを脱アミノ結合させる活性がある。二つのタンパク質を架橋し、タンパク質2量体や更に高次のポリマーを作るのが役割の一つである。TGは様々なタイプのタンパク質から成るファミリータンパク質であり、主として1)血清型、2)組織型、3)ケラチノサイト型、4)上皮組織型の4種類のタイプに分類される⁹。組織型は様々な組織に分布しており、神経をはじめとするいろいろな組織に損傷がおこるとその活性が増加することが知られている¹⁰。

我々はタイ肝臓の組織型TGをプローブとして、キンギョ網膜のTG cDNAをクローニングし、その視神経再生に及ぼす作用について検討した¹⁰。クローニングされたTG(TG_R)と称する

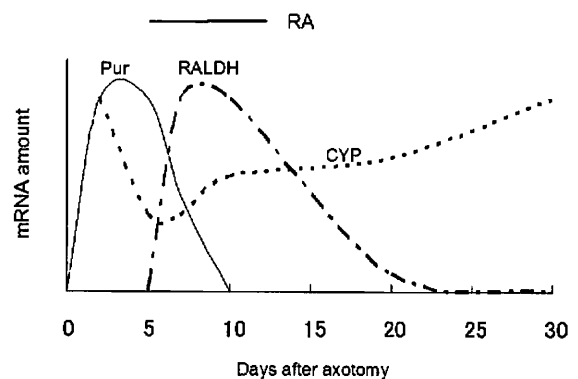


図5 プルプリン発現とレチノイン酸合成
視神経切断後の、プルプリン(—), RALDH(---), CYP26(----)のmRNAの量を模式的に表した。縦軸はmRNA量を表しているが、定量的な表現ではない。レチノイン酸(RA)が蓄積されると思われる時期を太線で示した。

のDNAシーケンスから推定されるアミノ酸残基数は678残基で、中程に全てのTGに共通な活性化部位のアミノ酸配列を持っていた。キンギョ視神経切断後TG_R mRNAは網膜でゆっくり増加し、20日後に約2倍になり、その後ゆっくりと減少した。*in situ*ハイブリダイゼーションを行うと、未処理網膜では神経節細胞層(GCL)、内顆粒層(INL)に弱い発現が見られた。視神経切断5日、20日、40日後のGCLで発現が増加していた。リコンビナントTG_Rを大腸菌にて作らせ、精製しウサギへ免疫して抗TG_R抗血清を作成した。その抗体を用いてTG_Rタンパク質をウェスタンブロット、免疫組織染色などで検出したところ、TG_R mRNAと同じような結果が得られた。これらのことから、キンギョ視神経再生においてTG_Rがなんらかの関与をしていることが示唆された。TG_R量が増加するのは軸索が視蓋に向かってどんどん伸びている時期と重なるので、軸索伸展に関わりがあると思われる。

組織型TGは分泌されているものもあるので、キンギョTG_Rを精製し培養網膜切片に与え、影響を調べることにした。ほ乳類細胞用発現ベクターへTG_R cDNA全長を組み込み、培養細胞HEK293へトランスフェクトし、細胞抽出液よりTG_Rを精製した。その活性を測定後、キンギョ切片培養の培地へ加えた。アンプライム網膜切片の神経突起伸長には影響を与えなかったが、プライム網膜切片からの神経突起伸長を亢進した。切片ごとの神経突起の数を数え、神経突起数によって切片をグループ分けした。プライムした網膜の培養では、TG_R添加によって、20本以上の神経突起を伸ばしている切片の割合が増加していた(図6)。プライムしていない網膜切片は影響を受けなかった。TG_Rが神経突起伸長を促進することが分かった。

更にTG_Rの神経突起伸長に対する影響を調べるために、TG阻害実験を行った。RNA干渉を用いたタンパク質合成阻害のための短いRNAを合成した。合成したRNAをリポフェクションにてプライムした網膜切片に取り込ませたところ、突起伸長を50%程阻害した。また、抗TG_R抗体を培地に加えたところ、神経突起伸長をやはり半分ほどに抑制した。また、TGの阻害剤を加えたところ、突起伸長が1/4から1/5に減少した。これらのこと

