

培養大脳皮質ニューロン間のシナプス形成機構の解析

指導教官 野々村禎昭教授

東京大学大学院医学系研究科

平成3年4月入学

第3種博士課程

第2基礎医学専攻

村 本 和 世

①

# 培養大脳皮質ニューロン間のシナプス 形成機構の解析

指導教官 野々村禎昭教授

東京大学大学院医学系研究科

平成3年4月入学

第3種博士課程

第2基礎医学専攻

学生証番号 17326

村本和世

## 目次

はじめに	4
第1章 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 多点同時観測システムを用いた培養ラット大脳皮質ニューロン間のシナプス形成解析系の開発	
1-1. 序論	
1-1-1. シナプス形成の研究概略	5
1-1-2. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 多点同時観測システムとシナプス形成の解析	6
1-2. 材料及び方法	
1-2-1. ラット大脳皮質細胞の培養	7
1-2-2. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動態のモニタリング	8
1-2-3. 免疫細胞染色	9
1-2-4. 電子顕微鏡によるシナプスの観察と定量	10
1-3. 実験結果	
1-3-1. ラット大脳皮質細胞の培養状態	11
1-3-2. ニューロン間で同期した自発的細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ oscillationの出現と発達	12
1-3-3. 電子顕微鏡による培養ニューロン間に形成されたシナプスの観察と定量及び $\text{Ca}^{2+}$ oscillationとの相関	13
1-4. 考察	
1-4-1. ラット培養大脳皮質細胞	14
1-4-2. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 多点同時観測システムを用いた培養ラット大脳皮質ニューロン間のシナプス形成の解析	19
1-5. 第1章まとめ	23
1-6. 第1章の図	24



第2章 シナプス形成に影響を及ぼす薬剤のスクリーニングとタンパク質リン酸化酵素阻害剤K-252bによる培養ラット大脳皮質ニューロン間シナプス形成の阻害

1-1. 序論	34
2-2. 材料と方法	35
2-3. 結果	36
2-4. 考察	
2-4-1. タンパク質リン酸化酵素阻害剤K-252bによるシナプス形成の抑制	37
2-4-2. 膜を透過しないタンパク質リン酸化酵素阻害剤K-252bの標的分子	39
2-5. 第2章まとめ	43
2-6. 第2章の図	44

第3章 培養ラット大脳皮質細胞に存在するタンパク質細胞外ドメインのリン酸化活性とリン酸化基質タンパク質としての微小管関連タンパク質MAP1Bの同定

3-1. 序論	53
3-2. 材料と方法	
3-2-1. 培養ラット大脳皮質細胞でのエクト・プロテインキナーゼ活性の測定	54
3-2-2. リン酸化によって <sup>32</sup> Pの取り込まれるバンドの同定	56
3-2-3. エクト・プロテインキナーゼの基質としての微小管関連タンパク質MAP1Bの解析	57
A. 細胞表面のみの染色法	57
B. 細胞内まで抗体を浸透させて染色する方法	58
3-3. 実験結果	
3-3-1. ラット大脳皮質培養細胞に存在するエクト・プロテインキナーゼ活性	58



3-3-2. 細胞外リン酸化反応の基質としての微小管関連タンパク質MAP1B	59
3-3-3. MAP1Bが細胞外ドメインをもっている可能性	59
3-4. 考察	
3-4-1. 細胞外タンパク質をリン酸化する酵素活性の存在	61
3-4-2. エクト・プロテインキナーゼの基質としてのMAP1Bの同定	63
3-4-3. MAP1Bの膜タンパク質としての可能性・およびシナプス形成過程への 関与の可能性についての検討	64
3-5. 第3章まとめ	69
3-6. 第3章の図	71
おわりに	85
引用文献	86
謝辞	98

## はじめに

ニューロン間を結ぶシナプスがどのようにして形成されるかという問題は、神経系の発生における最終分化として複雑な回路が形成される過程、記憶や学習といった脳の高次機能発現に関わるシナプス結合の可塑的变化などの面から重要である。しかしシナプス形成のメカニズムについてはほとんど判明していないのが現状である。私は、本研究の中でこれまでシナプス形成のメカニズムの解明に取り組み、一定の成果を得た。それはスタートから次へ次へと展開していき、一連の筋道の下、成果に至ったものである。

その成果とは、第1にはシナプス形成機構の解析が困難であった背景には、シナプス形成のよい解析系がなかったという問題がある。そのためまずシナプス形成の解析系の開発に着手し、ラット大脳皮質細胞の安定した培養系を確立し、本文で詳述するように、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillation現象を指標としたシナプス形成の解析系を見出した。

第2には、この解析系を利用してシナプス形成を阻害する薬物K-252b（膜非透過性のプロテインキナーゼ阻害剤）をスクリーニングの結果見出した。薬理的な阻害剤の存在は、分子機構を解析する上で非常に有用なツールとなる。

第3には、このK-252bの標的分子の検索である。神経細胞の膜表面に、タンパク質の細胞外ドメインをリン酸化するエクトプロテインキナーゼが存在することが報告されているが、阻害剤の性質からターゲットはこの分子であると考えた。そして本研究で用いた細胞系に、このようなリン酸化酵素活性が存在し、しかもK-252bにより阻害されることを明らかにした。さらにこのリン酸化基質タンパク質に着目し、そのうちの1つの同定に成功した。そのタンパク質が、微小管結合蛋白質のMAP1Bであった。以上の研究の流れから、MAP1Bは従来の常識を覆し、膜タンパク質である可能性が示唆されたが、本研究の結果は、これを支持するものであった。

本研究は、一連のつながりをもって展開してきたものであるが、以上のように大きく3つの成果に分けられると考えた。そこで本文では、3章に分割して構成した。各章で順に各問題について詳細に述べていく



# 第1章 細胞内Ca<sup>2+</sup>多点同時観測システムを用いた培養ラット 大脳皮質ニューロン間のシナプス形成解析系の開発

## 1-1. 序論

### 1-1-1. シナプス形成の研究概略

記憶や学習といった脳の高次機能発現は、多数のニューロン間にシナプス結合が形成され、お互いに連絡をとることを通して実現される。脳のニューロン間のシナプスは、発生過程の特定の期間中に軸索や樹状突起が伸展して、その大部分が形成される。従来、哺乳動物脳では、発生の一定期間にシナプス形成は終了してしまい、成熟して後は障害時あるいはシナプスの脱落・変性の際の再生<sup>1)</sup>などを除いて、新しいシナプスが形成されることはないとする考え方が支配的であった。これはシナプス形成の変化を実験的に証明することが困難で、あまり研究されなかったためである。記憶の基礎と考えられている、シナプス伝達の長期増強 (long-term potentiation: LTP) に代表されるような伝達効率の可塑的变化が、最終的には新しいシナプスの形成を含むシナプスの形態的变化によって固定されるとする考え方は、従来より一部で主張され研究されてきた<sup>2,3,4)</sup>が、因果関係の証明が難しく、大勢には至らなかった。近年になって、成熟脳においてもシナプス結合が記憶や学習行動の成立時や、外界の環境刺激によって大きく変化しうることを示唆する証拠がいくつかでてきた<sup>5,6,7)</sup>。また、黒田 (1989) は、「成熟脳でもシナプス結合のダイナミックな変化が起こり、記憶回路外シナプスの選択的除去と回路内の新しい発芽によるシナプス結合数の増加が長期記憶のメカニズムである」とする「トレーシング回路」モデルを提唱している<sup>8)</sup>。このような証拠、あるいはモデルからも、シナプス形成過程の解析は、脳の発生物学的側面からだけでなく、記憶や学習といった神経生物学的側面からも非常に興味深いと思われる。しかし、シナプス形成過程、特に分子レベルでの解析は、突起の伸展など一部を除いてまだほとんど進展していないといってよい。

シナプス形成過程の解析が困難であるのは、主に2つの理由からであったと思



われる。1つは、シナプスの変化を連続的に観察することが生体内では非常に困難であること、2つ目は、特に分子レベルでのメカニズムの解析に有用な、薬物投与のような薬理学的解析が、やはり生体を用いた場合には、複雑になってしまいうことである。これらの問題点を克服するためには、外部からの実験操作や生化学的解析がより容易な培養ニューロン系は、非常に有用であると考えられる。しかし、単純な系として研究上有利であるはずの培養ニューロン系も、ことシナプス形成機構の研究・解析に関しては、ほとんど応用されなかったといつてよい。脳のニューロンを安定して、個々に単離した状態で長期に培養することが難しかったこともあるが、多くはシナプス形成を解析する方法論的な問題と思われる。

従来シナプスが形成されたことの証明には、電気生理学的な手法がとられてきた。しかし、こういった方法では、比較的少数のニューロン間でシナプスが形成されているか否かという点では絶対的な証拠を呈示するが、培養系のような多数のニューロン間で量的にどのくらいのシナプスができていくかということに関しては、適用が非常に困難になる。例えば、何らかの薬物のシナプス形成に対する作用を見ようというような場合に、シナプスがどれくらいできたかを量的に評価できなければ、どれくらいの効果があるか定量的に判定できないことになる。すなわち、これまでは形成されたシナプスを機能的に、あるいは形態的に定量性をもって観察することが難しかったため、実験材料として便利な培養系といえども、比較的観察の容易な突起伸展のようなシナプス形成の一過程に限定されたものにならざるをえなかった。

#### 1-1-2. 細胞内 $Ca^{2+}$ 多点同時観察システムとシナプス形成の解析

前節で述べたように、シナプス形成を量的に評価することが困難であった中、一歩踏み出すような進歩がもたらされた。1986年工藤と小倉は<sup>9)</sup>、 $Ca^{2+}$ 蛍光指示薬fura-2<sup>10)</sup>を用いた細胞内 $Ca^{2+}$ 動態の多点同時観察システムを開発した。次いで小倉らは<sup>11)</sup>、この方法を用いラット培養海馬ニューロンを観察したところ、多数のニューロン間で同期した細胞内 $Ca^{2+}$ の自発的なoscillation現象が生じていることを見いだした。この自発的な細胞内 $Ca^{2+}$  oscilationをさらに詳しく解析したところ、細胞内の $Ca^{2+}$ 上昇はニューロンが自発的に発火のバーストを生じたときに引き起

こされ、これが複数のニューロン間で同期していること、またフグ毒テトロドトキシン (TTX) やグルタミン酸受容体アンタゴニストであるAPV (2-amino-5-phosphonovaleric acid) の添加により抑制されることなどが判明した<sup>11)</sup>。これらのことにより、培養海馬ニューロン間で、グルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプスが多数形成され、自発的なニューロンの発火に伴って細胞内の $Ca^{2+}$ が上昇し、これがシナプスを介して伝播していることが示唆されたのである<sup>11)</sup>。本研究の初めに当たり、この手法を用いれば培養ニューロン間がシナプス結合により機能的に連絡しているかどうかを多数のニューロン間で同時に解析でき、培養系内で生じたシナプスを量的にみることが可能ではないかと考えた。そこで、この方法をラット大脳皮質培養ニューロンに応用して、シナプス形成の測定系の開発を試みた。

## 1-2. 材料及び方法

### 1-2-1. ラット大脳皮質細胞の培養

ラット大脳皮質細胞の培養は、既報<sup>12,13)</sup>のように、BankerとCowanの方法<sup>14)</sup>を若干改変して行った。大脳皮質は胎齢18日目のWistarラットから切り出した。切り出された大脳皮質組織片を細かい小片にした後15ml容の遠沈管に入れ、0.02% パパイン (Worthington Biochemical社)、0.02%牛血清アルブミン (Armour Pharmaceutical社)、0.02%D-システイン (和光純薬)、0.5%グルコース (Nacalai tesque社) を含む $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  不含リン酸バッファー (CMF-PBS) 5ml 中にて37℃、15分間静置した。この操作をもう一度繰り返した後、沈殿によって酵素液上清を除き、組織小片をメディウム中に移した。このメディウムは、ビルビン酸ナトリウム (Sigma社) 1mM、ペニシリン G (明治製菓) 50単位/ml、硫酸ストレプトマイシン (明治製菓) 25 $\mu$ g/ml と  $NaHCO_3$  (Nakalai) 1.2mg/ml を含む Dulbecco 改変 Eagle 培地 (DMEM: Gibco社) に、牛新生仔血清 (NBCS: Nakashibetsu Serum Center) と加熱不活化した馬血清 (Gibco社) をそれぞれ最終濃度5% (v/v) となるように加えたものを用いた。この組織懸濁液を、バスツー



ルピペット及び先端にピペッター用のエッペンドルフ・プラスチック・チップを付けた10mlピペットに数回通すことにより、機械的に単離細胞に解離させ、その後滅菌したレンズペーパーフィルターを通した。この細胞懸濁液を1000r.p.m.で5分間、2度遠心した。細胞数を血算板にて計数して、適当な量のメディウムに再懸濁し、poly-ethylenimine (Sigma社) をコーティングしたプレートに細胞をまいた。用いたプレートは、組織学的な観察用には8穴のLabTekチャンバー・プレート (Nunc社) に $5.0 \times 10^5$  cells/wellの細胞密度で、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ のモニタリングによるシナプス形成解析用にはコーティングしたカバーガラスを底に貼り付けた8穴のflexipermプレート (Heraeus社) に $1.0 \times 10^6$  cells/wellの細胞密度でプレATINGを行った。両プレートとも1ウェルの大きさは、ほぼ100mm<sup>2</sup>で、培養の培地液量は各ウェル0.5mlであった。培養細胞は7%CO<sub>2</sub>濃度のCO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養維持した。メディウム交換は3日毎に液量の半量ずつ行った。

#### 1-2-2. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動態のモニタリング

細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の変動の観察は、工藤らの方法に準じて行った<sup>9,11,15)</sup>。fura-2AM (Molecular Probe社) は、dimethyl-sulfoxide (DMSO: Sigma社) に1mg/mlで溶解保存液とした。このfura-2AM液を、培養している細胞の培地中に5 $\mu$ l/mlで加え、30分から1時間37°C中にてインキュベートした。この後細胞を基礎塩類溶液 (basal salt solution: BSS/組成: NaCl 130mM, KCl 5.4mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8mM, glucose 5.5mM, HEPES 20mM, NaOHにてpH7.4に調整) で数回洗い、同じBSS液に置換して細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ モニター装置 (図1) で、観察時の温度を37°Cに保って、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の変化の様子を観察した。観察は主に培養7日目から9日目に行ったが、培養日数による変化の様子を見るためにその他の日にも行った。観察の記録はすべて装置に付属したビデオテープレコーダーで録画しておき、興味あるサンプルの場合には、コンピュータシステム (FC-300: 三菱化成またはArgus 100: 浜松ホトニクス) で画像解析などさらなる解析を加えた。

