

軸索再生に対する GAP-43 の機能解明：

GAP-43 (Ser96) のリン酸化は軸索再生の分子マーカーとなる

岡田正康

新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞医学専攻

新潟大学脳研究所脳神経外科学分野

(主任：藤井幸彦教授)

A Novel Phosphorylation site of GAP-43 is a Good Molecular Marker
for Axon Regeneration after Nerve Injury

Masayasu Okada

Department of Neurosurgery, Brain research institute, Niigata University

(Director: Prof. Yukihiro Fujii)

要旨

【目的】 中枢神経系が末梢神経系に比べ軸索の伸長能力が低い要因の一つとして 43-kDa growth associated protein (GAP-43)の発現レベルに違いがあるとされる。しかし明確な GAP-43 の機能は不明であった。五十嵐らは、神経成長における成長円錐のタンパク質のリン酸化に着目し、この GAP-43 の 96 番目のセリン (Ser96) にリン酸化が高頻度に生じることを同定した。そこで本研究は、GAP-43 (Ser96) のリン酸化を特異的に認識する抗体 (抗 pSer96 抗体)を作製し、げっ歯類の末梢神経再生モデルの軸索再生に対する GAP-43 (Ser96) のリン酸化の関与を検証した。

【方法】 作製した抗 pSer96 抗体による免疫染色で、げっ歯類の胎仔発生期の軸索伸長と成体の末梢神経再生モデル (坐骨神経圧挫損傷実験)の軸索再生について GAP-43 のリン酸化の有無を検証した。圧挫損傷実験の試料をもとに抗 pSer96 抗体染色によるウェスタンブロットや、抗体を用いない質量分析で生化学的な解析を行った。抗 pSer96 抗体による再生軸索の組織定量評価に Shin J.E.ら(*Neuron* 74, 2012)が使用した「坐骨神経の長軸切片の蛍光像の輝度値解析から軸索伸長を計測する Regeneration Index」を用いた。

【結果】 胎仔大脳皮質由来の初代培養神経細胞の染色や胎仔脳の組織染色の結果、発生期の軸索伸長において GAP-43 (Ser96) はリン酸化され、一方坐骨神経の再生組織において軸索上に抗 pSer96 抗体陽性所見を認め、非損傷神経では反応しないことから、軸索再生においても GAP-43 (Ser96) がリン酸化されることを確認した。この結果の裏付けとして行ったウェスタンブロットでは、抗 pSer96 抗体反応は、損傷後経時的に発現上昇し、さらに質量分析で損傷側 (3 日目)にのみ GAP-43 (Ser96) のリン酸化を確認できたことから、GAP-43 (Ser96) が軸索再生時にリン酸化される部位であると証明できた。抗 pSer96 抗体を用いて再生を組織学的に定量評価すると、感覚神経系の軸索再生マーカーである抗 SCG10 抗体と同様に再生を評価できた。

【結論】 軸索再生時に GAP-43 (Ser96) はリン酸化され、作製した抗 pSer96 抗体は、定量性に優れる再生マーカーである。

キーワード : GAP-43, リン酸化, 末梢神経損傷, 軸索再生, 質量分析

別冊請求先 : 〒951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757 新潟大学脳研究所脳神経外科
岡田正康

Reprint requests to: Masayasu Okada

Department of Neurosurgery, Brain research institute, Niigata University
1-757 Asahimachi - dori, Chuo - ku, Niigata 951 - 8585 Japan

緒言

神経再生研究の最終目標は、脳・脊髄外傷や脳梗塞等の中枢神経損傷後に、神経回路を再び構築し機能を取り戻すことである。ところが、損傷したヒト中枢神経系の軸索は、他の哺乳動物と同様に、末梢神経とは異なり再生しにくい。Ramon y Cajal は、1928 年の論文で損傷した中枢神経系では「すべてが死滅し、何も再生しない」と結論づけた¹⁾。しかし 1980 年代に Aguayo らは末梢神経を中枢神経に移植することで、中枢神経でも軸索再生できること²⁾を示し、中枢神経系でも軸索再生のポテンシャルがあり、適切な環境を与えることで再生できることを発見した。それに基づいて様々な治療が検討され、例えば、中枢神経の損傷後に反応性にコンドロイチン硫酸を合成する酵素を遺伝子改変することで、再生環境を形成しうることが示されている³⁾。

現時点で、解決すべき中枢神経系の問題点の一つに、中枢神経系が末梢神経と比較して軸索の伸長能力が低いことがある。その要因の一つとして考えられている因子に 43-kDa growth associated protein (GAP-43)の発現がある¹⁾。Skene らが、胎生期の中枢神経や損傷した末梢神経において軸索内輸送量が著明に増大するタンパク質として GAP-43 を同定⁴⁾し、脊髄損傷など中枢神経系の損傷後にも GAP-43 の発現上昇が報告され⁵⁾、GAP-43 は神経全般に共通する再生マーカーとして用いられてきた。GAP-43 の強制発現により軸索の sprouting が増える報告⁶⁾⁷⁾もある。一方で、GAP-43 欠損遺伝子改変マウスは生後 2 日で 45%が死亡し、視神経交叉の形成不全が起こるものの、神経成長はほとんど異常がないとの報告⁸⁾⁹⁾もあり、軸索伸長に関する GAP-43 の明確な機能は不明であった。

五十嵐らは成長円錐の機能解析¹⁰⁾¹¹⁾を通じて様々な分子のリン酸化修飾に着目し、成長円錐膜画分のリン酸化プロテオミクス解析 (河寄, 岡田, 五十嵐: 投稿準備中)を行った。その中で GAP-43 分子のリン酸化部位として、高頻度に検出される GAP-43 の 96 番目のセリン (Ser96) と 172 番目のトレオニン (Thr172) を同定した。さらにこれらの同定したリン酸化部位のうち、プロテオミクス解析で同定ペプチド数が高かった GAP-43 (Ser96) のリン酸化を特異的に認識する抗 GAP-43 (phospho-Ser96) 抗体 (抗 pSer96 抗体)の作製に成功した。

そこで本研究は、作製した抗 pSer96 抗体とげっ歯類の末梢神経再生モデルを用いて、*in vivo* の軸索再生に対する GAP-43 (Ser96) のリン酸化の関与を検証した結果、再生マーカーとしての有用性を見出したため報告する。

材料と方法

実験動物

胎仔脳の解析は、ICR 系妊娠マウス (Japan SLC)の胎仔 (E15.5)を用い、末梢神経圧挫損傷実験は、C57BL/6N 系マウス (Charles river laboratories Japan)の 9 週齢以降の成体を用いた。またげっ歯類の GAP-43 のアミノ酸配列で N 末端から 96 番目の Ser を不活性化するため Ala に置換したノックインマウス (S96A ノックインマウス)は、崎

村建司教授 (新潟大学脳研究所)との共同研究の下で作製に至った。

抗 pSer96 抗体作製

GAP-43 の新規リン酸化部位は、げっ歯類の GAP-43 のアミノ酸配列の N 末端側から 96 番目の Ser であると確認しており、このリン酸化部位のリン酸化を特異的に認識するペプチド抗体を作製するため、Ser96 の前後 12 アミノ酸を含む GAP-43 の配列 DAAPATSPKAEE にリン酸化修飾を加えたペプチドを合成し、ウサギに免疫する方法でポリクローナル抗体を作製委託 (Simga-Aldrich Japan)した。

末梢神経損傷実験 (圧挫法)