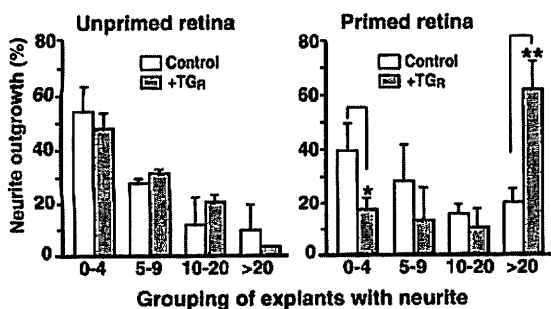


図6 TG_Rによる神経突起伸長の促進
アンプライムキンギョ網膜あるいはプライムしたキンギョ網膜から調製した切片を5日間培養した。培地に精製したリコンビナントTG_R (0.01 U/ml) (closed bar), もしくはモック抽出物を(コントロール) (open bar) 加えた。組織切片ごとの神経突起の数を計測し、突起数によってグループ分けした。縦軸は各グループの切片数を示している。*P<0.05, **P<0.005。文献10より改変。

からTG_Rは神経節細胞に軸索再生を誘導しているわけではなく、軸索の成長そのものを促進すること、少なくともTG_Rの一部は分泌され細胞の外側から働いて軸索伸展に効果がある事が分かった。TG_Rの基質については現在研究中で、はっきりとはしていない。

一方、軸索再生が起こらない成体ラット網膜でTG_Rの振る舞いを調べた。免疫組織染色法にてラット網膜切片を抗TG_R抗体で染めると、GCLが濃く染色され、INLやONLが薄く染色された。視神経を切断すると、切断1日後にGCLでの染色が薄くなり、7日後にはほとんど消えてしまった。この間、INLやONLの染色は全く変わっていなかった。このTG_Rの減少はラット視神経が再生できない理由の一つではないかと思われる。そこで、ラット網膜の切片培養を行い、TG_Rにより突起伸長が促進されるかどうか検討した。ラット網膜切片培養5日後、TG_R添加により濃度依存的に神経突起伸長が、2倍ないし3倍促進された。成体ラット視神経でもTG_Rが軸索再生を促進する事が分かった。

最後に

我々はサカナを材料として中枢神経軸索損傷後の軸索再生の素過程を一つ一つ明らかにし、中枢神経軸索の再生がどのような機構で進むのかを明らかにしたいと考えている。更に、それをほ乳類に応用することで、ほ乳類中枢神経軸索の再生も可能になるのではないかと考えている。我々はまだその道の途中にいる。現在、我々がどこまでたどり着いたかをここにまとめてみた。

謝辞

これら因子の研究は脳情報分子学研究室の学生、職員ばかりでなく、他の研究室の多くの先生方との共同研究で行われたものである。関わっていただいた皆様に、心より感謝の意を表したいと思います。

文献

- 1) Matsukawa T, Arai K, Koriyama Y, Liu ZW, Kato S. Axonal regeneration of fish optic nerve after injury. *Biol Pharm Bull* 27: 45-51, 2004
- 2) Koriyama Y, Homma K, Sugitani K, Higuchi Y, Matsukawa T, Murayama D, Kato S. Upregulation of IGF-I in the goldfish retinal ganglion cells during the early stage of optic nerve regeneration. *Neurochem Int* 50: 749-756, 2007
- 3) Homma K, Koriyama Y, Mawatari K, Higuchi Y, Kosaka J, Kato S. Early downregulation of IGF-I decides the fate of rat retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Neurochem Int* 50: 741-748, 2007
- 4) Berman P, Gray P, Chen E, Keyser K, Ehrlich D, Karten H, LaCorbiere M, Esch F, Schubert D. Sequence analysis, cellular localization, and expression of a neuroretina adhesion and cell survival molecule. *Cell* 51: 135-142, 1987
- 5) Liu ZW, Matsukawa T, Arai K, Devadas M, Nakashima H, Tanaka M, Mawatari K, Kato S. Na,K-ATPase alpha3 subunit in the goldfish retina during optic nerve regeneration. *J Neurochem* 80: 763-770, 2002
- 6) Matsukawa T, Sugitani K, Mawatari K, Koriyama Y, Liu Z,

Tanaka M, Kato S. Role of purpurin as a retinol-binding protein in goldfish retina during the early stage of optic nerve regeneration: its priming action on neurite outgrowth. *J Neurosci* 24: 8346-8353, 2004

7) Tanaka M, Murayama D, Nagashima M, Higashi T, Mawatari K, Matsukawa T, Kato S. Purpurin expression in the zebrafish retina during early development and after optic nerve lesion in adults. *Brain Res* 1153: 34-42, 2007

8) Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration

and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 8: 755-765, 2007

9) Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J* 5: 3071-3077, 1991

10) Sugitani K, Matsukawa T, Koriyama Y, Shintani T, Nakamura T, Noda M, Kato S. Upregulation of retinal transglutaminase during the axonal elongation stage of goldfish optic nerve regeneration. *Neuroscience* 142: 1081-1092, 2006