薬物の短期間の効果を観察する場合には、灌流装置を用いて行った。BSS液で灌流を行いながら細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ モニター装置で細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の変化の様子を観察し、安定した細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationが生じていることを確認した後、灌流液を1 $\mu$ Mテ



トロドトキシシン (TTX: Sigma社)、50  $\mu$ M D-APV (Sigma社) などを含むBSS液に置換して、細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationに対する作用を観察した。観察後、灌流液を元に戻し、細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationが可逆的に回復するかどうかを確認した。

### 1-2-3. 免疫細胞染色

培養大脳皮質細胞の状態や特性、細胞種の分布などを示すために、色々な抗体を用いて免疫組織化学的に細胞の染色を行った。用いた抗体及び使用時の希釈倍率などは表1に示した。

培養7日目から14日目の培養細胞をPBSにて3回洗い、4%パラホルムアルデヒド (Sigma社: in PBS) で室温で30分固定を行った。固定後細胞をPBSで洗い、抗体を細胞内によく透過させるように、90%メタノール・5%酢酸液中、-20℃で5分間処理した<sup>16)</sup>。その後2%牛血清アルブミン (in PBS) で30分間、抗体の非特異結合を除くため (Blocking) にインキュベートした。表1にあげた一次抗体は表中の希釈率になるように、Blocking液で希釈した。一次抗体をいれて、1時間から2時間37℃に置き、PBSにて洗った後、表1にあげた二次抗体の反応を行った。一次抗体を単独で用いた場合には抗体の種類に対応するFITC標識の二次抗体を、二重染色を行う際には一方にビオチン標識の二次抗体を用いた。二重染色の場合には、さらに二次抗体にビオチン標識抗体を用いたものについて、TexasRed標識のアビジンを反応させ、可視化させた。PermaFluor (Mounting Medium: Lipshaw Immunon社) 液でカバーガラスをマウントし、Axioskop (Zeiss社) 蛍光顕微鏡を用いて観察、写真撮影を行った。

用いた抗体	入手元	一次or二次	抗体種類	希釈倍率
抗MAP2抗体	Boeringer社	一次抗体	マウスモノクロ	x350
抗ニューロフィラメント抗体	Bio-Ro社	一次抗体	ウサギポリクロ	x250
抗GFAP抗体	Dako社	一次抗体	ウサギポリクロ	x400
ビオチン化抗マウスIgG抗体	Amarsham社	二次抗体	ロバポリクロ	x500
ビオチン化抗ウサギIgG抗体	Amarsham社	二次抗体	ヒツジポリクロ	x500
FITC-抗マウスIgG抗体	Cappel社	二次抗体	ウサギポリクロ	x500
FITC-抗ウサギIgG抗体	Cappel社	二次抗体	ヤギポリクロ	x500
TexasRed-ストレプトアビジン	Amarsham社	三次	x	x500

表 1. 免疫細胞染色に用いた抗体の一覧

#### 1-2-4. 電子顕微鏡によるシナプスの観察と定量

培養ニューロン間にできたシナプスを電子顕微鏡で観察するために、培養の3、7、14、21日目にそれぞれ細胞を固定し、電顕用サンプルとした<sup>17)</sup>。培養細胞は、2%パラホルムアルデヒド、2%グルタルアルデヒド（Nacalai tesque社：in 0.1Mリン酸緩衝液）中、室温で2時間固定した。固定後、PBSで数回洗い、培養ウェルの上に層状に接着している細胞層をスパーテルなどで引きはがした。この細胞層を丸めてエッペンドルフのサンプルチューブ（1.5ml容）に移し、遠心によってチューブの底に落とした。培養ウェル1つ当たり1サンプルとして、この細胞ペレットを作成した。細胞ペレットをさらに1%オスミウム酸（osmium tetroxide：in 0.1Mリン酸緩衝液）で後固定し、アルコール系列で脱水操作をしてからプラスチック合成樹脂（Quetol 812）で包埋した。ミクロトーム（MRC MT 6000）で超薄切片を作成し、グリッドにマウントして1標本とし、ウラニル酢酸とクエン酸鉛で染色後、電子顕微鏡（JOEL 1200 EX II）でシナプスの観察を行った。シナプス数の計数をする場合は、各標本からランダムに最低20枚以上の電顕写真（倍率：x20,000）を撮影し、各写真中に写っているシナプスをマイクロフィルムビューアー（Canon Panorama Reader 360T）のスクリーンでx30,000倍に拡大して計数を行った。シナプスの形態的同定は、以下の3点全てそろったものをもってシナプスとした<sup>17)</sup>。すなわち、終末部にシナプス小胞が存在していること、



終末側とポスト側の間に適当な間隙・シナプス間隙が存在していること、そして synaptic denseが見られることの3つである。

### 1-3. 実験結果

#### 1-3-1. ラット大脳皮質細胞の培養状態

ラット培養大脳皮質細胞は、培養3日目（3 days in vitro：以下DIVと略記）頃から突起を伸ばし、7DIVには突起の複雑なネットワークを形成するようになった（図2A）。この様子も含めて、培養大脳皮質細胞の様子を図2に示した。位相差顕微鏡により観察すると、7DIVでは薄い扁平な細胞層の上に、球形の細胞が多数のっており、これらの細胞から突起がのび、ネットワークを形成していた（図2A）。この球形の細胞は、ニューロンの特異的なマーカー分子であるMAP2ならびにニューロフィラメントに対する抗体により染色された（図2B、G）。この時、球形の細胞体のみならず、抗体で染色することにより、細胞体から伸びる突起部分も染色され、ニューロン間で形成される複雑なネットワークがより明白となった。このネットワークは14DIVでは、さらに多数の突起により、複雑になったように観察された（図2B、E、G）。

ニューロン以外に存在するであろうグリア細胞の様子を確かめるために、グリア細胞のうちアストロサイトに特異的なマーカー分子である、Glial fibrillary acidic protein（GFAP）に対する抗体で染色を行った。7DIVでは、少なくともGFAP陽性のアストロサイトに関する限りは、まだ数も少なく、細胞の状態も棒状で突起の分枝も少なくまだ未成熟という段階であった（図2C）。ところが、14DIVになると、GFAP陽性細胞の数は著しく増加し、しかも7DIVでは見られなかった様な、突起の数の多い成熟したタイプと思われるものが出現し始めた（図2F）。オリゴデンドロサイトやミクログリアなど他のグリア細胞については、特に検討を加えていない。



### 1-3-2. ニューロン間で同期した自発的細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ oscillationの出現と発達

ラット培養大脳皮質細胞に蛍光性 $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬fura-2を取り込ませ、工藤らの開発した細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度多点同時モニター装置<sup>9)</sup>を用いてニューロンの細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の動態の様子を観察した。fura-2を取り込ませた細胞の蛍光像を図3に示した。背景のぼんやりとした薄い蛍光の上に、球形の強い蛍光を示す細胞が多数のっており、これらの細胞から伸びる突起もfura-2による蛍光で確かめられた(図3)。この球形の細胞は大部分が、後述するような同期した自発的細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationを示し、また高カリウム刺激やグルタミン酸刺激により迅速な細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の上昇を示したので、ニューロンと考えられた(データ省略)。

3DIV、ニューロンの細胞内では、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度はほとんど変動していなかった。ベースライン以上にレベルの変動を示すものもあったが、他の細胞との間に同期性はみられなかった(図4)。ところが、5DIVくらいから何の刺激もなしに、自発的な細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の変動が複数のニューロン間で同期して観察された(平均のfrequency(以下Freq.と略記):  $(0.8 \pm 0.7) \times 10^{-2}$  Hz (平均±標準誤差),  $n=7$ )。7DIV頃には、視野内のほとんどのニューロンに、同期した自発性細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationが、Freq.を増して出現した(平均Freq.:  $(4.1 \pm 0.2) \times 10^{-2}$  Hz,  $n=77$ )。この時、一視野中の50個程度のニューロンについて見てみると、90%以上のニューロンが、同期した自発的細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationを示していた。さらに培養日数が進むと、ニューロン間で同期して生じる自発的な細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationは、周期性・定期性を増し、Freq.を大きくして観察された(図4)。この自発的な $\text{Ca}^{2+}$  oscillationは、ナトリウムチャンネルブロッカーであるフグ毒テトロドトキシンや、中枢神経系の主要な神経伝達物質であるグルタミン酸に対する受容体のうち、NMDA型受容体のアンタゴニストである2-amino-5-phosphono valeric acid (APV)を投与することにより、可逆的に阻害された(図5)。

### 1-3-3. 電子顕微鏡による培養ニューロン間に形成されたシナプスの観察と 定量及び $\text{Ca}^{2+}$ oscillationとの相関

複数のニューロン間での同期性は、すなわちお互いに機能的な連絡（シナプス）を形成していることを示している。そこで、培養ニューロン間で実際に形態的に認められるシナプスが形成されているのか、いるとすればどのような時間経過でシナプス形成が起こっているのか、これらの問題を明白にするために、電子顕微鏡による観察を行った。図6には、電子顕微鏡による観察で存在が確認されたシナプスの電顕写真を示した。図6は7DIVに認められたシナプスの典型例を示している。7DIVにはかなり多数のシナプスが認められた。このようなシナプスが、量的にどのような時間経過で形成されてくるのかを培養3、7、14、21日目にそれぞれサンプルを調整し、電子顕微鏡による計数で観察し、形成シナプス数を定量化した（図7）。図7は、その観察の結果を、 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationのFreq.の培養日数に対する変化の様子と一緒に示している。3DIVには形態的にほとんどシナプスは認めらず、培養日数が経過するに従い、1ニューロン当たりのシナプス数で換算するとシナプス数は増加していった（図7黒丸点線）。この増加は14DIVまでは直線的に増加していたが、それ以降は増加率は低下した。この実際のシナプス数の増加とよく対応するように、 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationのFreq.もほぼ類似した上昇を示した（図7白丸実線）。

培養系内での発生段階において、両者がよい一致を示し、 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationのFreq.が、実際に形成されたシナプスの数をよく反映しているように考えられたので、培養ニューロンの細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 変動を観察してその $\text{Ca}^{2+}$  oscillationのFreq.を求め、その後全く同一の細胞を電顕用に固定して、電顕観察により培養系内できたシナプスを定量的に調べた。両者の値をグラフ上にプロットしてみたところ、非常に強い相関が見られた（図8）。図8は、特に1回のシスターカルチャーのみの結果を示したもののだが、このような限定をした場合には相関係数が $r=0.95$ という非常に強い二次相関を示した（図8）。



## 1-4. 考察

### 1-4-1. ラット培養大脳皮質細胞

本研究で用いた培養系の特徴は、初代培養系でニューロンだけではなくグリア細胞も共存していることである（図2C、F）。図2C、Fは抗GFAP抗体を用いて、GFAP陽性細胞、すなわちアストロサイトの分布を示しているが、7DIVでは、アストロサイトはまだ数も少なく未成熟といった状態で観察された（図2C）。これが14DIVになるとアストロサイトは増殖により数も増え、より扁平な突起の多い分化した状態のものが出現してくる（図2F）。これは、アストロサイトの増殖が生体の発生においても生後まで続き、特にタイプIIアストロサイトにおいては分化はむしろ生後から始まり生後2週くらいまでに完了する<sup>10)</sup>ということを考えると、アストロサイトの発生分化が、培養系に移した場合にも時間的に非常に良く生体内の現象を再現していると思われる。アストロサイト以外のグリアについては、ニューロンのバックにGFAP陽性細胞の他にも薄く広がった細胞が存在することや、GFAPもニューロンのマーカー分子も共に陰性の細胞が確かに認められるので、オリゴデンドロサイトなどが存在していると考えられるが、確認には至っていない。

過去、神経系の特に生化学的あるいは分子生物学的な研究には、多くの場合株化された細胞が用いられることが多かった。これらの実験手法に断然有利な均一の細胞が大量に、簡単に得られるのであるから、これも当然である。しかし、特に神経系の株化細胞では、確かに形態的には神経様に分化するなどの性質を有しているが、多くの場合機能的には神経細胞とはいえない場合も多かった。これも原因してか、より良い株化細胞を得ようとして、実に多数の細胞株が存在している。しかし、研究者によって用いる細胞が異なるという様な結果となり、データの相互評価が困難になるなどの問題点が生じている。最近では、脳細胞の初代培養系を用いた研究が主流になりつつある。ただ、やはり生化学的な実験手法を目的としてか、ニューロンならニューロンのみ、グリアならグリアのみといった純粋な細胞だけを培養しようという努力が払われている。その結果、ニューロン-

グリアの相互作用は除かれ、一般にはそれほど長期の培養には耐え得ない。安定した神経回路網が形成されて初めて正常な脳機能が営まれることを考えると、培養系を用いて機能の面を常に頭に置いて研究を進めていこうとした場合には、実験目的にもよるが、できるだけ生体での状態を再現するために、特にグリアを除くような操作は行わない方がよいのではないだろうか。また、シナプス形成のように長期に及ぶ機能を解析していく上には、長期培養に十分耐えうるものでなければならない。そのためにも培養系内にニューロンとグリア細胞が混在することは、必要な条件と思われる。本研究の方法で調整したラット脳初代培養系は、長期培養に耐えうるもので、*in vitro*で色々な現象を、実に他段階の発生ステージで観察できるという利点がある。この培養細胞系で6ヶ月もの長期培養に成功したことが既に報告されている<sup>19)</sup>。また、シナプス形成の発生的時間経過及び形態的分化が、生体内での場合と極めて良く似ていることも報告されている<sup>17)</sup>。

実際には、ラット培養大脳皮質細胞は、3DIV頃からニューロンは突起を伸ばし始め、7DIV頃には培養のディッシュ内で実に複雑なネットワークが形成されたように見えた(図2A)。このネットワークの様子は、ニューロンのマーカー分子、MAP2やニューロフィラメントに対する抗体で免疫組織化学的に染色を行うとより顕著であった(図2B、G)。ニューロフィラメントは、軸索・樹上突起を含めてニューロン全体を、MAP2は細胞体と樹上突起に局在があるとされている<sup>20)</sup>ので、その両者を示すために用いたが、突起を見ると両抗体の染色像は重ならない部分があり、この差分がおそらく軸索を示していると考えられる。いずれにしろ突起の数は膨大で、ニューロン間に多数のシナプスがおそらくは多数形成されているであろうと考えるには十分な像である。

このような多数のシナプスを介したネットワークは均一種のニューロンから形成されているわけではない。少なくともニューロンには機能的に興奮性と抑制性の2種類があり、それらは大脳皮質では形態的に錐体細胞(pyramidal neuron)と非錐体細胞(non-pyramidal neuron)<sup>21,22)</sup>に対応づけられ<sup>23)</sup>、後者はさらに細胞の形態やサイズ、突起の伸びている長さ・分布など主に形態的特徴によって数種類のニューロン種に分類されている<sup>24,25,26)</sup>。ところが、用いた培養ニューロンには、少なくとも形態的に区別できるようなニューロン種の存在は明確ではない(図2)。また、大脳皮質の際だった特徴の一つは、抑制性のニューロンがその