再生が期待できる軸索断裂 (axonotmesis)を起こす圧挫損傷実験¹²⁾¹³⁾を行った。手順は、C57B6/N 系マウスを、xylazine と ketamine による深い全身麻酔下で、右臀部の皮膚切開した後、大腿部の筋肉の筋鞘を剥離して坐骨神経を露出。ピンセット (INOX 5, FONTAX)を用いて、坐骨神経を 30 秒間圧挫損傷させた。皮膚は 6-0 ナイロン糸で縫合し、麻酔が覚めるまで保温した。皮膚切開と神経の露出までを Sham operation とした。また損傷の程度として、回復能力のある軸索断裂が主体となり、神経断裂 (neurapraxia)が混在しない方法を追求するため、運動機能を Sciatic Functional Index(SFI)を用いて評価した¹⁴⁾¹⁵⁾。SFI は、マウスの後脚の足痕の長さを PL(Print Length)、第一趾の中央から第五趾の中央までの距離を TS (Total spreading)として、experimental side (E)、normal side (N)の最大値を測定し、 $SFI = -51.2 \times (EPL - NPL) / NPL + 118.9 \times (ETS - NTS) / NTS - 7.5$ の公式に代入することで、運動機能を評価。一連の手順に習熟したのち、損傷マウス (N = 3)、Sham (N = 5)を 7 日置きに 35 日間 SFI で評価し、実験の安定性を確認した。SFI は、 0 ± 10 で機能的に正常、 -100 ± 10 で機能的完全損傷を示す¹⁶⁾。本動物実験は、新潟大学動物実験倫理委員会の承認を受け、新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター動物資源開発研究分野(動物実験施設)内で行った (承認番号：26 新大研第 74 号 2)。

神経細胞培養と細胞染色

E15.5 マウス胎仔大脳皮質から調製した神経細胞を、0.05% ポリエチレンイミンでコートしたカバーガラスを敷いた 24 well プレートにまき、10% ウシ胎仔血清入り DMEM High glucose 培地 (WAKO)で 24 時間培養後、2% B-27 supplements と 2mM Glutamax を含む Neurobasal Medium (Gibco)に 3/4 量培地交換した。

細胞染色は、培養開始 48 時間後に 4% PFA/Neurobasal Medium で 15 分固定し、PBS で洗浄後に 0.1% Triton X-100/PBS (PBS-T)で 15 分間の脱膜処理。5% ウシ血清アルブミン/PBS (5%BSA)で 1 時間ブロッキングした後に、一次抗体/5% BSA を 4℃で終夜反応。二次抗体は室温で 1 時間させた。尚、一次抗体の希釈濃度は、表 1 の通り。二次抗体は Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG と Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA)をそれぞれ 1 : 200 の希釈率で使用。

灌流固定と組織染色

イソフルラン吸入麻酔薬により深麻酔下で、マウス胎仔を 4% PFA/0.1M PB (pH7.4) で灌流固定後に脳を摘出し、4% PFA/0.1M PB で後固定を 1 日間行った。一方、坐骨神経は全身を 4% PFA/0.1M PB で灌流固定後に摘出し、4% PFA/0.1M PB で後固定を 1 日間行った。一方いずれの組織も 20% スクロース/0.1M PB に 1 日以上置換。その後 Tissue-Tek OCT compound (SAKURA FINETEC USA, USA) に包埋し、Cryostat (Leica, Germany) で 20 μ m 厚で切片を作製。スライドガラス (SUPERFROST: Matsunami Glass, Japan) に貼り付けた。

胎仔脳の免疫組織化学染色 (DAB 法) は、0.3% 過酸化水素/methanol で脱膜処理し、10% 正常ヤギ血清/PBS-T (10%NGS) で 30 分間ブロッキング。一次抗体/10% NGS の反応は 4°C で終夜行った。二次抗体には Biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を使用し、室温で 2 時間反応。ABC 反応 (VECTASTAIN Elite ABC kit, Vector Laboratories) は室温で 2 時間を行い、DAB (WAKO, Japan) 発色させた。

坐骨神経の蛍光免疫組織染色は、PBS-T で 30 分間の脱膜処理し、0.5% スキムミルク/PBS-T (5% skim milk) で 30 分間ブロッキングした。一次抗体/5% skim milk の反応は 4°C で終夜行い、二次抗体反応は、37°C で 1 日間行った。尚、一次抗体の希釈は表 1 の通り。蛍光二次抗体には Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG と Alexa Fluor 594-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) をそれぞれ 1 : 200 の希釈率で使用。

ウエスタンブロット

ウエスタンブロットのために、坐骨神経組織の損傷部位を中心に前後 5 mm の長さ (計 10 mm) で摘出し、100 μ l のサンプル調製用バッファー (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 4% SDS), タンパク分解酵素阻害剤 (10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml pepstatin A, 0.02 mM p-APMSF and 1 mM EDTA), タンパク質脱リン酸化酵素阻害剤 (1.0 mM フッ化ナトリウム (NaF), 1.15 mM モリブデン酸ナトリウム (Na_2MoO_4), 1.0 mM オルトバナジン酸ナトリウム (Na_3VO_4)) 中で、超音波破碎し、12000 回転で 5 分間遠心分離した上清を試料とした。タンパク質の定量は、DC Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いた。試料は 5% 2-Mercaptoethanol で還元後 (95°C, 5 分間), 10% アクリルアミドゲルで 1 レーン当たり 19 μ g のタンパク質を SDS-PAGE した。泳動後、PVDF 膜に転写 (250 mA, 90 分間) し、0.1% Tween 20/TBS (TBS-T) で希釈した 5% スキムミルク (リン酸化抗体使用時は 5% BSA/TBS-T) でブロッキング後、一次抗体と 4°C で終夜反応させた。二次抗体には、goat anti-rabbit HRP (DAKO, CA, USA) を 2 時間反応させた。ECL PRIME (GE Healthcare, UK) を使用して化学発光を CCD カメラ (Light capture II Cooled CCD Camera System; ATTO, Tokyo, Japan) で検出し、CS Analyzer (ATTO) で画像化した。検出結果を半定量解析するため、画像解析に

Image J (NIH)を用いて損傷神経の検出バンドを ROI で囲み平均輝度値 C を測定し、同時に反応させた対側の非損傷神経の平均輝度値 I を測定し、Relative Protein Level = C/I として比較した。

質量分析

坐骨神経試料をプレキャストゲル (ANY KD ミニプロテイン TGX, BIO-RAD laboratories)を用いて、1 試料当たり 5 レーン (19 µg/レーン)を使用して SDS-PAGE で分離後、CBB R-250 で染色し、ウエスタンブロットの結果とマーカートンパクの位置を参考にして GAP-43 が含まれるゲルの位置でゲルを切り出し、dithiothreitol と iodoacetamide を用いた還元アルキル化後に、trypsin でゲル内消化 (in-gel digestion)した。抽出したペプチド (0.5-0.8 µg)は、nano-flow LC (Eksigent nanoLC 415, AB Sciex)-tandem MS mass spectrometer (TripleTOF 5600+, AB Sciex, Foster, CA, USA)を用いて解析した。

タンパク質の同定は、MASCOT Version 2.2 (Matrix Science, London, UK)を用い、UniProt の mouse proteome database (2015 年 5 月 29 日リリース版)に対して検索する方法で行った。False Discovery Rate (FDR) 5%以下で、MASCOT で算出された「Identity threshold」を超えるスコアでタンパク質の配列にマッチしたペプチドのみを対象とした。タンパク質の増加量を相対的に評価するため、ラベルフリー定量法である Normalized Spectral Abundance Factor (NSAF)を算出した。この方法は、濃度の高いタンパク質ほど、また分子長が長いタンパク質ほど、配列にマッチするペプチド数が多くなるという原理に基づいた方法であり、最初に同定された個々のタンパク質の Spectral Abundance Factor (SAF)である $A_i = (\text{peptide match 数} / \text{タンパク質の長さ (分子量あるいはアミノ酸数)})$ を算出する。タンパク質 k の NSAF は以下の計算式で求められる¹⁷⁾。ここで、n は同定された全タンパク質の数である。

$$NSAF_k = \frac{A_k}{\sum_{i=1}^n A_i}$$

画像解析、軸索再生の定量評価

組織の明視野観察は、Olympus BX63 (Olympus)を使用。蛍光組織染色の観察は、FLUOVIEW FV1200 Biological Laser Scanning Confocal Microscope (Olympus)を使用し、対物レンズ 10×で撮影した。

蛍光免疫染色による再生軸索を定量化する目的で、Shin J.E.ら¹⁸⁾が使用した「坐骨神経の長軸切片を蛍光像で撮影し、損傷部位から損傷部の蛍光輝度値が半分になるまでの距離を算出する Regeneration Index」を用いて評価した。この画像評価の手順は次の通りである。坐骨神経を神経の長軸に沿って FLUOVIEW FV1200 で Z スタック撮影し、ImageJ で Z スタック画像を Z 軸方向に平均強度投影化し、坐骨神経組織内を内接するように画像をトリミングした。さらに坐骨神経の長軸を X 軸 (+は末梢側)、短軸を Y 軸とすると、Y 軸画像の pixel 輝度を平均化して X 軸に投影し、さらにノイ

