博士論文の要旨及び審査結果の要旨

 氏
 名
 石川 裕也

 学
 位
 博士 (医学)

学位記番号 新大院博(医)第 945 号

学位授与の日付 令和2年3月23日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

博士論文名 Phosphorylation sites of microtubule-associated protein 1B (MAP 1B) are

involved in axon growth and regeneration

(軸索伸長・再生に関与する微小管重合促進タンパク質 MAP 1B のリン酸化部位)

論文審查委員 主查 教授 竹林 浩秀

副査 教授 松本 雅記 副査 講師 渡邊 慶

博士論文の要旨

【背景と目的】神経軸索の伸長・再生時には、先端に成長円錐と呼ばれる運動性に富んだ構造体が形成され、軸索伸長過程において不可欠な役割を果たす。従って、成長円錐機能の分子機構の解明は、神経回路の形成・再編を理解するために必須である。これまで神経生化学教室では、発達期ラット脳由来の成長円錐膜画分の質量分析(リン酸化プロテオミクス解析)を行い、成長円錐に豊富に認められるリン酸化分子群を見出し、そのなかの1つとして微小管重合促進タンパク質 MAP1B が挙がった。この分子は微小管重合を安定化するとされ、そのリン酸化が軸索伸長・再生と関連するとの報告もある。しかし過去の MAP1B リン酸化に関する報告は、リン酸化プロテオミクスで高頻度であった 25 番目および 1201 番目のセリン残基 (S25, S1201)とは別部位であり、上記部位の解析は行われていない。本研究では、これらのリン酸化と軸索伸長・再生との関連についての解析を目的とした。

【方法】申請者らはリン酸化 S25 および S1201 の特異抗体を作成し、その特異性を確認するため、COS 細胞で野生型およびリン酸化不活性化型 MAP1B の cDNA 発現し、ウエスタンブロットを行った。これら抗体と MAP1B の通常抗体を用いて、胎生 15 日目のマウス大脳皮質初代培養神経細胞の免疫蛍光染色、マウス脳の免疫組織化学を行った。胎生 13 日目から生後 15 日目および成体マウス全脳のタンパク質溶解液を抽出し、ウエスタンブロットにて定量した。軸索再生過程との関連を検証するため、C57BL/6N 野生型マウスで 1) 鑷子で圧挫損傷;2) 片側を切離する離断損傷,;3) 切離直後にナイロン糸にて縫合、の坐骨神経損傷モデルを作成した。損傷後一定期間飼育して、灌流固定後に神経採取し、長軸切片を作成、組織学的評価を行った。各リン酸化抗体、MAP1B 抗体と、軸索再生マーカーとして既報の抗 STMN2 (SCG10) 抗体を使用した。モデル1では、再生の指標と提唱されている Regeneration index (Shin et al., 2014.;損傷部〜蛍光シグナル強度が半分以下になるまでの距離)を算出した。モデル2,3では、神経領域内のシグナル強度を比較・定量した。

【結果】申請者らはまず抗体の特異性を確認した。培養神経細胞の免疫染色において、S25 およびS1201

リン酸化はいずれも軸索の遠位側に集積した。成長円錐においては、リン酸化はアクチンよりもチュブリンと強く共局在した。S25 およびS1201 マウス胎仔脳の免疫組織染色では、MAPIB 全体よりもこれらのリン酸化特異抗体では、神経線維が強く染色された。マウス全脳のウエスタンブロットにおいて、これらのリン酸化レベルは胎生期~生後間もない時期で高く、その後は減少傾向がみられた。坐骨神経損傷実験において、モデル1では圧挫損傷を加えた側でリン酸化レベルの上昇が認められ、経時的に遠位側へ蛍光シグナルが拡大した。モデル2では離断した神経の近位側でリン酸化の上昇が認められ、遠位側では変化に乏しかった。モデル3では、縫合した神経でのみ、遠位側でもリン酸化が検出された。これら坐骨神経損傷モデルのリン酸化の変化は、SCG10と類似していた。

【考察と結論】申請者は成長円錐のリン酸化プロテオミクス解析の結果を足掛かりとして、未解明であった MAP1B リン酸化部位に対する特異抗体を使用し、染色性を検討した。発生期および再生時の神経軸索にて S25, S1201 の両者ともリン酸化レベルが高く、発生・再生への関与が示唆された。坐骨神経損傷モデルの染色パターンは、再生中の神経のマーカーとされる SCG10 と同様あり、本研究のリン酸化抗体の再生マーカーとしての有用性が示された。軸索再生と変性の機構を分離する目的で、離断損傷モデルを作成したところ、損傷近位側ではリン酸化が上昇したが、遠位側では変化に乏しく,変性過程よりも再生過程でリン酸化レベルが上昇することを裏付ける結果と考えた。加えて神経離断後の縫合の有無で比較したところ、縫合した神経でのみ遠位側でもリン酸化が検出され、再生時には損傷部を越えて順行性に輸送されることが示唆された。

MAP1B の S25, S1201 リン酸化はこれまで意義が不明であったが、申請者によって軸索成長・再生との関連が明確となった。これらリン酸化部位がどのような分子と相互作用し、神経成長機構に関わっているか、更に検証する必要がある。

審査結果の要旨

神経軸索の伸長・再生時には、先端に成長円錐が形成され、伸長過程において不可欠な役割を果たす。発達期ラット脳由来の成長円錐膜画分の質量分析(リン酸化プロテオミクス解析)を行い、微小管重合促進タンパク質 MAP1B のアミノ酸配列において複数の高頻度リン酸化部位を同定した。この中で、25,1201 番目のセリン残基(S25,S1201)のリン酸化については未解析であった。申請者らは、S25,S1201 部位の特異抗体を作成し、生化学的および免疫組織化学的解析を行った。発生期および再生時の神経軸索にて、S25,S1201 ともにリン酸化レベルが高く、発生・再生過程への関与が示唆された。坐骨神経損傷モデルでは、再生中の神経マーカーとされる STMN2 と同様の染色パターンを示し、本抗体の再生マーカーとしての有用性が示された。軸索再生と変性の機構を分離する目的で離断損傷モデルを作成したところ、損傷近位側ではリン酸化が上昇したが、遠位側では変化に乏しく、変性過程よりも再生過程でリン酸化レベルが上昇することを裏付ける結果と考えられた。さらに神経断離後の縫合の有無で比較したところ、縫合した神経のみで遠位側でもリン酸化検出され、再生時には損傷部を越えて順行性に輸送されることが示唆された。

本研究は、MAP1Bの新たなリン酸化部位(S21, S1201)が軸索成長・再生過程でダイナミックに変化していることを明らかにした点に、学位論文としての価値を認める。