細胞構成の大部分を占めること<sup>26)</sup>であるが、本研究のような培養系に移した場合にはこれら抑制性のニューロンはどうなっているのだろうか。培養系中でのネットワーク形成、あるいはそのネットワーク全体として発する自発的な興奮のoscillation現象に何らかの影響を及ぼすのであろうか。

培養ニューロン中に抑制性のニューロンがどの程度含まれているかは、抑制性の伝達物質  $\gamma$ -amino-butyric acid (GABA)そのもの、あるいはGABA合成酵素であるGlutamic acid decarboxylase (GAD)に対する抗体を用いれば調べることができる。これらの抗体を用いて培養細胞を染色し、抑制性ニューロンの含有率などの問題を検討しようとしたが、抗GAD抗体(Advance社)による染色は抑制性ニューロン含有率を検討できるほどには、よい染色像が得られなかった(データ省略)。これは抗体自体の特異性や活性などの問題の他、方法的な問題も考えられる。染色法は1-2-3.の方法の項で記したのものによったが、これが抗GAD抗体に合わなかった可能性はある。この方法は抗MAP2抗体(Amarsham社)でよい染色像が得られるように考えられた方法<sup>16)</sup>、抗体を細胞内によく透過させる処理として通常界面活性剤等を用いるところを、90%メタノール・5%酢酸で-20℃で5分間処理するという特殊な過程を用いる。これは細胞にとってはかなり過激で、抗原となるエピトープにも少なからず影響を及ぼすことが考えられる。従って、異なる方法を用いれば抗GAD抗体による染色も良好となる可能性もあるが、現在のところこの検討は行っていないので結論できない。

培養系中の抑制性ニューロンの割合は、抗GABA抗体(滋賀医科大学・木村宏先生よりご供与いただいた。)を用いて一応の結果を得た(データ省略)。1度のみの結果であるが、それによると、大脳皮質培養細胞中7DIVではGABA含有ニューロンの割合は、約10%であった。この数字がどれくらいの意味を持つかを判断するうえで、実際の大脳皮質中にGABA含有ニューロンがどの程度の割合で存在しているかを細かく調べた報告がある<sup>27)</sup>。Beaulieuは成体ラットを用いて、抗GABA抗体による染色法により、大脳皮質の部位や6層構造中の各層別にどの程度の割合でGABA含有ニューロンが含まれているかを検討した<sup>27)</sup>。それによると、大脳皮質の部位により若干の変動はあるものの、第I層で平均80%程度と多く、第II層から第VI層までは15%前後という結果が示された。第I層には細胞が少なく、層自体の厚さも一般に薄いことを考慮すると、全層通じて、大脳皮質全体

で、GABA含有ニューロンの割合は、約15%という結果となった<sup>27)</sup>。大脳皮質中ではニューロンの大部分がGABA含有ニューロンで占められているとする見積もある<sup>28)</sup>ので、どちらのデータが信頼できるかという問題になるが、前者が正しければ、本研究の培養系でも抑制性ニューロンはある程度維持できていることになる。後者が正しければ、本培養法では抑制性ニューロンが著しく脱落していることになる。大脳皮質細胞の培養系を用いてGABAニューロンについて調べた報告がある<sup>28,29)</sup>が、これらも培養中に含まれるGABA含有ニューロンの割合は一定していない。10%前後とする報告がある<sup>28)</sup>一方で、70%程度のニューロンがGABA含有ニューロンであるとする報告もある<sup>29)</sup>。本培養法も含めて、培養条件や検出に用いた抗体などが異なるので厳密な比較は難しいが、本培養法は、抑制性のニューロンに対しては、最適の培養法とはいえないかもしれない。一般に抑制性のニューロンを目的とした培養には、本培養法が胎生18日の胎仔を用いているのに対して、胎生15日程度のものを用いている<sup>28,29)</sup>ようであり、材料となる動物のステージの違いから、何らかの発生分化上の差異によりその後のニューロンのポピュレーションの違いにつながっている可能性もある。現在の情報からだけではこの問題は保留事項であり、今後詳細な検討を加えない限りは、現時点では結論できない。

いずれにしろ、本培養細胞中には微量ながら、GABA作働性の抑制性ニューロンは含まれていると思われる。それでは、これらの抑制性ニューロンは培養中で進行するネットワーク形成や、ネットワークができたことにより自発的に生じるニューロンの興奮活動のoscillation現象（図4）になにか影響を与えているのであろうか。ネットワーク形成に対する影響については、GABA<sub>A</sub>受容体のアンタゴニストであるbicucullinを培養初期から培養系に添加して検討した（データ省略）。1-50  $\mu$ Mのbicucullinを培養開始時から細胞外液に添加し、7DIV以降形成されたネットワークが自発的に発する同期した細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationを見る限りでは、無添加群に対して何ら変化は認められなかった。同様に、7DIVに生じている自発的な細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationに対して、灌流により2-3分という短時間20  $\mu$ M bicucullinを添加した結果でも、bicucullinはoscillation現象に対して何の影響も示さなかった（データ省略）。抗GABA抗体による染色や、本研究と同一の培養細胞を用いてwhole-cell clamp法により電気生理学的に解析すると、非常に希に抑制



性後シナプス電流 (IPSC) が検出されている<sup>30)</sup>ので、本培養系においてGABA作働性の抑制性ニューロン群は、確かに存在していると考えられるが、bicucullinの結果などから回路形成及び自発的なニューロンの興奮のoscillation現象の発現機序には寄与していない可能性も示唆される。抑制性のニューロン群の混在率を一定に保ったり、確認したりする操作は行っていないので、培養のロット毎に異なってきたりしていることは十分に予想されることであるが、結果から見ると7DIVには毎回ほぼ一定の自発的な細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationが観察され (図7:  $(4.1 \pm 0.2) \times 10^{-3}$  Hz, n=77)、bicucullin添加はこのoscillationの出現に何の影響も示さないことから、抑制性の混在率が一定に保たれているかあるいは抑制性ニューロン群は回路形成や自発的oscillationの発現にはほとんど影響を及ぼしていないといえるのではないだろうか。本培養の結果観察されるニューロンの興奮のoscillation現象は、もし生体内で生じるとそれは“てんかん”現象とも考えられる。生体内ではこのような現象を抑えるためにも抑制系が発達していると思われるが、培養中ではこれらが脱落あるいは機能しなくなって、結果として7DIV頃になると安定した、ほとんど全てのニューロンで同期を示すような興奮のoscillation現象が観察されとも考えられる。抑制性のニューロンについてはまだあまり解析を行っていないので、培養系での存在や役割などについてはまだ不明の点が多い。

ところで、ニューロン同士が同期して活発な興奮のoscillation現象を示していることにより、この培養系内には多数のシナプスが形成されていることが考えられる。しかし、培養系内で形成されているであろうシナプスを簡単に、かつ量的に観察するということが方法論的にほとんど不可能で、シナプス形成過程の解析という、どうしても観察の容易な突起の伸展のような現象に留まらざるをえなかった。電子顕微鏡を用いたシナプスの定量法なども存在する<sup>17,31)</sup>が、手間と時間を考慮すると非効率であることは否めない。培養系を用いてシナプス形成過程を特に分子・細胞のレベルで解析していく上で、なにか簡便に形成されたシナプスのある程度まで量的に比べうる方法はないのであろうか。本研究で開発した、細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationを計測する方法は、以上のような問題点のある程度までクリアするものであると考える。

#### 1-4-2. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 多点同時観察システムを用いた 培養ラット大脳皮質ニューロン間のシナプス形成の解析

細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 多点同時観察システムを用いて、ラット培養大脳皮質細胞を観察すると、5DIV頃から何の刺激もなしに、自発的な細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationが、複数のニューロン間で同期して観察されるようになった(図4)。さらに7DIV位には、oscillationのFreq.も上昇し、同期するニューロンの割合も増えてより安定した現象として観察されるようになった(図4)<sup>12,13,32,33</sup>)。これは小倉ら<sup>11,15</sup>)が培養海馬ニューロンで見いだしたのと同様に、培養ニューロン群が自発的に発火を始め、これが培養系内で生じた多数のシナプスを介して伝えられている現象を、発火に伴って起きているtransientな細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 上昇という現象で見ていると考えられる。ニューロン間での同期性、またフグ毒テトロドトキシン(TTX)やNMDA型グルタミン酸受容体アンタゴニストであるAPVによって、この現象が可逆的に阻害される(図5)ことから、培養大脳皮質ニューロン間で、グルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプスが多数形成されていることが示唆された。ちなみに、非NMDA型グルタミン酸受容体( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate:AMPA型及びカイニン酸:KA型)アンタゴニストである6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione(CNQX)の添加(10-20  $\mu\text{M}$ )は、このoscillation現象に対して(1例の結果であるが)7DIVではあまり効果を示さなかった(データ省略)。しかし、14DIV以降になるとCNQXによりoscillationの可逆的抑制が見られた(データ省略)。これは $\text{Mg}^{2+}$ の阻害効果とも平行していた。7DIVでは1mM程度の $\text{Mg}^{2+}$ によりoscillationは阻害されたが、14DIVから21DIV位では5mMでも阻害されない場合があった(データ省略)。これらの結果は、培養中で7DIVから14DIVにかけて培養ニューロンの持つ、oscillationに関与するようなグルタミン酸受容体の主要なタイプがNMDA型からAMPA/KA型に変更していると考えれば、一応の説明はつく。しかし、生体内においては発生的に反対の増減が考えられている。それぞれのタイプのmRNAの発現をin situ hybridization法により調べると、各サブタイプ(サブユニット)によっても異なるが、NMDA型がおよそ生後脳で高レベルに達する<sup>34)</sup>のに対し、AMPA型は胎生期からかなりの発現が認められている<sup>35)</sup>。一概に全てのサブタイプが同じように発現しているわけではなく、生後



・胎生他のものと逆の発現を示すものもあるが、一般にはNMDA型の方が遅れて発現してくると考えられているようである。生体で考えられていることと培養系とのこの矛盾の問題は非常に興味深い、ここでははっきりとしたことは言えない。今後それぞれに対する抗体などを用いて検討していけば、培養系におけるグルタミン酸受容体サブタイプの発現状況も明らかになるであろう。ニューロンの細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationを観察する際に細胞外液中に $\text{Mg}^{2+}$ を加えていないという条件も、生理的状況下でのNMDA型受容体の $\text{Mg}^{2+}$ 阻害効果<sup>30)</sup>を除き、NMDA受容体の作用を観察しやすくしているので、何らかの形で $\text{Mg}^{2+}$ の影響が現れているのかもしれない。

さて、7DIV頃に安定した細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationが観察されるようになるわけであるが、更に培養日数が進むと、ニューロン間で同期して生じる自発的な細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationは、その振動数を大きくして観察される(図4、7)。培養日数が進み培養ニューロン間に次々とシナプスが形成されてくるに従って、自発的な細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationの振動数が増加しているように見える。

それでは培養系内において、実際に形態的に認めうるシナプスは形成されているのであろうか。この培養細胞を固定包埋し、電子顕微鏡で観察すると、培養ニューロン間にも形態的に明白な構造でシナプスが形成されている事が確認された(図6)。電顕により、さらに経時的、定量的に観察すると、このシナプスは、3DIV以前ではほとんど認められず、7DIV頃かなりの量が確認され、ニューロン一つあたりで見た場合、培養2-3週間後(14-21DIV)程度まで増加傾向にあることが判明した(図7)。より詳細な観察により、培養系内では5DIV頃シナプスが現れ始め、増加し、培養3週間以降は漸次減少傾向にあることが判明している<sup>17)</sup>。このような培養内のシナプスの形態的、あるいは量的な成熟・発達の様子は、生体内で見られる場合と極めてよく似ており<sup>17)</sup>、また前述の自発的な $\text{Ca}^{2+}$  oscillationのFreq.の変化とも量的に対応していた(図7)。そうすると、ニューロン間で同期して生じる細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationの振動数が、実際に形成されたシナプスの数をよく反映しているように考えられる。電顕による培養内のシナプスの観察は、1サンプル当たりの観察視野数を多くして平均値をとることにより、シナプス形成を形態の見地から定量化する事もできる。培養ニューロンの細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動態を観察してその振動数を求め、そのあと同一の細胞を電顕用に固定して、電顕観察に

より培養系内で実際に形成されているシナプスを定量的に調べて、両者の値をグラフにプロットしてみると、非常に強い相関が見られた（二次相関を示した：図8）。特に図8のように1回のシスターカルチャーの結果だけに限定した場合は、相関係数  $r$  の値が0.95にもなることが判明した<sup>32)</sup>。

最近Robinsonらは<sup>30)</sup>、whole cell clamp法と多数のニューロンから電気記録が取れるように、複数の電極を基盤の上に配置して埋め込んだ培養皿を本研究と全く同一の培養ニューロンに用いることで、この培養系で生じる自発的なニューロンの発火現象を解析した。すると、小倉らが培養海馬ニューロンで観察したのと同様<sup>11)</sup>に、ニューロンの発火がバースト状に生じた時に $\text{Ca}^{2+}$ の上昇が引き起こされることを確認し、それ以外にこの発火のバーストとバーストの間に無数の微小興奮性シナプス電流（mEPSC）が不規則に記録される事を見いだした<sup>30)</sup>。おそらくは、多数の興奮性シナプスが形成されたことにより、ある一つのニューロンは多くのニューロンからの入力を受けることになる。そのほとんどのシナプス入力では自発的に微小EPSCをそれぞれ独立に生じているのであろう。そして、確率的にこのmEPSPが同時に集積し閾値を越えた場合にそのニューロンは発火に至り、それがシナプスを介して回路網全体に伝わり、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の上昇が誘発されるのではないかと考えられる<sup>30)</sup>。こう考えると、実際のシナプス数と自発的な $\text{Ca}^{2+}$  oscillationの振動数との相関<sup>30)</sup>も説明しやすい。すなわち、シナプスが多く形成されればされるほど、自発的な微小EPSCが一定レベル以上、ある一つのニューロンに集積する確率は高くなり、従ってニューロンの発火頻度も大きくなってこれに対応する細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の変動も振動数が増加するはずだからである。ペースメーカーとなる様なニューロンの存在も完全には否定しきれないが、そういったペースメーカー的な発火の記録が取れないこと、また複数のニューロンから同時に記録を取りsynaptic delayを調べた場合に毎回発火の順番が異なることなどから否定的だといえる<sup>30)</sup>。いずれにしろ興味深い知見である。