ズリダクションのため X 軸上の各 pixel ごとに前後 100 pixels の移動平均を算出し、グラフを作製し、このグラフをもとに **Regeneration Index** を計測した。以上を MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA) 上でプログラムを作製し、グラフ化して計測した。

統計解析

坐骨神経損傷後の SFI のデータは、ボンフェローニ・ダン検定で解析し、ウエスタンブロットの半定量解析データは、対応のない t 検定 (両側検定) によって解析し、さらに組織染色による **Regeneration Index** のデータは、対応のある t 検定 (両側検定) で解析した。いずれも検定においても有意水準を 0.05 とした。以上の解析に GraphPad Prism 6 version 6.0h for MAC OS X (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を使用した。尚、いずれの測定データも平均値 \pm SD で示した。

略語

Ser : Serine, Ala : Alanine, PFA : paraformaldehyde, PBS : phosphate buffered saline, PB : phosphate buffer, DAB : diaminobenzidine, HRP : horseradish peroxidase, SDS : sodium dodecyl sulfate, p-APMSF : (para-amidinophenyl) methanesulphonyl fluoride, EDTA : Ethylenediamine tetraacetic acid, PVDF : poly vinylidene di-Fluoride, PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis, TBS : Tris-buffered saline, CBB : Coomassie Brilliant Blue, ROI : Region Of Interest, SD : Standard Deviation,

結果

発生段階の軸索伸長では、GAP-43 (Ser96) がリン酸化される

野生型マウス胎仔 (E15.5) の大脳皮質由来の初代培養神経細胞 (2日間培養) では、抗pSer96抗体反応は、抗GAP-43抗体と同様に軸索上で点状の染色像を認めた (図 1A)。両者は軸索上では共局在した。また同じく野生型マウス胎仔脳 (E15.5) を用いた染色では、大脳白質に存在する伸長中の軸索 (Corticofugal axons もしくは, thalamocortical axons : 図 1B) や海馬采の軸索 (図 1B の fi)) を抗pSer96抗体で描出することができた。これらのことは、発生段階の軸索伸長で GAP-43 (Ser96) がリン酸化されることを意味する。

末梢神経軸索再生モデルの作製 (坐骨神経圧挫損傷実験)

本研究における坐骨神経圧挫損傷実験が、再生の期待できる軸索断裂を安定して再現できているかを確認する目的で、7日毎、計 35 日間に渡り SFI を計測した。図 2A のように 7 日を境に機能回復の傾向がみられ、損傷 21 日後には、sham operation と比較しても統計的な差を認めない程度に運動機能は回復することが分かった。このように本研究における圧挫損傷実験は、すべて SFI を測定し手技の安定性を確認した。

坐骨神経圧挫損傷後の再生を組織学的に評価するため、再生マーカーとして知られ

ている GAP-43 (リン酸化, 非リン酸化を区別しない抗体)と感覚神経系の再生マーカーとして最近報告された Stathmin2 (SCG10)¹⁹⁾の各抗体で坐骨神経圧挫損傷組織を染色した (図 2B, C). 圧挫損傷 1 日後 (Crush Day1)の組織では, 損傷部位を中心に, GAP-43, SCG10 とともに損傷部位 (図 2B, C の▽)を中心に発現上昇し, これらの発現は軸索マーカーである Tuj-1 と共局在したことから再生した軸索であると確認できた. この結果から組織学的にも, 本研究の圧挫損傷が再生モデルとなることを確認できた. また GAP-43 と SCG10 の反応性が損傷遠位部 (図 2B の▼と図 2C の▼)で異なり, また非損傷神経 (Intact)においてもわずかながら GAP-43 の反応を認めた (図 2D, ▼). これは GAP-43 は, 軸索変性の急性期や末梢神経の定常状態にもわずかに存在することを意味し, こうした抗 GAP-43 抗体が軸索変性の急性期や非損傷神経で反応することは既に報告されており¹⁹⁾, 再生軸索とそれ以外の軸索を厳密に区別をつけて軸索再生を定量評価する場合に, 問題となる事項と思われる.

抗 pSer96 抗体により, 組織学的に再生軸索を同定できる

作製した抗 pSer96 抗体が発生段階の伸長軸索だけではなく, 神経の再生軸索にも反応するのかを検討した. 本研究の坐骨神経圧挫損傷が再生神経を含むことは, 図 2 を通して確認したことから, 坐骨神経圧挫損傷組織を抗 pSer96 抗体で染色した. 坐骨神経圧挫損傷 3 日目 (Crush Day3)の組織で, 抗 pSer96 抗体は, 図 3A のように神経軸索のマーカーである Tuj-1 と同じ軸索上で反応した. 軸索再生では GAP-43 (Ser96) がリン酸化されていることを組織学的に確認できた. さらに Crush Day1 から Day3 の抗体反応の経時変化は, 軸索伸長の所見としてとらえることができた (図 3A). また非損傷坐骨神経で抗 pSer96 抗体反応が認められなかったため (図 3B), 坐骨神経の定常状態では, GAP-43 (Ser96) は, リン酸化されていないことが示唆された.

さらに作製した抗 pSer96 抗体が GAP-43 (Ser96) のリン酸化に特異的であることを確認するため, Ser96 のリン酸化部位を Ala で置換し不活性化した S96A ノックインマウスを用いて坐骨神経圧挫損傷実験を行った. S96A ノックインマウスでも野生型と同様に圧挫損傷後に経時的に運動機能が回復することと, 抗 SCG10 抗体で軸索再生を確認している(data not shown)が, 坐骨神経圧挫損傷 3 日目の組織では図 3C のように抗 pSer96 抗体反応は認めなかった. このことは作製した抗 pSer96 抗体が, GAP-43 (Ser96) のリン酸化に特異的に反応する抗体であること意味した.

末梢神経の軸索再生では GAP-43 のリン酸化は Ser96 で生じる

坐骨神経圧挫損傷実験から得られた試料を用いてウェスタンブロット解析を行った. 抗 GAP-43 抗体 (リン酸化, 非リン酸化を区別しない抗体)反応は非損傷, 損傷 1 日目, 3 日目と経時的に上昇し, 同様に抗 pSer96 抗体反応も経時的に上昇することを確認した (図 4A). このウェスタンブロットのバンドの結果を半定量的に解析した(図 4B). Relative GAP-43 level (“Crush の平均輝度値/Intact の平均輝度値”の比)は, 抗 GAP-43 抗体反応で 3.52 倍に上昇し ($p = 0.0015$), 抗 pSer96 抗体反応 (Relative pSer96

level)は2.02倍に上昇した ($p = 0.0108$). 以上のウェスタンブロットの結果から末梢神経圧挫損傷後に GAP-43 自体の発現上昇とともに, GAP-43 (pSer96)にリン酸化が生じ, 損傷1日目よりも3日目でリン酸化レベルが上昇することを確認した.

再生に関わる GAP-43 のリン酸化を, 抗体を用いずに直接的に検出する目的で, 質量分析を行った. ウェスタンブロット用に調製した坐骨神経損傷3日目と非損傷坐骨神経の試料を図5の実験ワークフローでペプチド抽出し, 質量分析を行い ($N = 3$), いずれも FDR 5%以下の信頼性の高い結果を解析に用いた. タンパク質の変化量 (protein abundance)を相対的に評価するラベルフリー定量法 (NSAF)で解析した結果は, 表2の通りとなり, 3例中3例とも GAP-43 は圧挫損傷 (Crush)側で量的に増加 (Protein abundance は増加)した. この結果はウェスタンブロットの結果と一致し, 質量分析によっても圧挫損傷に伴う GAP-43 の増加をとらえることができた. 次に検出された GAP-43 のペプチドについてタンパク修飾の有無を解析ソフト (MASCOT)で確認した. 3例中3例で GAP-43 (Ser96) のリン酸化を検出した. さらに新規に GAP-43 (Ser142) のリン酸化も検出した. その他の GAP-43 のリン酸化部位は検出されなかった. また非損傷神経に GAP-43 のリン酸化修飾は検出されなかった. この質量分析の結果から, 再生軸索において GAP-43 (Ser96) のリン酸化が確実に生じることを確認できた.