形態的にも、全く同じ培養細胞で、1個のニューロンを発火させるのに十分な程の微小EPSCの集積が起りえる位の多数のシナプスが、1ニューロン当たり、培養系内での発生が進むに従って形成されている事が観察されている<sup>37)</sup>。市川らは、培養ニューロンをシナプス小胞に特異的なタンパク質であるシナプトフィジンに対する抗体を用いて染色した<sup>37)</sup>。染色像はニューロンの突起や細胞体を多数



のドットが取り囲むようにして観察された。このドット状の染色像は、7DIVくらいではまだ少ないのだが、それ以後どんどん増え、培養4週間目にもなるとニューロンの全域にわたってドットで埋めつくされる様な像としてみられた<sup>37)</sup>。このようなドット、つまり抗シナプトフィジン抗体で染色された所は、シナプス前終末に対応していると考えられるため、培養された1ニューロン当り実に多くのシナプスが形成されうと思われる。

さて、ニューロン間で同期した自発的細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationのFreq.と形態的に観察されるシナプスの数とが強い相関を示す事実が判明した<sup>32,33)</sup>ので、 $\text{Ca}^{2+}$ 変動の振動数を観察すれば実際のシナプスの数のある程度推定する事が可能となる。この様に培養内にシナプスを形成させられる系と、形成されたシナプスを量的に推定できる指標があると、これはシナプス形成に関与する機能分子群のpreliminaryなスクリーニングに最適となる。つまり、培養開始時から何等かの薬剤、抗体などを添加しておき、対照群では十分にシナプスが形成されているはずの期間後に細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ アッセイを行い、その自発oscillationのFreq.を比較すれば、添加したものがシナプス形成に関与しているかどうかをpreliminaryに推定できるはずである<sup>12,13,32,33)</sup>。そして、シナプス形成を完全に抑えてしまうものでなくても、部分的に抑制を示すものや、シナプスの効率変化を引き起こすもので、Freq.の大小でその程度までも推定できることになる。もちろん細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationのFreq.に影響を及ぼす要因はシナプスの数だけではない。シナプスの数が減れば、確かにFreq.は低下するであろうが、逆は必ずしも真ではない。最終的には、電子顕微鏡での観察・計数のような方法<sup>17)</sup>をとらなければ、確定はできないし、本当の意味での定量性がもてないのも確かである。しかし、それには膨大な手間暇がかかり、實際上シナプス形成に影響する因子のスクリーニングのような仕事は不可能である。そのため、この方法のように可能性を狭めていくpreliminaryなスクリーニング法は簡便であり、研究効率面からも重要であると考えられる。

## 1-5. 第1章 まとめ

ラット培養大脳皮質細胞は、7DIV頃、自発的な細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationを多数のニューロン間で同期して示すようになった<sup>12,13,32</sup>。この現象は、ニューロンの自発的な電氣的興奮が、培養系内で形成された多数のシナプスを通じて多数のニューロンに伝達していることを示している<sup>11,30</sup>。培養系内に実際に多数のシナプスが形成されていることも、電子顕微鏡を用いた観察から明らかになった<sup>13,17</sup>。さらに定量的な解析により、培養系内で観察されるシナプスは、培養日数とともに増加し、その増加の様子及び形態的に成熟していく様子は、生体内の場合とよく似ていた<sup>17</sup>。この時、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationのFreq.も、実際のシナプス数と平行して上昇した<sup>32</sup>。両者の関係を調べると、非常に強い二次相関を示すことが判明した<sup>32,33</sup>。これを用いれば、培養系内で形成されるシナプスの数ある程度推定することが可能となる。環境設定の容易な安定した培養系とできたシナプスを量的に判定できる系が揃ったため、シナプス形成に影響を及ぼす薬物のpreliminaryなスクリーニングが可能となった。この系で、今後シナプス形成に作用する分子が続々と明かされ、シナプス形成を調節する分子機構が徐々に解明されてくることが期待される。



# 1-6. 第1章の図

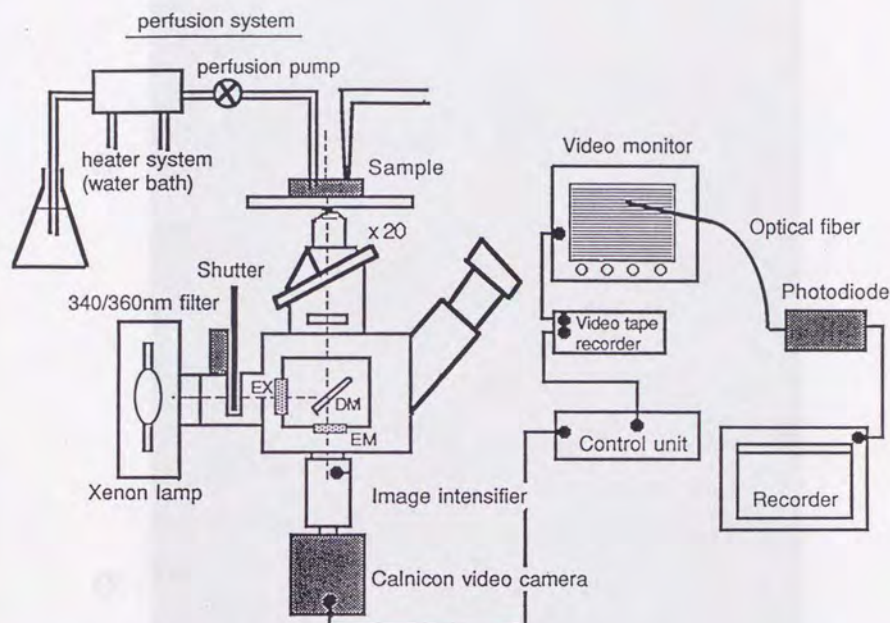
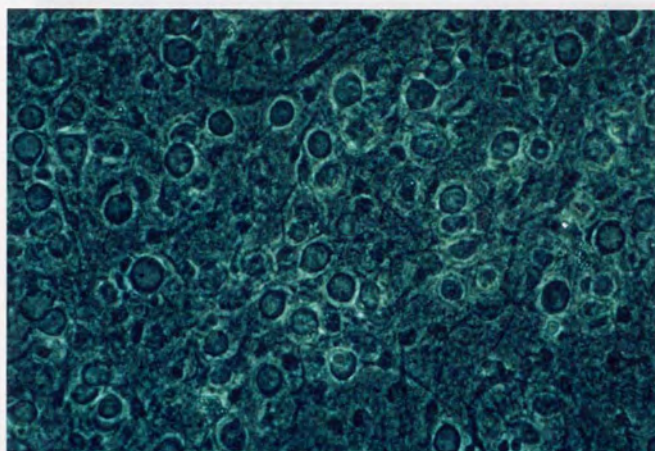


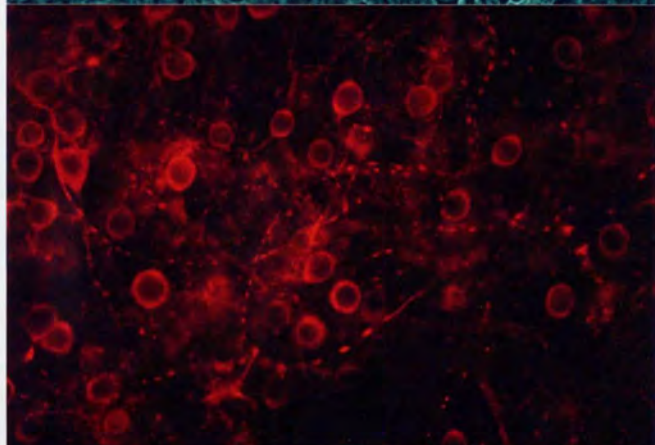
図1 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 多点同時解析装置の概略図

基本的には、蛍光顕微鏡、灌流装置とビデオ装置で構成される。実際にはこのシステムにコンピュータ解析装置がさらに付属している。(EX:励起フィルター、DM:二色鏡、EM:発光側フィルター) 蛍光顕微鏡のステージ上に $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光色素fura-2を取り込ませた培養細胞皿を置き、必要なら灌流装置で液を灌流する。細胞に励起光を当て、細胞の蛍光像を超高感度ビデオカメラ(SITカメラ)で取り込み、ビデオレコーダーで記録する一方モニターに映し出す。モニター上にマグネットで光ファイバーを固定できるようになっており、これにより蛍光強度の変化を取り込んで、ペンレコーダーで記録するというものである。

图2A,B,C A



B



C

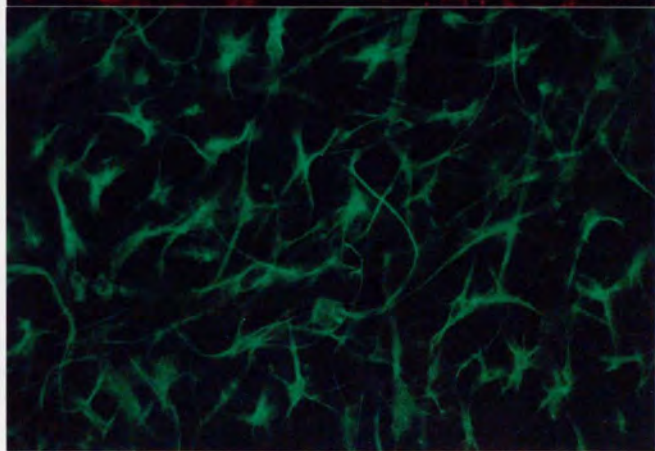
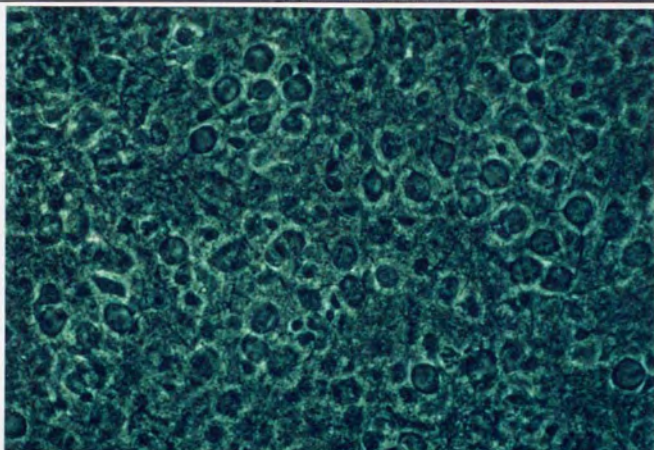
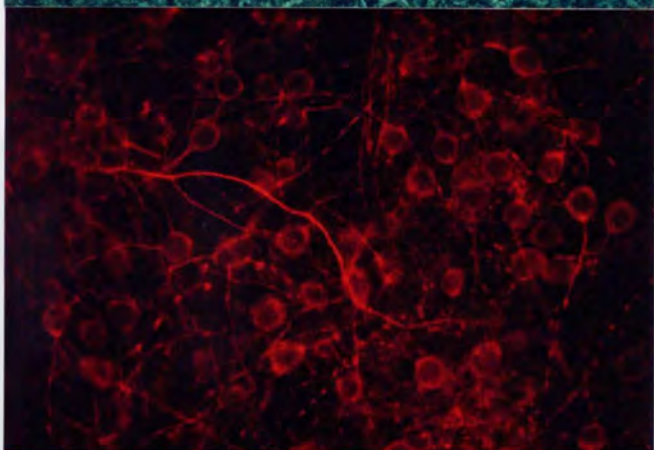




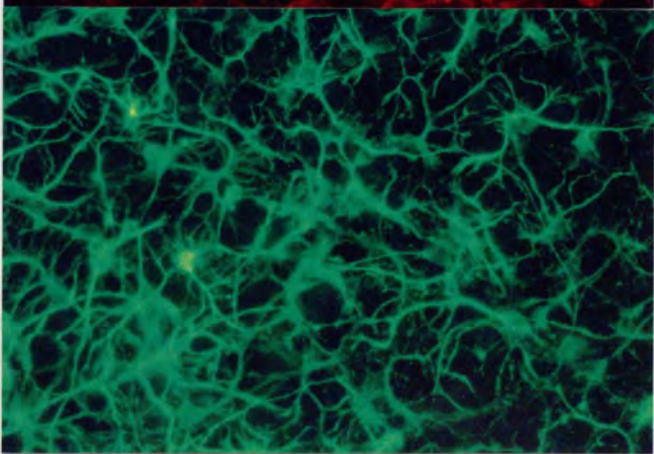
图2D,E,F D



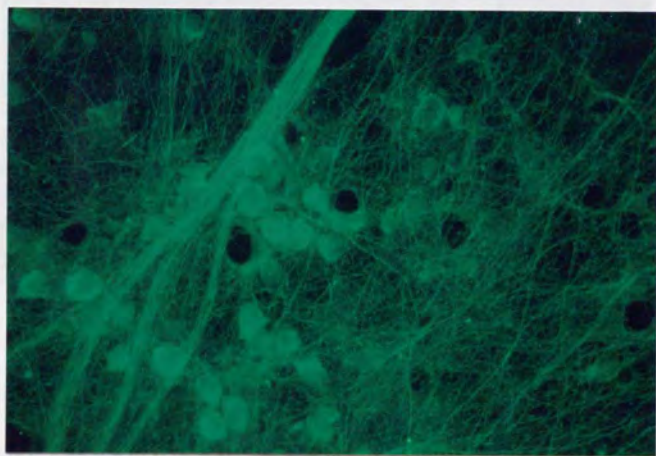
E



F



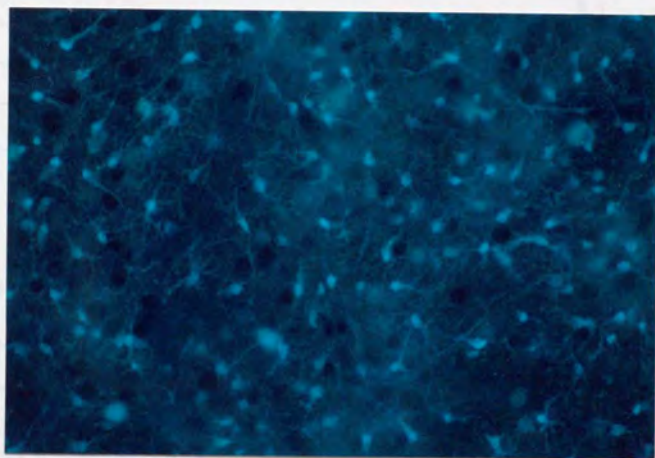
G

50  $\mu$ m

## 図2G

図2説明。培養したラット大脳皮質細胞。胎齢18日目のラット胎仔から切り出した大脳皮質細胞を培養して、A、B、Cは培養7日目、D、E、F、は14日目の様子でそれぞれ3枚同視野を示す。A、Dは位相差像、B、Eは抗MAP2抗体での染色像、C、Fは抗GFAP抗体での染色像である。Gは培養14日目の抗ニューロフィラメント抗体での染色像を示す。

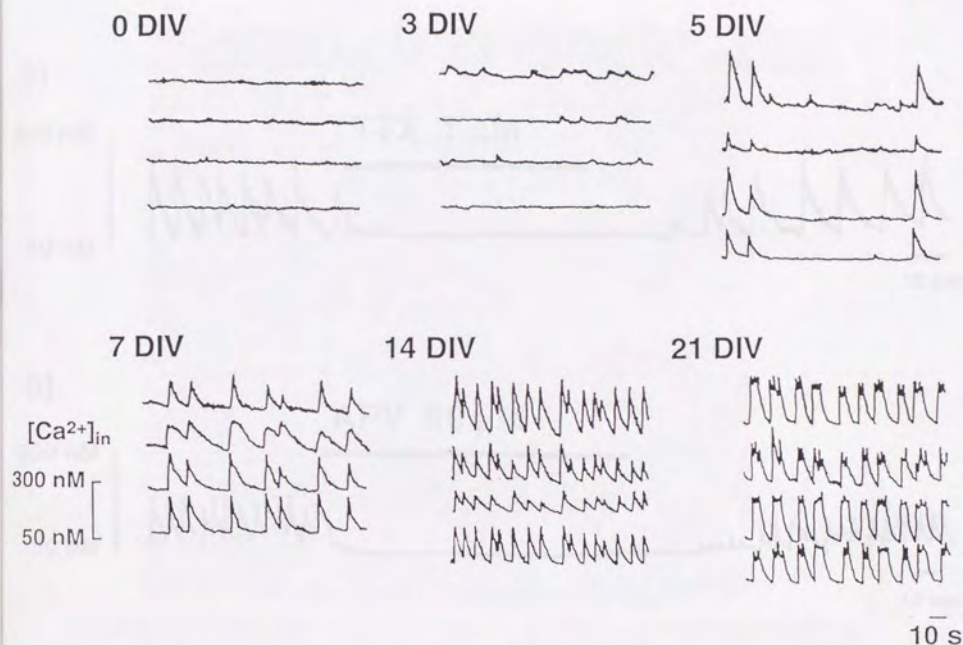




100  $\mu$ m

図3. 培養7日目にfura-2を取り込ませ、蛍光を示しているラット大脳皮質培養細胞。ぼんやりと光るバックグラウンド上に明るく光る球形の細胞がのっている。これらの細胞から伸びる突起も見られる。これと同様の像が細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 多点同時解析装置の白黒ビデオモニター上に映し出され（図1）、それぞれの光点に任意で光ファイバーを当て、蛍光強度変化すなわち細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の変化を記録することになる。

図4. ラット大脳皮質ニューロン間でのシナプス活動に対応した細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationの発生と維持。細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 多点同時測定システムを用いて細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 量に対応する蛍光強度の変化を任意に選んだ4つのニューロンから記録した。数字は培養開始から何日目かを示している。記録したニューロンは各培養日ごとに別個のものであるが、同一の培養皿の中から選んだものである。





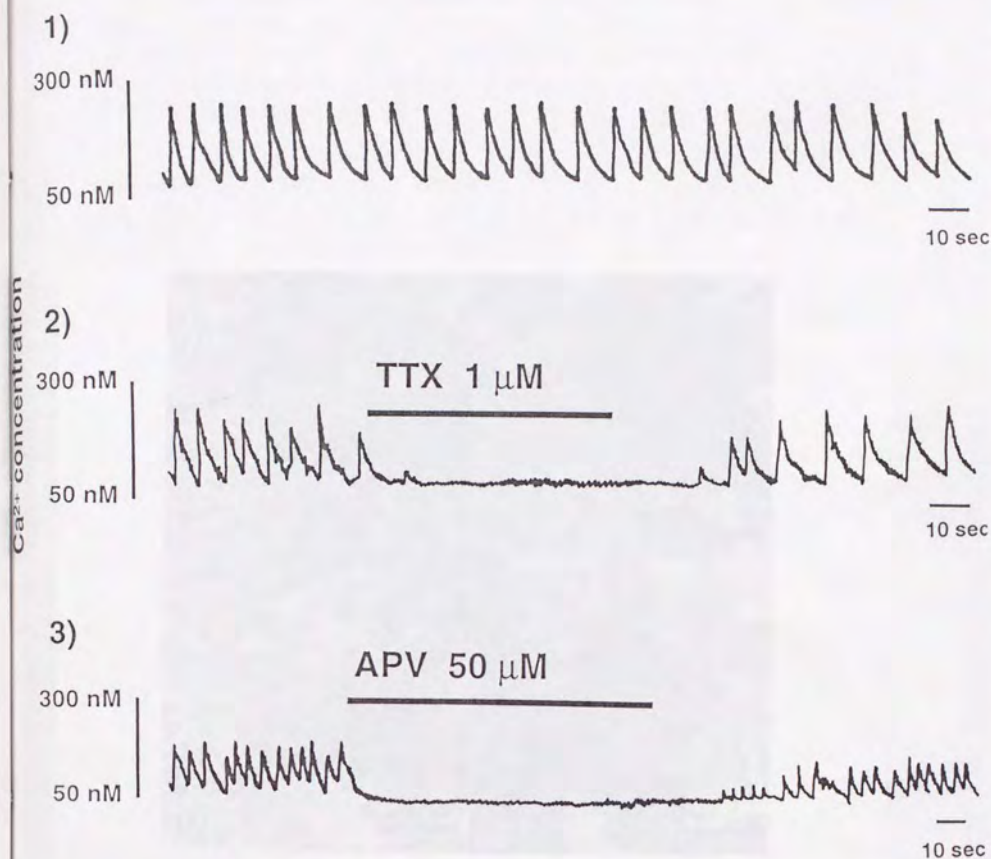


図5. 自発的な細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationに対するTTXとAPVの効果。自発的に生じているニューロン間で同期した細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationに、棒線で示した期間TTX及びAPVを表記の濃度灌流で与えた。両者とも抑制作用を示し、洗い流すことにより、可逆的に回復した。1)薬物添加した場合と同じ時間だけ観察した無添加コントロール、2)1  $\mu$ M TTX添加、3)50  $\mu$ M APV添加。

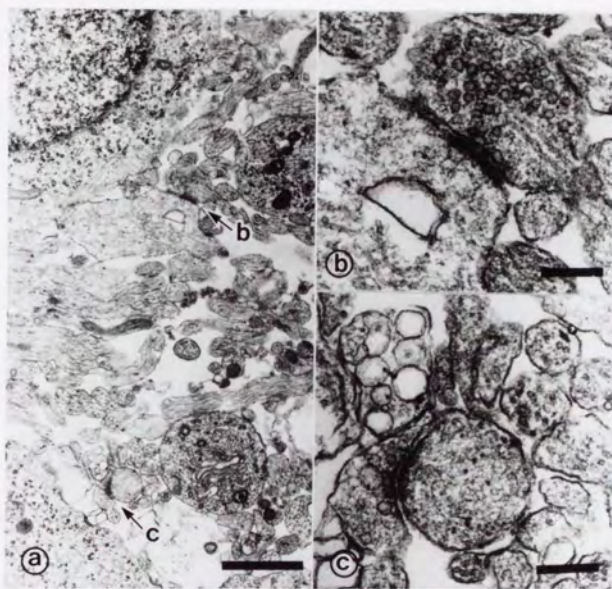


図6. 培養大脳皮質ニューロンの電子顕微鏡写真。a:培養7日目の大脳皮質ニューロン。矢印b、cで示したように数個のシナプスが1視野内に認められた。b、cは写真a中の矢印b、cの拡大図である。aのbarは1 $\mu$ m、b、c中のbarは200nmを示している。



図7. ニューロン間で同期した自発的細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationのfrequencyと電子顕微鏡で同定したシナプス数の経時変化。白丸はfrequency、黒丸は電顕観察により計数したシナプス数を示している。シナプス数は切片の厚さなどの影響を補正するため、以下の式で1ニューロンあたりに換算した<sup>16)</sup>。 $N_{NS}=N_{VS}/N_{VC}$ 、 $N_{NS}$ :ニューロンあたりのシナプス数、 $N_{VS}$ :単位体積あたりのシナプス数、 $N_{VC}$ :単位体積あたりのニューロン数。さらに $N_{VS}=Q_s/(D_s \times \pi/4 + t)$ 、 $Q_s$ :単位面積当たりのシナプス数、 $D_s$ :シナプスの接触部の長さの平均、 $t$ :超薄切片の厚さ（平均の厚さは70nm）。 $N_{VC}=Q_c/(D_c \times \pi/4 + t)$ 、 $N_{VC}$ :単位面積当たりのニューロン数、 $Q_c$ :ニューロンの直径、 $D_c$ :semithin切片の厚さ（800nm）。データは平均±標準誤差で示した。

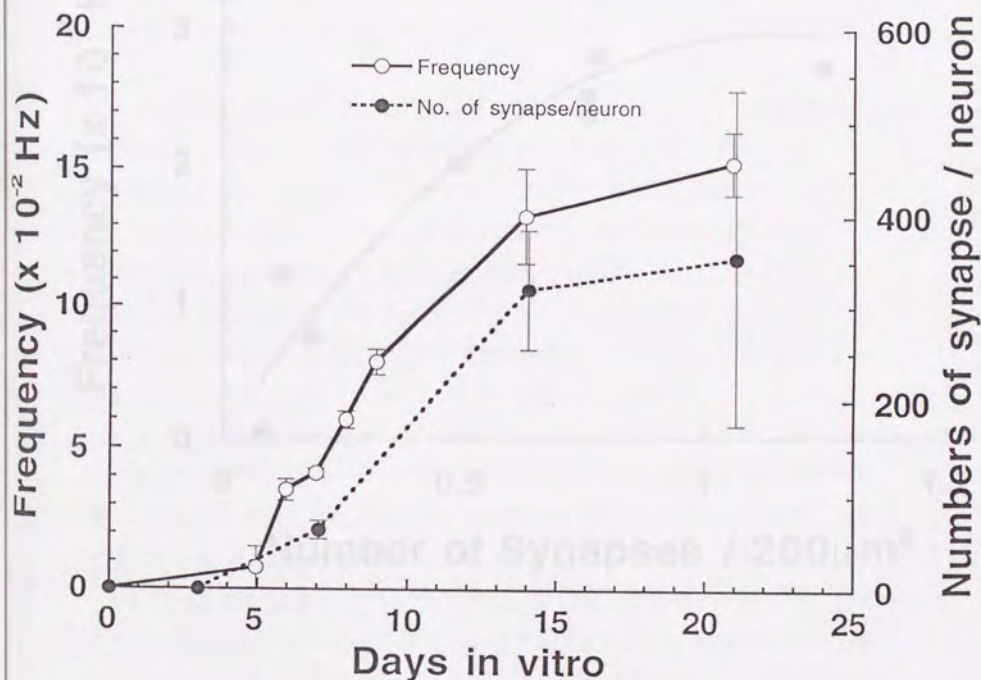
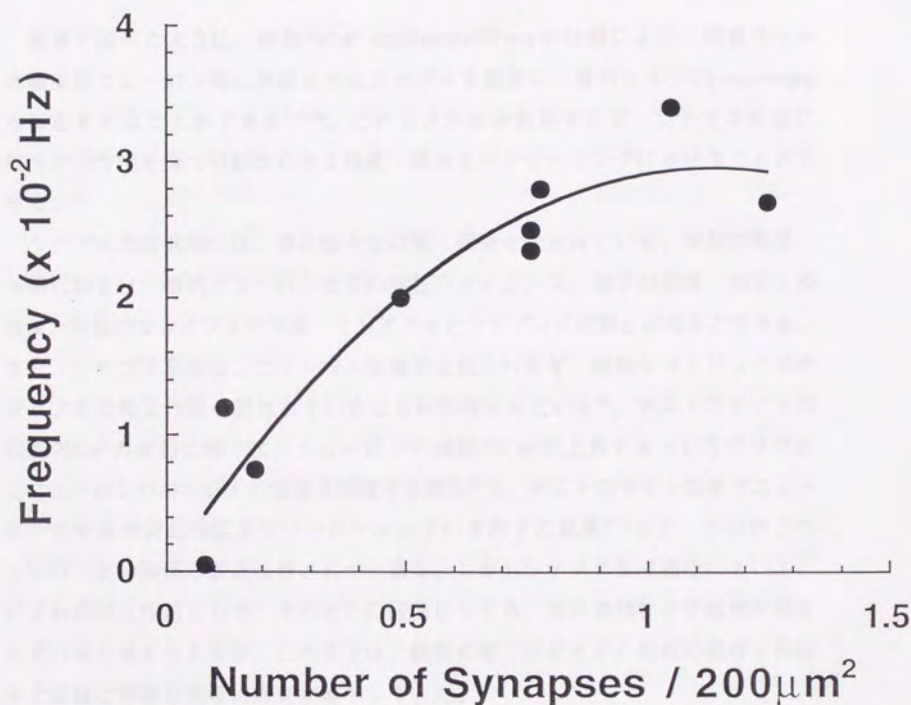


図8. 単位面積当たりのシナプス数と細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationのfrequencyの相関。培養細胞にCa<sup>2+</sup>蛍光指示薬、fura-2を取り込ませ、細胞内Ca<sup>2+</sup>変化を観察した。細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度は自発的なニューロンの発火に伴い、多数のニューロン間で同期してoscillation現象を示すが、そのfrequencyを観察結果より算出し、その後同じ細胞を電顕用に固定して、電顕観察によりシナプス数を数えた。この図はその結果として両者の関係をプロットしたものである。両者は二次相関を示し、相関係数の値は $r=0.95$ にもなった。





## 第2章 シナプス形成に影響を及ぼす薬剤のスクリーニングと タンパク質リン酸化酵素阻害剤K-252bによる 培養ラット大脳皮質ニューロン間シナプス形成の阻害

### 2-1. 序論

前章で述べたように、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationのFreq.の比較により、培養ラット大脳皮質ニューロン間に形成されたシナプスを簡便に、量的な大小のpreliminaryな推定をすることができる<sup>12,13,32)</sup>。このシステムを利用すれば、シナプス形成に何らかの作用を持つ可能性のある物質・薬物をスクリーニングにかけることができる。

シナプス形成過程には、実に様々な段階・現象が含まれている。突起の発芽、伸展に始まり、標的ニューロンまでの突起のガイダンス、相手の認識、相手との接着、形態的なシナプスの完成、そしてできたシナプスの成熟と保持などである。また、シナプス形成は、ニューロン単独では起こりえず、細胞外マトリックスやグリアとの相互作用も関与していることが示唆されている<sup>36)</sup>。アストロサイトの細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の変動に伴って、ニューロンの細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ が上昇するというグリアからニューロンへのシグナル伝達を示唆する報告<sup>39)</sup>や、アストロサイト由来でニューロンの生存や突起伸展をコントロールしている因子の発見<sup>40,41)</sup>など、グリアとニューロンとの関係は最近注目されつつある。しかしシナプス形成過程において、いずれの相互作用にしろ、そのどこの段階にしても、実に多様な分子機構が関与していると考えられるが、これまでは、観察の難しさからか、突起の発芽・伸展など実験に容易な過程に研究が集中していた。