抗 pSer96 抗体は, 定量性のある再生マーカーである

我々が作製した抗 pSer96 抗体は, 組織染色において非損傷神経や変性軸索への反応せずに, 損傷神経への特異性が非常に高い (図 3A, B)と言えるため, 抗 pSer96 抗体を用いた軸索再生の定量評価が組織学的に可能であると考えた. Regeneration Index という指標を利用し, 坐骨神経損傷の3日目の抗 pSer96 抗体蛍光免疫染色を行い, その隣接切片を感覚神経系の軸索再生マーカーである抗 SCG10 抗体染色して比較した. 結果は図6の通り, 抗 pSer96 抗体と抗 SCG10 抗体による Regeneration Index には統計学的に有意な差を認めなかった ($p = 0.1020$). 両抗体は同じ分子を見ているわけではなく, また組織染色を見る限りは (図 2C, 図 3A)は, 染色性も異なるため, 同等に評価できるわけではない. しかし抗 pSer96 抗体は, Regeneration Index という指標を用いることで, SCG10 と同様に再生を定量的に評価できる抗体であると言えた.

考察

軸索再生における評価法のうち, 免疫組織化学染色は簡便であるが, 非損傷神経や変性軸索 (ワラー変性)で発現しないことなど, 再生マーカーには高い特異性が求められる. GAP-43 それ自体はその要求を満たすものとされ, 軸索伸長・再生のマーカー抗体とされてきた⁴⁵⁾が, 図 2B, 図 2D の結果の通り, 変性中の軸索や坐骨神経の定常状態にも GAP-43 は低頻度ながら発現を認めるため, GAP-43 に対する抗体は, 厳密な意味での再生に対する特異性には問題があると思われた. そこで, 今回作製した抗 pSer96 抗体は, (1) 図 1A のように軸索上で抗 GAP-43 抗体と同じ局在を示し,

(2) 図 3A のように再生軸索と反応するが、図 3B のように非損傷神経では反応せず、さらに(3) 図 3C のように S96A ノックインマウスの軸索再生には反応しないため GAP-43 (Ser96) のリン酸化状態のみを特異的に認識できる抗体であること、以上の 3 点から組織学的に再生マーカーとして利用できる厳しい条件をクリアしたと考えた。

すでに坐骨神経の再生評価として報告のある Regeneration Index¹⁸⁾を用いて抗体の定量性を検討したところ図 6 の結果となったが、SCG10 の染色性 (図 2C)と pSer96 の染色性 (図 3A)は、同じ分子を見ている訳ではないため染色性が異なり、評価には多少の差があることを理解した上で再生マーカーとして、いずれかを選択し、使用することが望ましい。図 6 の結果から抗 pSer96 抗体は再生軸索マーカーとして今後利用価値が高いと言えた。

今回の軸索再生の検討で利用した SCG10 は、もともと Superior Cervical Ganglion (上頸神経節：感覚神経系)で発見されたものであり、細胞生物学的には微小管の (+) 端側の崩壊活性と $\alpha\beta$ チューブリンヘテロダイマーを捕捉することによる微小管の脱重合を阻害する機能を持つ²⁰⁾。これは本来ならば再生と逆のメカニズムであるが、再生と崩壊は表裏一体でダイナミックに変動するものであるため、再生マーカーになると考えられた²¹⁾。一方、GAP-43 は胎生期の中枢神経や神経損傷後の再生に関連して発現上昇するタンパク質であることが判明しているが、軸索伸長に対する分子機構は明確には解明されていない。GAP-43 の機能に関わる修飾については、N 末端近傍に細胞膜結合性のパルミトイル化部位のシステイン残基を有し²²⁾、protein kinase C (PKC)による Ser41 がリン酸化部位とされていた²³⁾。GAP-43 とリン酸化について哺乳類の *in vivo* での報告は、Ser41 の Ala 置換リン酸化不活性化マウスを用いた発生段階での海馬や神経筋接合部での発芽減少の報告²⁴⁾²⁵⁾があるが、Ser41 と軸索再生との関連性は哺乳動物ではほとんど報告されておらず、ゼブラフィッシュの視神経損傷後の網膜再生において GAP-43 のリン酸化が発現上昇する報告²⁶⁾がある程度であった。そうした中で本研究により、げっ歯類の *in vivo* の軸索再生において、神経軸索の内在性の伸長促進因子である GAP-43 の機能を示すリン酸化部位として、2 つの方法論 (組織学的および、質量分析を含む生化学的な検証)で、軸索再生に関わる GAP-43 (Ser96) のリン酸化を確立できたと考えている。

本研究では、末梢神経再生モデルの組織から調製した試料を用いた質量分析に挑戦し、これによって得られた新規性は次の 3 点である。まず 1 点目に抗体を用いずに、軸索再生に関わるタンパク質のリン酸化を同定したため、今後同じ手法でタンパク質のリン酸化についても検索できること。損傷後の再生神経を用いてリン酸化修飾をプロテオミクス(質量分析)で解析した研究は、今の所見当たらず、この方法論は今後有用であると思われる。2 点目は、軸索再生に関わる GAP-43 (Ser96) のリン酸化を質量分析により直接確認し、非損傷神経ではリン酸化を確認できなかったこと。このことで軸索再生に関わる GAP-43 のリン酸化が間違いなく Ser96 で生じることが確認できた。3 点目として、損傷後 3 日目の坐骨神経圧挫損傷試料を用いた質量分析により、

表2のように新たなリン酸化部位として Ser142 を確認し (バイオインフォマティクスを使った研究, 及び阻害剤を使った結果から, このリン酸化は成長円錐にも存在し, かつ Ser96 と同じプロテインキナーゼでリン酸化が生ずることが確認済みである; 河寄, 五十嵐ら: 論文準備中), さらに既知のリン酸化部位 Ser41 は, 検出されなかったこと. この結果から, これまで Ser41 と *in vivo* の再生との関わりについて報告がなかったことが, 納得できる結果と考えられた. GAP-43 (Ser41) の PKC によるリン酸化が少なくとも末梢神経再生には関与が薄いことを明確に示したと考えている.

本研究の結果から新たに生じた疑問としては, GAP-43 (Ser96) のリン酸化が再生に応じて発現することを確認したが, 実際に GAP-43 (Ser96) のリン酸化が軸索再生の分子機構とどのように関わっているかである. 今後, GAP-43 (Ser96) をリン酸化するキナーゼを用いたり, リン酸化を不活性化した S96A ノックインマウスを用いた末梢神経圧挫損傷実験による検証により明らかにしたい. また新たに判明した GAP-43 (Ser142) のリン酸化と軸索再生の関連についても, すでに GAP-43 (Ser142) のリン酸化に対する特異的抗体の作製に成功しており, 検証を試みたいと考えている.

本研究は, 軸索の再生部位において GAP-43 が Ser96 でリン酸化することを, 組織学的に, かつ質量分析による解析を含め生化学的に証明した. また作製した抗 pSer96 抗体は組織染色において, 再生神経への特異度が非常に高く定量性にも優れていたことから, GAP-43 (Ser96) のリン酸化は軸索再生の分子マーカーとなると結論づける. 既に, 形態学的に, ラットの前肢の末梢神経の端側吻合再生モデルで, 抗 pSer96 抗体が再生神経を認識することを確認していたが²⁷⁾, 本研究で初めて定量化と生化学的な実証ができたと考えている. 今後再生研究において, 本抗 pSer96 抗体は, 軸索再生のマーカー抗体として, 一つの有用なツールになると考える.

結語

軸索再生時に GAP-43 (Ser96) はリン酸化され, そのリン酸化に対する特異的認識抗体は, 再生軸索への特異度の高さから定量性に優れる再生マーカーとなる.