シナプス形成の各段階にどのような分子機構が関与しているかを明らかにするためには、特定の分子に特異的に作用するような阻害剤を用いた薬理学的な手法が有用な手段となる。そして、本研究で開発したシナプス形成アッセイ系を用いれば、このような阻害剤を、それがたとえどのステップに作用するにしても、スクリーニングすることが可能なはずである。

シナプス形成に関与する突起の伸展、相手の認識、接着などの現象を考えた場

合、その性質上細胞膜分子の関与が考えられる。そこでまず、細胞の外側で働くような薬剤について、シナプス形成に対する作用の検討を行った。その中で細胞膜を透過しないという性質を持つ<sup>42)</sup>、タンパク質リン酸化酵素阻害剤K-252b<sup>43,44)</sup>に、シナプス形成を阻害する作用のあることが判明した<sup>12,13)</sup>。

## 2-2. 材料と方法

K-252b (協和発酵) は、2mMの濃度でDMSOに溶解し、保存溶液とした (K-252bの構造を図9に示した)。保存溶液を、培養に用いる培地 (DMEM) で100倍に希釈し、この希釈液を細胞に、最終濃度が50nMから800nMの範囲で添加した。コントロールとしては、DMSO濃度が最大になるK-252b添加群と同量のDMSOを添加した (DMSO濃度にして0.04%(v/v)となった)。K-252bは、培養の初日から加え、3日に1度培地を半量交換する際に最初の半分量加えた。7-8DIVに細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationの観察を行い、記録用紙からoscillationのFreq.を算出し、コントロールと比較することにより、シナプス形成を阻害している可能性について評価した。また、コンピューターを用いた解析により、1視野内のどれくらいのニューロンが同期した細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationを示しているかをも検討した (三菱化成FC-300システム)。

細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationを観察した後、第1章で記した電子顕微鏡観察のための細胞固定法<sup>17)</sup>に従い、電子顕微鏡観察用のサンプルを調整した。電子顕微鏡観察により、シナプス数を計数し、シナプス数が減少しているかどうかを調べた。

またK-252bの短期の効果、シナプス数以外の要因による細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationそのものに対する影響があるかないかを、第1章でTTX、APVに対して行ったのと同じように灌流を用いた短期投与実験で調べた。

シナプス数に対する影響が、ニューロンの変性によるものである可能性は、第1章に記した抗MAP2及び抗ニューロフィラメント抗体を用いた免疫細胞染色法により、ニューロン数、ニューロン細胞体及び突起部の形態変化などについて観察した。



### 2-3. 実験結果

細胞膜を透過しないという性質を持つ<sup>42)</sup>タンパク質リン酸化酵素阻害剤K-252b<sup>43,44)</sup>を培養系に加え、7DIV頃に細胞内Ca<sup>2+</sup>変動を観察したところ、K-252bの濃度依存的に自発的細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationのFreq.の低下・消失が観察された(図10)。K-252b 0.2  $\mu$ M添加すると、細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationのFreq.は若干の低下を示した(図10b)。さらに、0.8  $\mu$ M添加すると、自発的な細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationの消失や著しいFreq.の低下が観察された(図10c)。0.8  $\mu$ Mの場合には、複数のニューロンを観察するとほとんどのニューロンではoscillationが消失したが(図11)、一部ニューロンでは単独性の、他のニューロンへの同期性のない細胞内Ca<sup>2+</sup>の一回性的上昇が観察された(図10c、図11)。既に安定して生じているニューロン間で同期した細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationに対しては、K-252b 0.8  $\mu$ Mを短期間投与した限りでは、変化は認められなかった(図12)。また、抗MAP2抗体や抗ニューロフィラメント抗体による免疫細胞染色では、ニューロンやその突起の形態変化は、光顕レベルでは特に認められなかった(図13:位相差像・図13C,D,G,H、抗ニューロフィラメント抗体による染色・図13A,B、抗MAP2抗体による染色・図13E,F)。さらに、染色時に、ニューロンのマーカー分子で染色した場合に、多数の視野で染色陽性細胞、すなわちニューロンの数を数えると、使用した範囲の濃度ではK-252bによるニューロン数の変化はなかった(図14、白丸点線: K-252b 0.8  $\mu$ M添加でコントロールに対して、 $97.8 \pm 0.5\%$  ( $n=4$ ))。

K-252bの濃度依存的に同期したCa<sup>2+</sup> oscillationのFreq.の低下が観察されたわけだが(図14)、これが本当に形成されたシナプスの数が少なくなったためなのかどうかを確認するために、電子顕微鏡による観察でシナプス数の定量化<sup>17)</sup>を試みた。多数のランダムに撮影した電顕写真から形態的にシナプス数を計数すると、やはりK-252b添加により濃度依存的なシナプス数の減少が、統計的に有意に確認された(図14: K-252b 0.8  $\mu$ M添加でコントロールに対して、 $44.5 \pm 0.8\%$  ( $n=4$ )、 $P<0.01$ 、t検定)。

## 2-4. 考察

### 2-4-1. タンパク質リン酸化酵素阻害剤K-252bによる シナプス形成の抑制

シナプス形成に関与する因子のスクリーニングの過程で、K-252bというタンパク質リン酸化酵素の阻害剤<sup>43,44)</sup>をラット大脳皮質培養ニューロンの培養液中に添加してみた。このK-252bという阻害剤は、非特異的なタンパク質リン酸化酵素阻害剤としてよく用いられるK-252aの類縁体（図9）であるが<sup>44)</sup>、ほんのわずかな構造上の置換により<sup>43)</sup>、細胞膜を非常に透過しにくく、細胞内にほとんど入らないという性質を持っている<sup>42)</sup>。このK-252bを培養系に加え、7DIV頃に細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動態の様子を観察すると、阻害剤の濃度依存的に自発的細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationのFreq.の低下、消失が観察された（図10、11、14）<sup>12,13)</sup>。第1章で述べたように、 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationのFreq.とシナプス数とは、非常に強い正の相関を示す（図8）<sup>32,33)</sup>ので、このoscillationのFreq.の低下は、K-252bによってシナプスの形成が抑制された可能性を示唆している<sup>12)</sup>。この時、同期した自発的細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationがK-252bの7日間処理で出現しない状態でも、他には全く伝達していないが、単独に自発性の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  transientを示すニューロンが存在する（図10c、矢印）ため、ニューロンはK-252bによって変性を受けたり、その特性である興奮性に影響を受けているわけではないと考えられる。また、7DIVにすでに安定して生じている、ニューロン間で同期した自発性細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationには、短期的に（数分間）K-252bを添加しても何の変化も観察されなかった（図12）、このoscillationの誘発に関与するシナプス数以外の要因を抑えるわけでもないようである。

形態的な変化の有無は、培養細胞をニューロンのマーカー分子（MAP2とニューロフィラメント）に対する抗体で免疫化学的に染色して、蛍光顕微鏡で観察し検討した。その結果、少なくともこのレベルではニューロンや突起の形態には著しい変化は認められなかった（図13）。またニューロンの数自体も、K-252b処理の如何に関わらず変化していない（図14）。K-252bがシナプス形成を阻害して



いるとすれば、突起の伸展、ニューロンの生存や形態・機能の維持などをブロックしたためではなく、シナプス前終末が後細胞に接触し、シナプスが形態的に形成され、安定化されるいずれかの過程に作用している可能性が高い。

K-252b処理によるシナプス数の減少は、最終的に電子顕微鏡による形態観察によるシナプスの定量化によって確認した(図14)。多数のランダムに撮影した電顕写真から、形態的にシナプス数を計数すると、やはりK-252b添加により濃度依存的なシナプス数の減少が確認された。この観察により、K-252bがニューロン全体の形態・機能などには顕著な影響を及ぼさずに、本来形成されるべきシナプスを抑制する薬物であることが判明した<sup>13)</sup>。

しかし、K-252bによるシナプス形成の阻害は、高濃度の場合でも完全な阻害を示すわけではない(図14)。K-252b 0.8  $\mu$ M添加の場合、ニューロン数はコントロールに対して $97.8 \pm 0.5\%$  ( $n=4$ )でほとんど変化がないが、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationのFreq.は、 $8.5 \pm 1.2\%$  ( $n=10$ )にまで低下している(図14)。ところがこの時、実際にシナプスがどれくらい形成されているかということ、コントロールに対して $44.5 \pm 0.8\%$  ( $n=4$ )であった(図14)。すなわちK-252b処理の効果は、 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationで見た場合には顕著な効果が観察されるが、実際のシナプス数に対する抑制効果で見るとおよそ半分弱の減少にとどまっているのである。これは2つの疑問を提起している。1つは、どうしてシナプスがコントロールに対してまだ半分近く残っているのに、自発的なoscillationはほとんど出現しなくなってしまうのかという問題、もう1つは、K-252bの阻害効果が完全ではなく、無添加群の半量程度のシナプスはそれでも形成されているという事実である。第1章で述べたように、この系で生じる自発的な細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationは、多数の入力から漏れ出る微小EPSCが、1つのニューロン上で確率的に偶然集積して、閾値を超えた場合に発火し、その結果生じている現象と考えられる(第1章参照)<sup>30)</sup>。こう考えると、ニューロンの発火頻度は1つのニューロンが受けるシナプス入力の数に依存することになるので、一定以上のシナプスが減少してしまった場合にほとんどニューロンの発火が見られなくなるといことも理解できる。おそらくは無添加群で本来形成される数の半分程度が臨界点に当たるのであろう。

K-252bの阻害効果が完全ではないという問題からは、培養系内に少なくとも2種類のシナプスが形成されているのではないかということが示唆される。K-

252b処理後も形成されてくるシナプスが、現に無添加群の半分程度存在することを考慮すると、タンパク質リン酸化酵素K-252bに対する感受性の異なる、形成を阻害されるものとされないものの2種類があるのではないだろうか。この場合、培養系内で生じるニューロン間で同期した細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationの発生に寄与するシナプスとそうでないものがあり、前者がK-252bによって形成が阻害されるのかもしれない。あるいは単純に考えて、シナプスには興奮性と抑制性の2種類があるはずであるから、K-252bに感受性を示すものは興奮性シナプスと考えることもできるかもしれない。そうすると残ったシナプスだけでは興奮性の活性を起こしようがないので、第1の問題の方も簡単に説明ができる。

#### 2-4-2. 膜を透過しないタンパク質リン酸化酵素阻害剤K-252b の標的分子

前節までに、K-252bは既に生じているニューロン間で同期した自発的細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationには短期的（数分間）に投与しても何の影響も及ぼさないこと（図12）、抗MAP2抗体や抗ニューロフィラメント抗体による免疫細胞染色ではニューロンや突起の数、形態には変化が見られないこと（図13）などからシナプス形成を特異的に阻害していると考えられた。それでは、このK-252b処理によるシナプス数の減少は、K-252bがどのような分子の機能を阻害したためなのだろうか。K-252bが膜を透過し難い<sup>42)</sup>とすると、この薬物の作用部位は細胞膜の外表面もしくは近傍と考えられる。とすると、K-252bの標的分子は細胞の膜に存在する分子で、その機能活性は細胞外に向いている可能性が高い。

ニューロンが興奮すると神経終末から神経伝達物質が放出されるが、この時伝達物質と一緒にATPも出てくる事が知られている<sup>45,46)</sup>。ATPはエネルギー代謝産物として細胞内に通常mM程度含まれているが、シナプス小胞内にもかなりの高濃度で神経伝達物質とともに含まれている。こうしてシナプス間隙に放出されたATPは自身が伝達物質として振舞う<sup>47,48)</sup>他に、シナプス膜表面にあるecto-ATPase、エクト・5'-ヌクレオチダーゼなど細胞外に活性中心をもつecto型酵素によって、最終的にアデノシンにまで分解されていく<sup>49)</sup>。シナプス膜表面にはこのアデノシンに対する受容体が存在している。受容体はアデノシンに対する親和性の異なる



少なくとも2種類のものがあり、共にシナプス伝達の調節に関与しているが、その作用は一方の受容体を介するものは抑制を、他方は促進を示す。この二つの全く相反する作用と親和性が異なるという点から、ニューロンの興奮頻度に従ってシナプス間隙に生じるアデノシンが、記憶につながる使用頻度に応じたシナプスの選択的除去あるいは安定化に寄与しているとされている<sup>8,50)</sup>。ところが、ATPはアデノシンに分解されてシナプス伝達を修飾しているだけではなく、他にも役割を担っているらしいことが分かってきた。1986年、Ehrlichらは<sup>51)</sup>エクト・ATPaseが存在するなら、細胞外に出たATPをリン酸供与体として膜表面タンパク質をリン酸化する様なエクト・プロテインキナーゼもあるに違いないと考え、神経系由来のハイブリッド細胞NG108-15の培養細胞外液に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を添加してリン酸化されるタンパク質をSDS-PAGEで調べた。そしてN-CAM様タンパク質を含むいくつかのタンパク質バンドが、細胞表面で起こったと考えられるリン酸化を受けている事が判明した。これとは別に、神経系に特に多く存在するスフィンゴ糖脂質ガングリオシドの機能発現に関わる新しい情報伝達系を解析していた辻らも、ヒト由来のニューロブラストーマ・GOTO細胞の膜外表面にガングリオシドGQ1bによって調節を受けるエクト・プロテインキナーゼが存在する事を報告した<sup>52)</sup>。

K-252bのターゲットは、Ehrlichら<sup>51)</sup>や辻ら<sup>52)</sup>の報告するエクト・プロテインキナーゼである可能性が高い。そして、このようなエクト・プロテインキナーゼは、おそらくは軸索の成長円錐や神経終末から放出されたATPをリン酸供与体として、ある特定の細胞表面タンパク質を特異的にリン酸化し、その結果未熟シナプスの成熟やシナプス結合の安定化に至るのであろう。刺激頻度の高いシナプスは神経終末からの開口放出の際一緒に出てくるATPが刺激頻度に依存して集積し、これがリン酸化反応のリン酸供与体として、シナプス使用頻度の生理的指標としてそのシナプスを安定化に導くシグナルとしても働いているのではないだろうか<sup>8)</sup>。

以上のように、K-252bのターゲットとしてエクト・プロテインキナーゼはもっとも考えやすいといえるが、まだ他の可能性も残っている。K-252bが細胞膜を透過しにくいということは、ラット由来のPC12細胞を用いて明らかにされている<sup>42)</sup>。この場合、K-252bをPC12細胞培養外液中に1時間添加して、その範囲以内では細胞内にはほとんど透過していなかった<sup>42)</sup>。しかし本研究で用いている