謝辞

本研究遂行にあたり, 研究支援やご指導を賜りました藤井幸彦教授 (脳研究所・脳神経外科学分野), 本研究施行にあたり実際的なご指導を賜りました五十嵐道弘教授 (大学院医歯学総合研究科・分子細胞機能学分野; 超域研究機構「成長円錐のプロテオミクスから脳機構と損傷修復の過程を探る」) に深甚なる謝意を表します. 研究計画や実際の実験の遂行に対し, ご指導やご助言を頂きました新潟大学超域学術院の河寄麻実助教, 玉田篤史准教授, 分子細胞機能学分野の武内恒成前准教授 (現・愛知医科大学医学部教授), 中津史准教授, 野住素広講師, 伊藤泰行助教, 腎研究施設・構造病理学分野の吉田豊前講師, また GAP-43 リン酸化不活化型ノックインマウスを作成頂きました崎村建司教授 (脳研究所・細胞神経生物学分野) に深く感謝を申し上げます.

また本研究は、新潟大学協和会医学研究助成のご支援を賜りましたことをこの場を借りて御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Eric R. Kandel 編他, 金澤一郎, 宮下保司 日本語版監修: カンデル神経科学. 第1版, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, pp1258-2179, 2014.
- 2) Aguayo AJ, David S and Bray GM: Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury. *J Exp Biol* 95:231-240, 1981.
- 3) Takeuchi K, Yoshioka N, Higa Onaga S, Watanabe Y, Miyata S, Wada Y, Kudo C, Okada M, Ohko K, Oda K, Sato T, Yokoyama M, Matsushita N, Nakamura M, Okano H, Sakimura K, Kawano H, Kitagawa H and Igarashi M: Chondroitin sulphate *N*-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. *Nat Commun* 4:2740, doi: 10.1038/ncomms3740, 2013.
- 4) Skene JH and Willard M: Axonally transported proteins associated with axon growth in rabbit central and peripheral nervous systems. *J Cell Biol* 89:96-103, 1981.
- 5) Curtis R, Green D, Lindsay RM and Wilkin GP: Up-regulation of GAP-43 and growth of axons in rat spinal cord after compression injury. *J Neurocytol* 22: 51-64, 1993.
- 6) Caroni P: Intrinsic neuronal determinants that promote axonal sprouting and elongation. *Bioessays* 19: 767-775, 1997.
- 7) Bomze HM, Bulsara KR, Iskandar BJ, Caroni P and Skene JH: Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons. *Nat Neurosci* 4: 38-43, 2001.
- 8) Strittmatter SM, Fankhauser C, Huang PL, Mashimo H and Fishman MC: Neuronal Pathfinding Is Abnormal in Mice Lacking the Neuronal Growth Cone Protein GAP-43. *Cell* 80:445-452, 1995.
- 9) Maier DL, Mani S, Donovan SL, Soppet D, Tessarollo L, McCasland JS and Meiri KF: Disrupted cortical map and absence of cortical barrels in growth-associated protein(GAP)-43 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9397-9402, 1999.
- 10) Nozumi, M., Togano T, Takahashi-Niki K, Lu J, Honda A, Taoka M, Shinkawa T, Koga H, Takeuchi K, Isobe T and Igarashi M: Identification of functional marker proteins in the mammalian growth cone. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17211-17216, 2009.
- 11) Igarashi M: Proteomic identification of the molecular basis of mammalian CNS growth cones. *Neurosci Res* 88: 1-15, 2014.
- 12) Wakatsuki S, Yumoto N, Komatsu K, Araki T and Sehara-Fujisawa A: Roles of meltrin-beta/ADAM19 in progression of Schwann cell differentiation and myelination during sciatic nerve regeneration. *J Bio Chem* 284, 2957-2966, 2009.
- 13) Savastano LE, Laurito SR, Fitt MR, Rasmussen JA, Polo VG and Patterson SI: Sciatic

nerve injury: A simple and subtle model for investigating many aspects of nervous damage and recovery. *J Neurosci Methods* 227:166-180, 2014.

- 14) 武内正典: 末梢神経急性圧迫障害に対する薬物療法の有効性に関する実験的研究. *日手会誌* 10:1038-1047, 1994.
- 15) Navarro X: Functional evaluation of peripheral nerve regeneration and target reinnervation in animal models: a critical overview. *Eur J Neurosci* 30:1-16, 2015.
- 16) Kato N, Matsumoto M, Kogawa M, Atkins G, Findlay DM, Fujikawa T, Oda H and Ogata M: Critical role of p38 MAPK for regeneration of the sciatic nerve following crush injury *in vivo*. *J Neuroinflammation* 10: 1. doi: 10.1186/1742-2094-10-1, 2013.
- 17) Paoletti AC, Parmely TJ, Tomomori-Sato C, Sato S, Zhu D, Conaway RC, Conaway JW, Florens L and Washburn MP: Quantitative proteomics analysis of distinct mammalian mediator complexes identified in single/replicate shot analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18928-18933, 2006.
- 18) Shin JE, Cho Y, Beirowski B, Milbrandt J, Cavalli V and DiAntonio A: Dual leucine zipper kinase is required for retrograde injury signaling and axonal regeneration. *Neuron* 74:1015-1022, 2012.
- 19) Shin JE, Geisler S and DiAntonio A: Dynamic regulation of SCG10 in regenerating axons after injury. *Exp Neurol* 252:1-11, 2014.
- 20) 向後博司, 吉江幹浩, 沓掛真彦, 田村和広: 着床関連因子として同定されたスタスミンとインスリン様増殖因子低親和性結合タンパク質 insulin-like growth factor-binding protein 7 の生殖内分泌学的意義. *YAKUGAKU ZASSHI* 128:565-574, 2008.
- 21) Shalom HS and Yaron A: Marking axonal growth in sensory neurons: SCG10. *Exp Neurol* 254:86-69, 2014.
- 22) Denny JB: Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43. *Curr Neuropharmacol* 4:293-304, 2006.
- 23) Coggins PJ and Zwiers H: Evidence for a single protein kinase C-mediated phosphorylation site in rat brain protein B-50. *J Neurochem* 53:1895-901, 1989.
- 24) Aigner L, Arber S, Kapfhammer J, Laux T, Schneider C, Botteri F, Brenner HR and Caroni P: Overexpression of the neural growth associated protein Gap-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice. *Cell* 83: 269-278, 1995.
- 25) Benowitz LI and Reuttenberg A: GAP-43: an intrinsic determinant of neural development and plasticity. *Trends Neurosci.* 20:84-91, 1997.
- 26) Kaneda M, Nagashima M, Nunome T, Muramatsu T, Yamada Y, Kubo M, Muramoto K, Matsukawa T, Koriyama Y, Sugitani K, Vachkov IH, Mawatari K and Kato S: Changes of phospho-growth-associated protein 43 (phospho-GAP43) in the zebrafish retina after optic nerve injury: a long-term observation. *Neurosci Res.* 6:281-8, 2008.
- 27) Oyamatsu H, Koga D, Igarashi M, Shibata M and Ushiki T: Morphological assessment of early axonal regeneration in end-to-side nerve coaptation models. *J Plast Surg Hand Surg*

46: 299-307, 2012.

図の説明文：

図1 抗pSer96抗体は発生段階の神経軸索に強く局在する

(A)マウス E15.5 の大脳皮質由来の初代培養神経細胞の抗 GAP-43 抗体及び抗 pSer96 抗体の蛍光二重免疫染色像 (培養 2 日目). 抗 pSer96 抗体反応は, 軸索上で抗 GAP-43 抗体と同じ局在を示す. Scale bar = 20 μ m.

(B)マウス胎仔脳 (E15.5)に対する抗 pSer96 抗体免疫染色像 (DAB 染色). 抗 pSer96 抗体は, 胎仔脳における伸長中の軸索 (▷)を描出する. Scale bar = 500 μ m, NCx = Neocortex, IC = internal capsule, fi = fimbria hippocampus, dTh = dorsal thalamus.

(C)B の拡大像, Scale bar = 100 μ m.

図2 坐骨神経圧挫損傷実験による軸索再生

(A)損傷例 (N=3), Sham (N=5)の SFI の比較結果. 運動機能評価となる SFI は 7 日目以降に回復傾向となり, 21 日目には Sham と同等の SFI 値を示す軸索再生モデルとなった. ****: $p < 0.0001$, *: $P < 0.05$.