ラット大脳皮質初代培養細胞でどうかという問題がある。PC12細胞もラット由来であり、神経細胞とも発生源を同じにしているなどで、形質膜の性質がそれほど変わっているとも思われぬが、この細胞では透過しているかいないかは結論できない。また本研究ではK-252bを培養開始時付近から7DIVまで入れ続けているが、このような長いタイム・スケールではどうかという問題は厳密には不明である。

K-252bが細胞膜を透過する可能性はいくつか考えられる。シナプス部では、exocytosis過程により神経伝達物質がシナプス間隙に放出されるとされるが、シナプス膜と融合した内膜系の小胞膜はendocytosisにより再び細胞内に取り込まれ、その後再利用あるいは分解されるようなrecycleが行われていると考えられている<sup>53,54)</sup>。このような小胞膜のrecycleに伴うendocytosisによってK-252bが細胞内に取り込まれ、その後に小胞から細胞質にK-252bが入ってしまうという可能性は否定できない。さらに、K-252bが細胞膜を透過しない理由としては、構造中の3'位に結合している酢酸基(-COOH) (：図9)が水溶液中で $\text{-COO}^-$ と $\text{H}^+$ に解離してイオン化するために膜を透過しなくなる、と説明されている<sup>42,43)</sup>。ところが-COOHの解離定数は $K=1.74 \times 10^{-5}$  ( $\text{pK}_a=4.76$ )であるから、水溶液中では完全には解離せず一定の平衡状態にあるはずである。とするとK-252bのうち解離していないものは細胞内に入り、そこで新たに平衡のもと解離し、結果外液中の平衡状態がシフトするためさらに細胞内に透過するという状況も考えられる。またK-252bを実験において細胞外液に添加する時期も問題となる。まだ系統的に行っておらずpreliminaryな結果であるが、K-252bのシナプス形成抑制効果は、この薬物を培養初期（すくなくとも3DIV）に添加しないと現出しなかった（データ省略）。培養初期の発生段階のはじめの方のステージで作用しているという解釈も成り立つが、同時に培養初期というpapain酵素処理後の膜の不安定な時期に加えたため、細胞内に入ってその結果であるという可能性も考えられる。

現時点ではこれらの可能性は否定できない。K-252bが細胞内に微量にしり入りえるとすると、K-252bのターゲットは細胞内に存在するプロテイン・キナーゼであることも考えられる。ところで、プロテイン・キナーゼの阻害剤にはいろいろなものが知られているが、いくつかのものを培養細胞に添加し、シナプス形成に対する影響を検討している（データ省略）。検討したものはK-252bの類縁



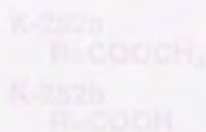
体である K-252a<sup>65)</sup>、プロテイン・キナーゼCに比較的特異的な calphostin C<sup>66)</sup>、Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IIに比較的特異性を持つKN-62<sup>66)</sup>、同じく HA-156<sup>67)</sup>などである。これらの阻害剤は、細胞の内部のキナーゼ系にも作用を及ぼすと考えられるが、全て細胞毒性を示し、通常7日間添加し続けると培養細胞は死滅してしまった(データ省略)。細胞内のキナーゼ系の活性は外界からの刺激を受けてそれに反応するため、あるいは細胞が生存していくうえでどの細胞においても極めて重要であると考えられる<sup>68)</sup>。各種プロテイン・キナーゼ阻害剤の結果は、細胞内のキナーゼ系を抑えたためであると考えられる。これに対して、K-252bが細胞毒性を示さないというのは、細胞内に有効な濃度では入っていないからであるということが、各種キナーゼ阻害剤の結果から傍証できるかもしれない。まだ、微量に入ったK-252bが何らかの抑制をしていたり、あるいはキナーゼ以外のターゲットに働いている可能性などもあり、膜透過の問題は、現時点ではどちらとも決定できない保留事項である。

最後に、本研究で用いたシナプス形成のアッセイ系を用いれば、今後エクトプロテインキナーゼ以外にもシナプス形成に関与する分子群が続々と明らかになってくるものと期待される。実際すでに、神経系に多量に存在するスフィンゴ糖脂質ガングリオシドからその糖鎖部分のみを特異的に加水分解する酵素(エンドグリコセラミダーゼ)<sup>69)</sup>を添加して、この系を用いて調べ、ガングリオシド糖鎖がシナプス形成を調節している可能性について報告している<sup>69)</sup>。ガングリオシドがシナプス形成に関与しているという可能性は、ガングリオシド依存性のエクト型タンパク質リン酸化酵素があるという報告<sup>70)</sup>からも興味深い。また、中西らは、グリアのFeeder Layerの上にニューロンをまくという培養法で、培養細胞中のアストロサイトの由来する脳部位や、どのAgeからグリアをとってきたかなどが、中枢ニューロン間のシナプス形成に多大な影響を及ぼすことをこの系を用いて報告している<sup>39)</sup>。さらに、アルツハイマー病の危険因子として水道水中のアルミニウム化合物が明らかになったこと<sup>61)</sup>、痴呆症状には老人斑や原線維変化よりもシナプス数がより高い相関を示すという報告<sup>62)</sup>をふまえ、川原ら<sup>61)</sup>は本研究のシナプス形成の量的解析系を用い、アルミニウム処理がシナプス形成(又は保持)に異常を起こすことを明らかにしている。

## 2-5. 第2章 まとめ

細胞の膜を透過しないプロテインキナーゼ阻害剤、K-252bは、スクリーニングの結果シナプス形成を阻害する作用をもつということが判明した<sup>12,13)</sup>。また、この阻害剤の作用特性より、細胞の外側に触媒活性を持つようなタンパク質リン酸化酵素（エクト・プロテインキナーゼ）<sup>51,52)</sup>のラット大脳皮質培養細胞での存在と、シナプス形成への関与の可能性が示唆された。

### K-252 compound





## 2-6. 第2章の図

図9. K-252bの構造。K-252bは、K-252aの類縁体で、一カ所だけ構造置換がみられる。この部分がK-252bでは電荷を持つ様になるため、細胞内に非常に透過し難くなると考えられ、実際にほとんど透過しないことが確かめられている<sup>28)</sup>。K-252aは非特異性のプロテインキナーゼ阻害効果を示すが、K-252bはわずかながらプロテインキナーゼCに特異的な阻害効果を示す。試験管内のプロテインキナーゼアッセイ系では両者の有効濃度はそれほど大差はないが、細胞系に与えた場合にはK-252aでは著しい細胞毒性を示すのに対して、K-252bでは通常何の影響も見いだせない。これは、K-252bが細胞膜を透過しないためだと考えれば説明できる。

### K-252 compound

K-252a  
R=COOCH<sub>3</sub>

K-252b  
R=COOH

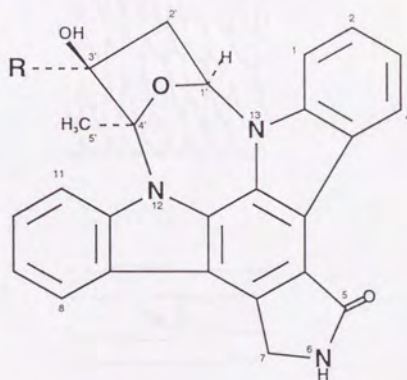
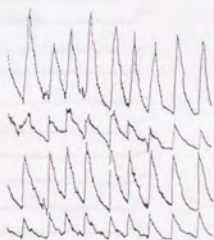


図10. 培養大脳皮質ニューロン間で自発的に生じる、同期した細胞内 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationの発生に対するK-252bの効果。コントロールに比べてK-252b添加により $\text{Ca}^{2+}$  oscillationのfrequencyは低下した (K-252b  $0.2\mu\text{M} \cdot \text{B}$ )。さらに、 $0.8\mu\text{M}$ 添加ではoscillationはほぼ抑えれた (C)。しかしこの場合でも矢印で示したようなほかに伝わらない一過性の $\text{Ca}^{2+}$ 上昇がみられた。

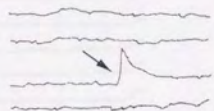
A) Control



B) K-252b  $0.2\mu\text{M}$



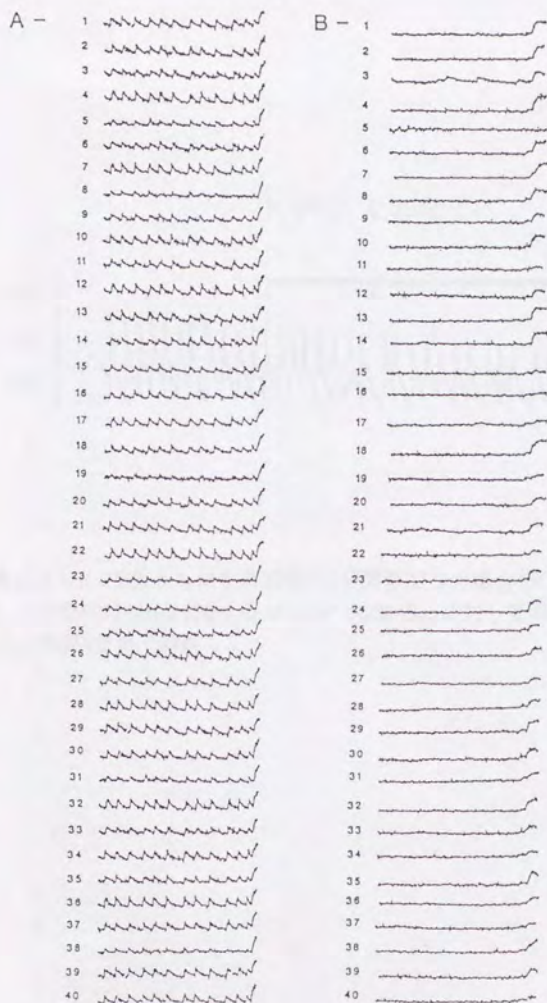
C) K-252b  $0.8\mu\text{M}$



10 sec.



図11. K-252bの $\text{Ca}^{2+}$  oscillationに対する効果。コンピュータ解析で一視野内の40のニューロンについて観察した。A: コントロール、B: K-252b  $0.8\mu\text{M}$ 添加。全3分間の記録を示す。



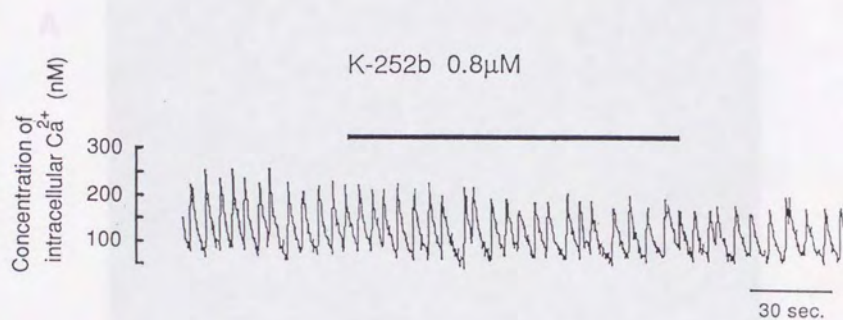


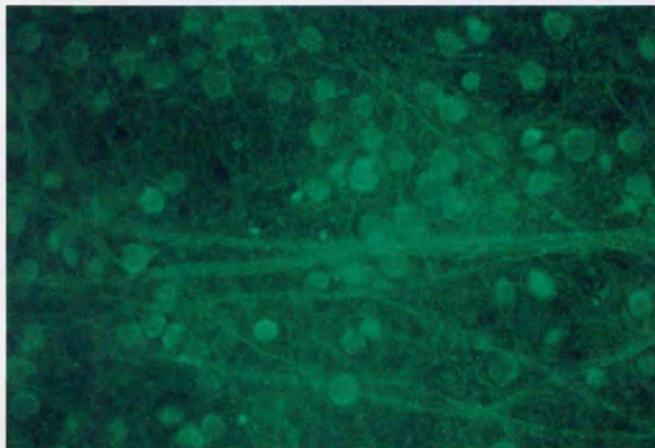
図12. 灌流によりK-252b 0.8 $\mu$ Mを短期間・2分間添加した場合の $\text{Ca}^{2+}$  oscillationに対する影響。この条件ではK-252b 0.8 $\mu$ Mは $\text{Ca}^{2+}$  oscillationに対して何の変化も引き起こさなかった。培養9日目で観察した。



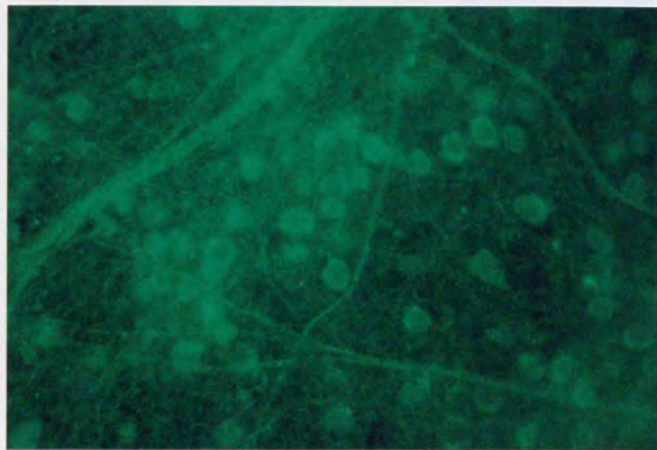
図13. K-252b 0.8 $\mu$ Mを添加したときのニューロン、及びニューロンの突起に対する形態的な影響。培養14日間K-252b 0.8 $\mu$ Mを入れ続け、抗MAP2抗体と抗ニューロフィラメント抗体で染色した。A：コントロールのニューロフィラメント染色像、B：K-252b 0.8 $\mu$ M添加群のニューロフィラメント染色像、C：Aに対応する位相差像、D：Bに対応する位相差像、E：コントロールのMAP2染色像、F：K-252b 0.8 $\mu$ M添加群のMAP2染色像、G：Eに対応する位相差像、H：Fに対応する位相差像。このレベルでは特に顕著な変化は観察されなかった。