(B)坐骨神経損傷 1 日後の組織を用いた抗 GAP-43 抗体 (軸索再生マーカー)/抗 Tuj-1 抗体による蛍光二重免疫染色像. ▽: 圧挫損傷部, ▼: GAP-43 陽性軸索の最遠点, Scale bar = 500 μ m.

(C)B の隣接切片を用いた抗 SCG10 抗体 (感覚神経系の再生マーカー)/抗 Tuj-1 抗体による蛍光二重免疫染色像. B と C の結果から, 抗 SCG10 抗体と異なり, 抗 GAP-43 抗体 (リン酸化, 非リン酸化を区別しない抗体)は損傷遠位の変性軸索にも反応した. ▽: 圧挫損傷部, ▼: SCG10 陽性軸索の最遠点, Scale bar = 500 μ m.

(D)非損傷神経(Intact: B の対側の非損傷神経)を用いた抗 GAP-43 抗体/抗 Tuj-1 抗体による蛍光二重免疫染色像. 抗 GAP-43 抗体は非損傷神経にもわずかに反応した. ▼: GAP-43 陽性軸索. Scale bar = 200 μ m.

図3 抗pSer96抗体による再生軸索の組織学的同定

(A)坐骨神経圧挫損傷組織の抗 pSer96 抗体/抗 Tuj-1 抗体蛍光二重免疫染色像. 圧挫損傷 1 日後 (Crush Day1)と圧挫損傷 3 日後 (Crush Day3)の比較. 抗 pSer96 抗体は損傷後の組織に反応し, 経時的に抗 pSer96 抗体陽性軸索が伸長している所見を確認できた. ▽: 圧挫損傷部, ▼: pSer96 陽性軸索の最遠点, Scale bar = 500 μ m.

(B)非損傷坐骨神経 (Intact)組織の抗 pSer96 抗体/抗 Tuj-1 抗体蛍光二重免疫染色像. 抗 pSer96 抗体は反応性を認めない. Scale bar = 200 μ m.

(C)S96A ノックインマウスの坐骨神経圧挫損傷では抗 pSer96 抗体は反応性を認めない. ▽: 圧挫損傷部, Scale bar = 500 μ m.

図4 坐骨神経圧挫損傷試料によるウェスタンブロットの結果

(A)圧挫損傷 1 日後 (Crush Day1)と圧挫損傷 3 日後 (Crush Day3)の抗 GAP-43 抗体と抗 pSer96 抗体によるウェスタンブロットの結果. 非損傷坐骨神経 (Intact)と損傷坐骨神経 (Crush)のレーンバンドはそれぞれ左から順に同じ#ごとに対になっている.

(B)ウェスタンブロットのメンブレン上のバンド輝度値を用いたタンパク量の半定量解析:

Relative protein level (Crush の平均輝度値/Intact の平均輝度値の比)を測定しグラフ化したもの。損傷 3 日目の Relative pSer96 level は、損傷 1 日目よりも上昇した。 **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ 。

図 5 *in vivo* 坐骨神経圧挫損傷試料を用いた GAP-43 の質量分析の方法 (実験ワークフロー)

図 6 Regeneration Index を用いた軸索再生の定量解析結果

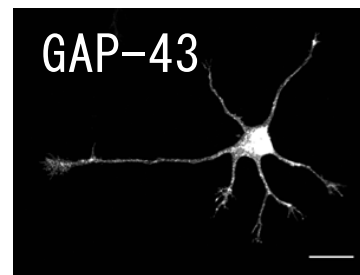
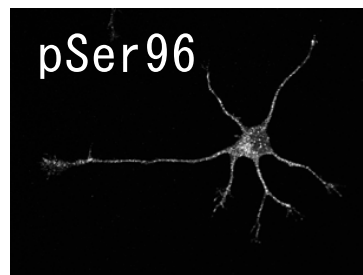
抗 pSer96 抗体と抗 SCG10 (STMN2)抗体の Regeneration Index の比較結果。抗 pSer96 抗体の Regeneration Index は、抗 SCG10 抗体の Regeneration Index と統計学的な有意差はなかった (N = 6; ns = not significant ($p = 0.1020$)). どちらの抗体も再生を定量評価できた。

表 1 一次抗体使用リスト

表 2 Proteomic analysis of GAP-43

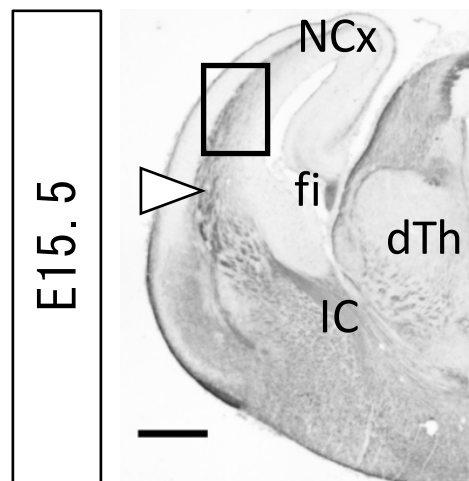
質量分析による GAP-43 とリン酸化修飾検出結果。peptide matches は、FDR<5%以下で、MASCOT で算出された「Identity threshold」を超えるスコアのペプチド数を意味し、Protein abundance は、Normalized Spectral Abundance Factor (NSAF)の算出結果である。圧挫損傷に伴い GAP-43 は量的に増加 (Protein abundance は増加)し、さらに損傷側でのみ GAP-43 pSer96 のリン酸化を検出した。Exp. : Experimental Number.

A



B

pSer96



C

pSer96

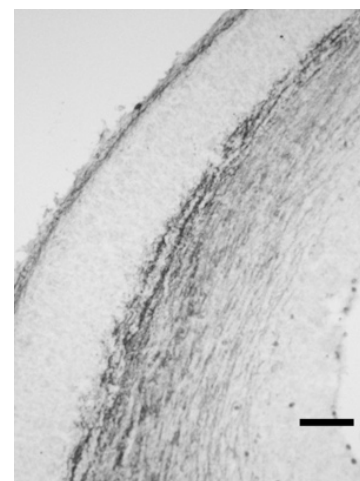
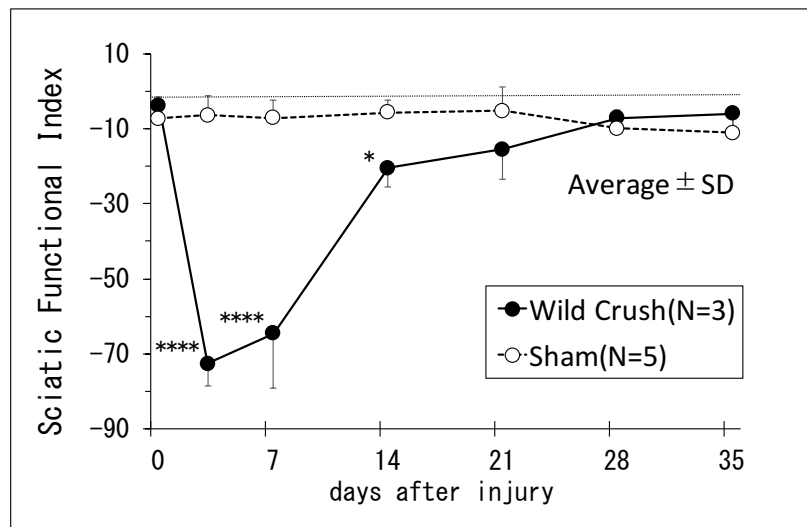
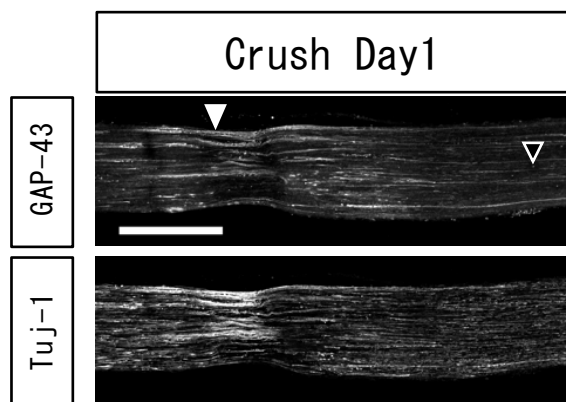


図 1

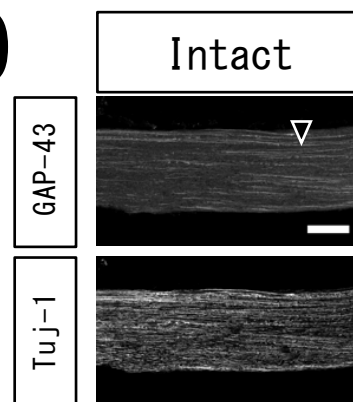
A



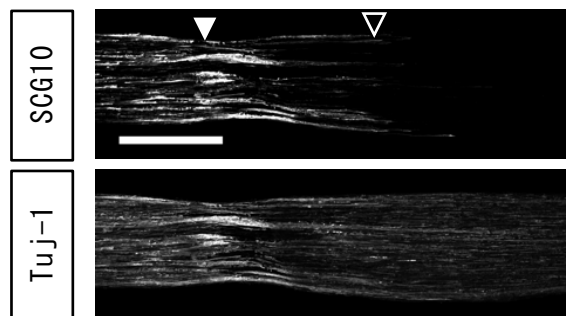
B



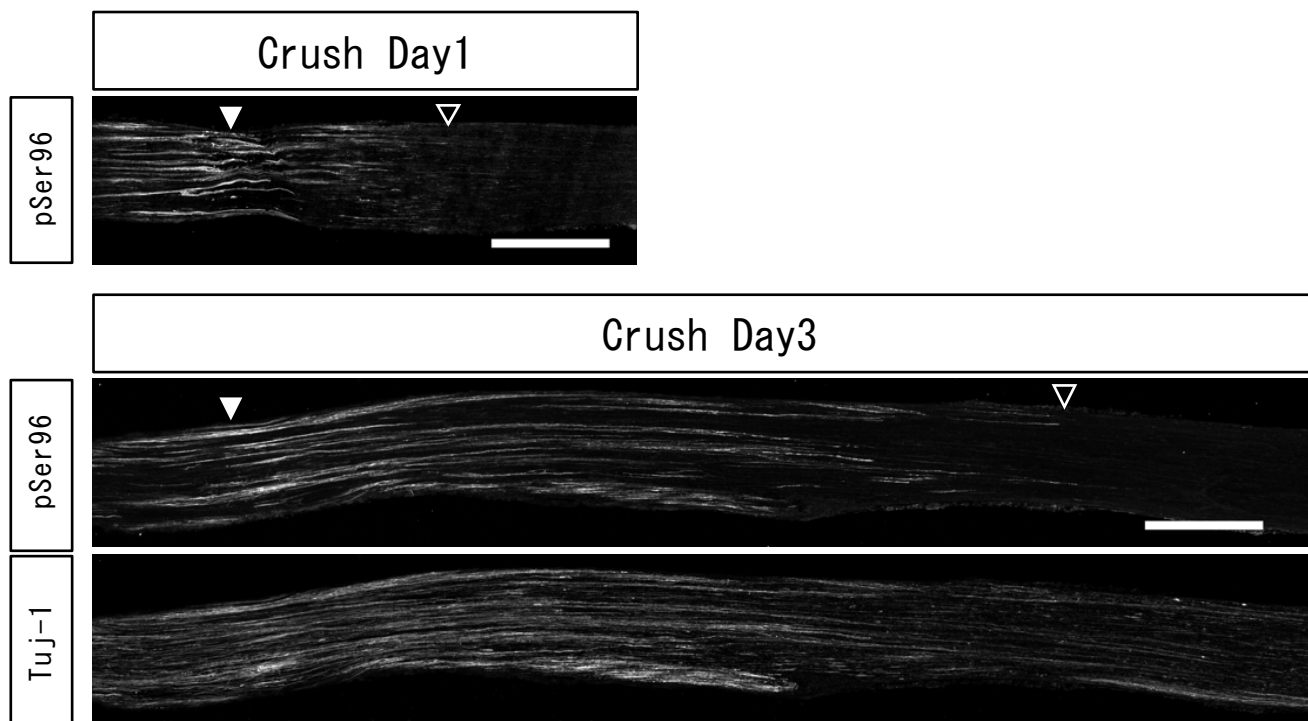
D



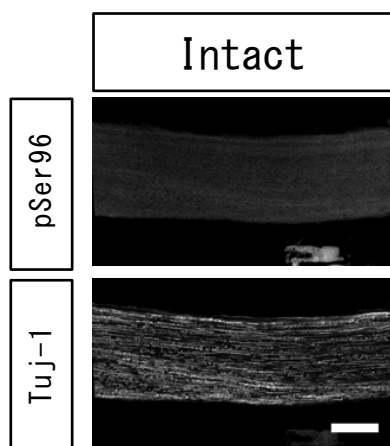
C



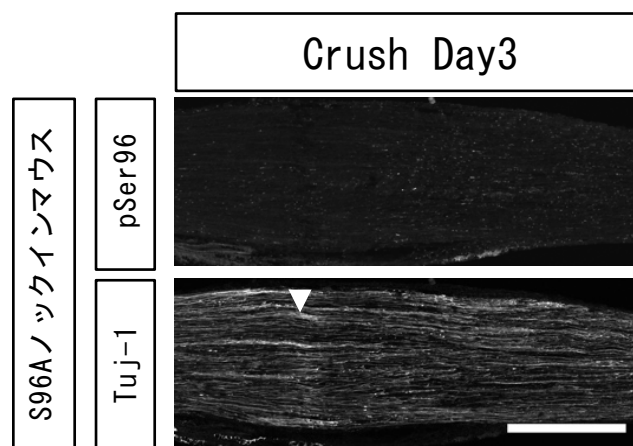
A



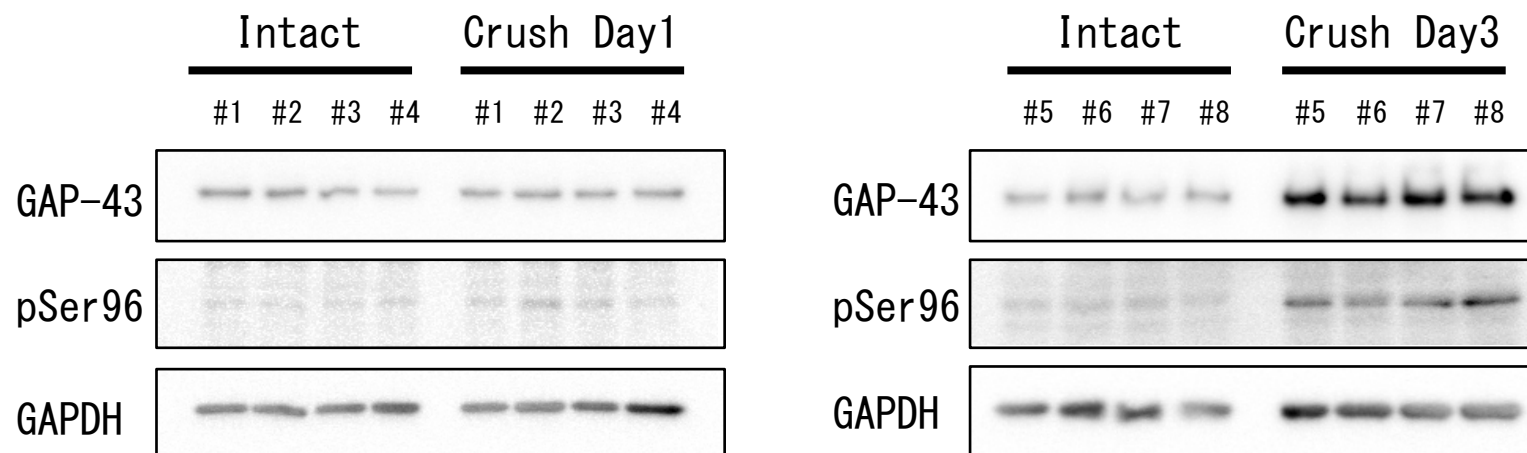
B



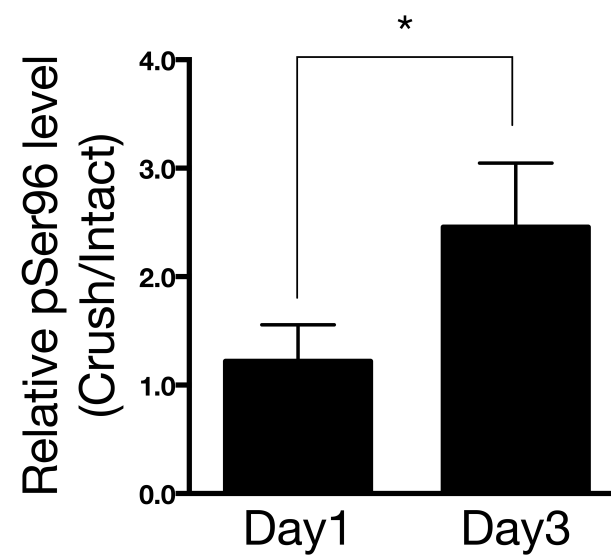
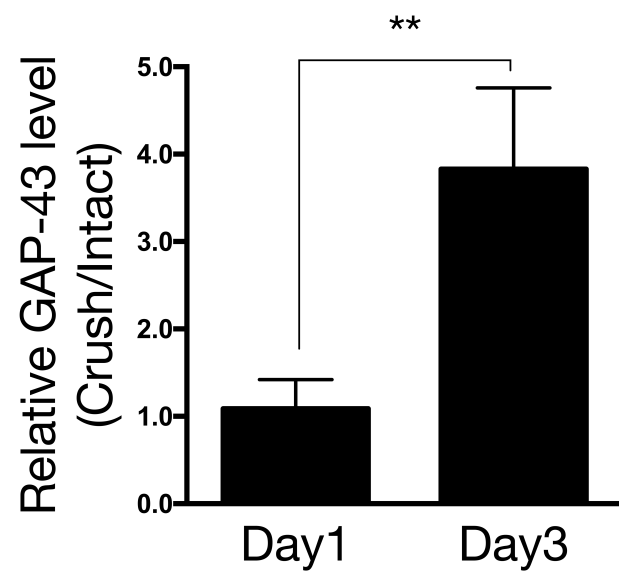
C



A



B



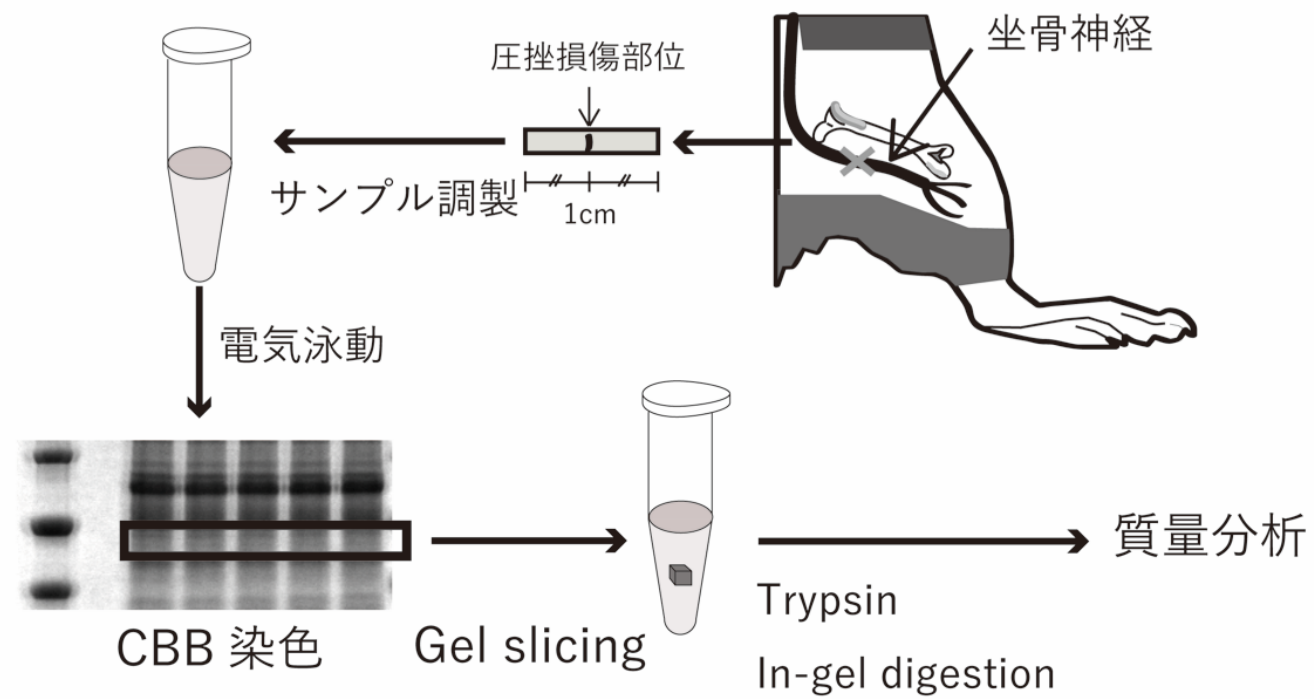


図5

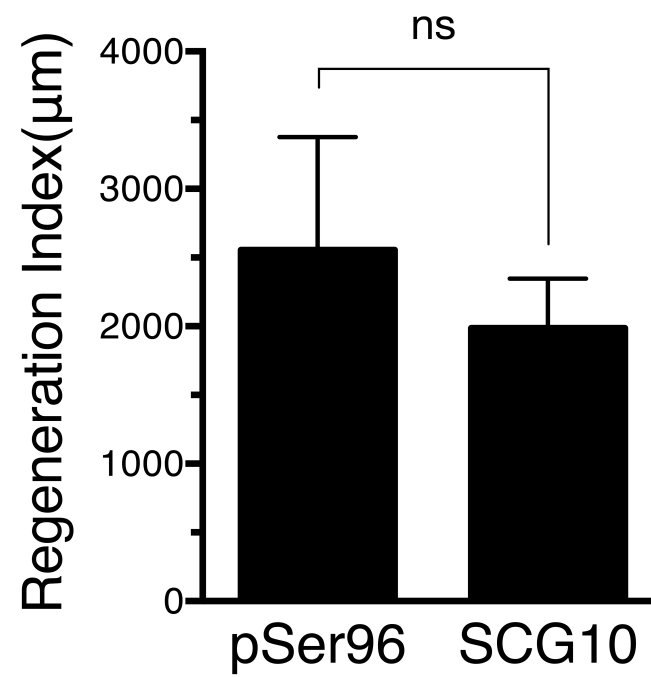


图6

Antibody (Clone number)	Catalog number	Supplier	Species	Dilution/conc (μ g/ml)		
				IHC/ICC		Western blot
				ABC method	IF	
GAP-43	AB5220	Millipore	Rabbit Polyclonal	–	1:1000	1:1000
GAP-43 (7B10)	G9264	Sigma-Aldrich	Mouse Monoclonal IgG2a	–	1:500	–
pSer96	–	Custom-made	Rabbit Polyclonal	0.5	0.45	0.45
SCG10	NBP1-49461	Novus Biologicals	Rabbit Polyclonal	–	1:1000	–
β III-tubulin (Tuj-1)	BAM1195	R&D Systems	Mouse Monoclonal IgG2a	–	1:500	–
GAPDH-HRP (3H12)	M171-7	MBL	Mouse Monoclonal IgG2a κ	–	–	1:2000

abbreviations: conc (concentration), IHC (immunohistochemistry), ICC (Immunocytochemistry), ABC (Avidin-Biotin Complex), IF (immunofluorescence), HRP (horseradish peroxidase)

表1

Sample ID	Crush/Intact	peptide matches	Protein abundance($\times 10^{-3}$)	Phosphorylation site
Exp. 1	Crush Day3	14	2.4142	pSer96 (2 peptides)
	Intact	2	0.3285	Not detected
Exp. 2	Crush Day3	10	1.7181	pSer96 (1 peptide)
	Intact	1	0.1739	Not detected
Exp. 3	Crush Day3	6	2.4757	pSer96 (1 peptide) pSer142 (1 peptide)
	Intact	Not detected	Not detected	Not detected

表2