図13 A,B

A



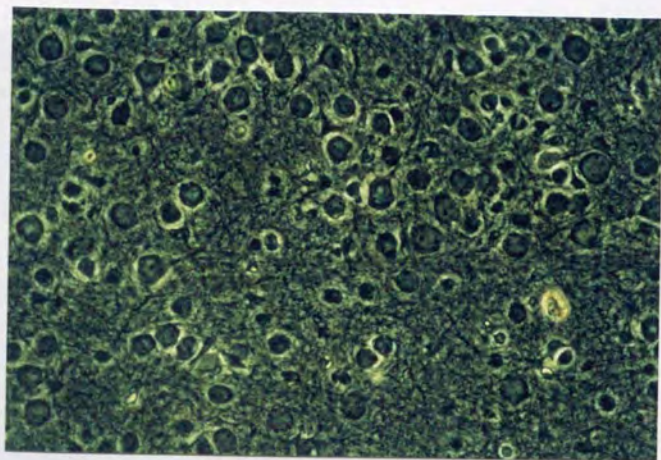
B



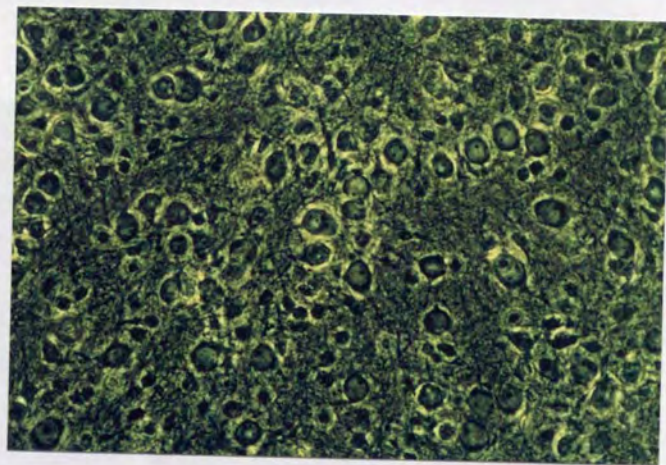
50  $\mu$ m

图13C,D

C



D

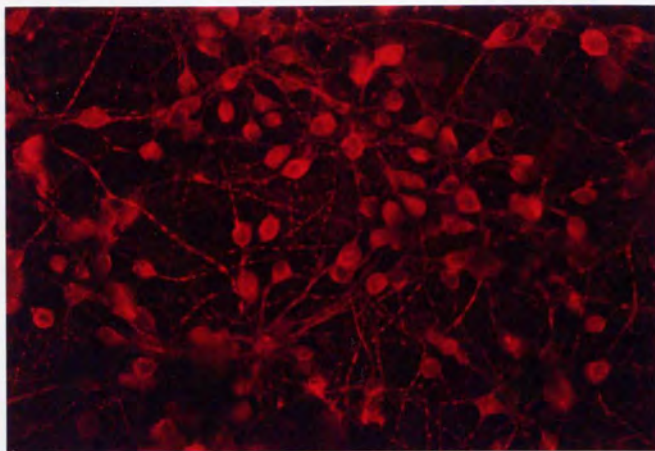


50  $\mu$  m

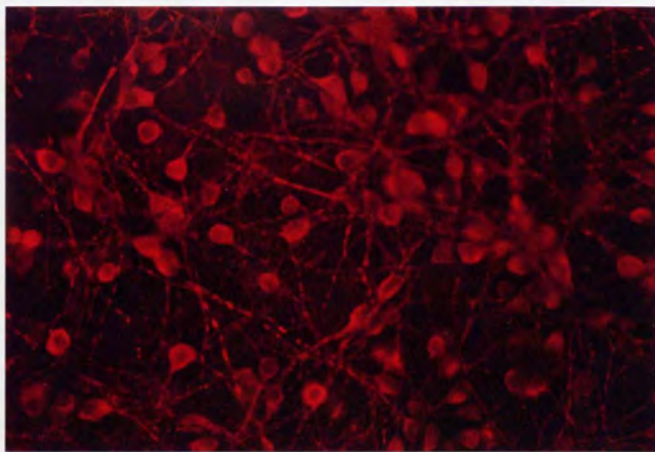


图13E,F

E



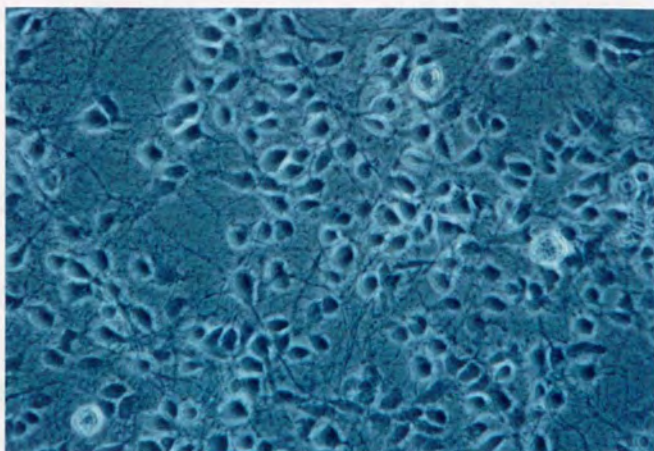
F



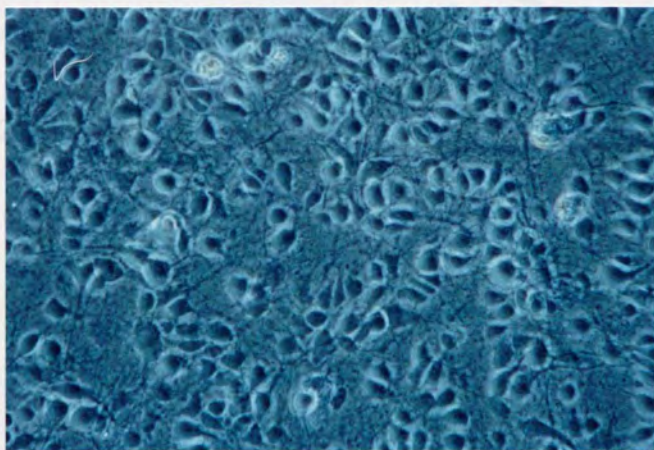
50  $\mu$  m

图 13G,H

G



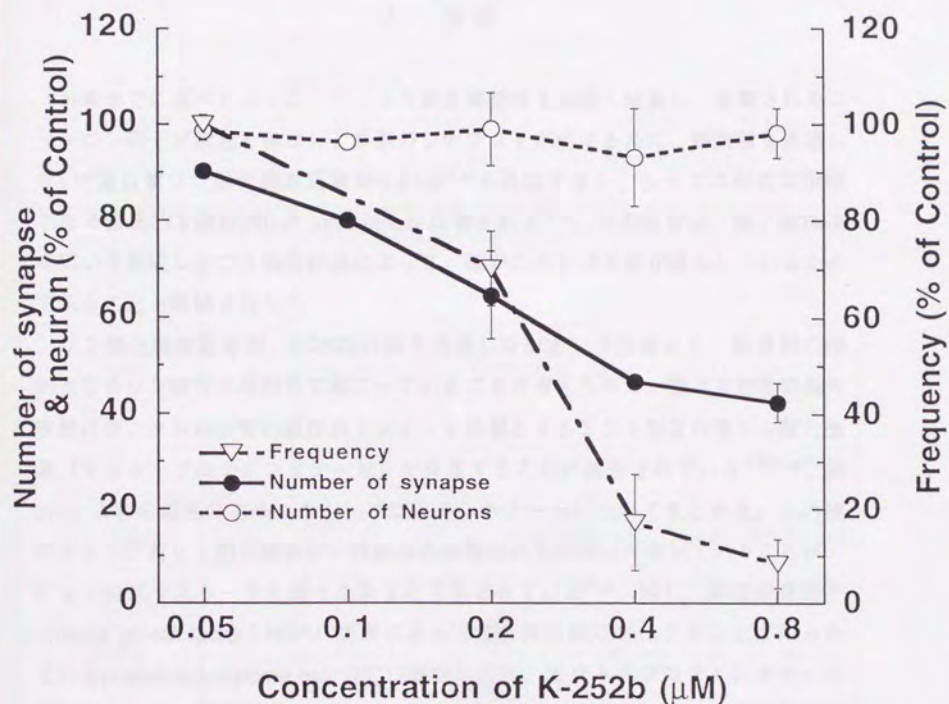
H



50  $\mu$ m



図14. K-252bのニューロン数、シナプス数と $\text{Ca}^{2+}$  oscillationのfrequencyに対する濃度依存的な効果。ニューロン数はほとんど影響を受けていないのに対して、シナプス数とfrequencyは濃度依存的に減少した。データは平均値±標準誤差で示した。標本数はシナプス数の観察は $n=4$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  oscillationの観察は $n=4$ ただしK-252b 0.8 $\mu\text{M}$ のデータだけは $n=10$ 。ニューロン数の観察も $n=4$ である。



### 第3章 培養ラット大脳皮質細胞に存在するタンパク質 細胞外ドメインのリン酸化活性と リン酸化基質タンパク質としての微小管関連タンパク質 MAP1Bの同定

#### 3-1. 序論

前章までに述べたように、ラット大脳皮質細胞を単離・培養し、培養されたニューロン同士が突起を伸ばし、多数のシナプスを形成する系に、細胞膜を透過しない<sup>42)</sup>蛋白質リン酸化酵素阻害剤K-252b<sup>43,44)</sup>を添加すると、シナプス形成の指標となる自発的な細胞内Ca<sup>2+</sup> oscillationが阻害される<sup>12,13)</sup>。この阻害は、電子顕微鏡を用いた形成シナプス数の計測によって、確かにシナプス数が減少しているためであることも確認された<sup>13)</sup>。

リン酸化酵素阻害剤、K-252bの膜を透過しないという性質から、阻害剤の標的となるリン酸化は細胞外で起こっていることが考えられた。様々な細胞の膜外表面には、タンパク質の細胞外ドメインを基質とするエクト型蛋白質リン酸化酵素（エクト・プロテインキナーゼ）が存在することが報告されている<sup>51,52,64-78)</sup>。表2に、これら報告のあるエクト・プロテインキナーゼについてまとめた。この種のタンパク質リン酸化酵素が、神経系の細胞膜にも同様に存在していることが、ニューロblastomaを使った系などで示されている<sup>51,52)</sup>。特に、神経成長因子（nerve growth factor: NGF）処理によって交感神経様に分化的ことが知られているpheochromocytoma cell（PC12細胞）にも、エクト・プロテインキナーゼが存在し、この酵素によるタンパク質のリン酸化によってNGFに対する反応性や突起伸張作用などが調節されているという報告<sup>79)</sup>などは、シナプス形成への関与からも注目される。従って、K-252bの処理によってシナプス形成が抑制されるのは、培養ラット大脳皮質細胞に存在するエクト・プロテインキナーゼによる、細胞表面タンパク質の細胞外ドメインのリン酸化を阻害したためであると考えられる。そうすると、このようなリン酸化反応は、シナプス形成の調節機構として非常に重要な可能性がある。この場合、リン酸化酵素自体も当然重要であるが、



基質としてどのようなタンパク質がリン酸化されているのか、リン酸化によってどのように状態が変化するのか、といった問題は非常に興味深い。それにはまず、本研究で用いた、培養ラット大脳皮質細胞にエクト・プロテインキナーゼによるタンパク質の細胞外ドメインをリン酸化する活性が存在するかどうかという問題がある。そのうえで、リン酸化反応を受ける基質タンパク質（群）はなにかが判明すれば、そのタンパク質（群）は、培養大脳皮質ニューロン間のシナプス形成において、非常に重要な役割を演じている可能性がある。

そこで、培養ラット大脳皮質細胞にエクト・プロテインキナーゼによるタンパク質の細胞外ドメインのリン酸化活性が存在するかどうかを検討し、基質タンパク質の同定を行った。さらに、得られた基質について、若干の解析を加えた。

用いた細胞系	文献	酵素としての特徴・リン酸化による機能変化
グリア細胞	64	エクト・プロテインキナーゼとしてはじめの報告
3T3細胞	65	
マクロファージ	66	
ファイibroblast	67	cAMP依存性、ATPに対するKm値：70 $\mu$ M
脂肪細胞	68	cAMP依存性、ATPに対するKm値：50 $\mu$ M、主要基質：42KDaタンパク質、ミトコンドリア膜にも存在。
白血球	69,70	ATPに対するKm値：0.5 $\mu$ M、Mn <sup>2+</sup> 要求性、至適pH7.0-7.5、基質としてbasicFGF。
精子	71,72	精子のmotilityを調節している。ATPに対するKm値：40 $\mu$ M、cAMP依存性。
HeLa細胞	73	ATPに対するKm値：2.5 $\mu$ M
Yaffe's L6細胞	74,75,76	ATPに対するKm値：40nM、myogenesis (fusion過程) の調節、主要基質として112KDaタンパク質。
NG108-15 (神経系のハイブリッド細胞)	51	主要基質として125KDaのタンパク質、NCAMも基質としてリン酸化する。
血小板	77	主要基質として、39KDaと42KDaタンパク質
PC12細胞	78	主要基質として、20、39、53、105KDaのタンパク質、特に53KDaは、NGFでPC12を分化させたときのみ出現。リン酸化によって、NGFに対する反応性が変化する。

表2. 様々な細胞系に存在するエクト・プロテインキナーゼ

### 3-2. 材料と方法

#### 3-2-1. 培養ラット大脳皮質細胞での エクト・プロテインキナーゼ活性の測定

ラット大脳皮質ニューロンの培養は、第1章で述べた方法<sup>12,13)</sup>の通り、18日令のラット胎仔から大脳皮質を取り出し、パパイン消化後、6穴プレート (Falcon社) を用いて行なった。この細胞を用いて、9DIVにエクト・プロテインキナーゼの活性をEhrlichらの方法<sup>6)</sup>を多少変更して測定した。

実験に用いる細胞を、まずReaction Buffer (組成: 145mM NaCl, 5mM KCl, 1.8mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.8mM  $\text{MgSO}_4$ , 20mM Glucose, 25mM HEPES (pH7.4); 以下R.Bufferと略記) で5回洗った。R.Buffer 1mlで5分間プレ・インキュベートした後、反応は、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (Amersham社)、非標識ATP、プロテイン・フォスファターゼ阻害剤calyculin A (和光純薬) の混液を終濃度がそれぞれ62.5nM (比活性: 62.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ )、5 $\mu\text{M}$ 、1 $\mu\text{M}$ になるように加えて開始した。反応は37°Cで通常は5分、その他に時間経過を見るために2.5分、10分などの条件でインキュベートした。すなわち、タンパク質の細胞外ドメインをリン酸化する条件として、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を細胞外に極く短時間添加して培養細胞でのリン酸化反応を行なったわけである。また、細胞内タンパク質にラベルが取り込まれるとしたら、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ がエクトATPase等で $^{32}\text{P}$ 無機リンに分解され、細胞に取り込まれた後改めて $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ に合成し直されて細胞内リン酸化反応に用いられという可能性が考えられる。これを防ぐため、 $^{32}\text{P}$ 無機リンが生じたとしても十分に希釈されてしまう様に多量の非標識無機リン (1mM) を添加した。細胞内に透過しないタンパク質リン酸化酵素阻害剤K-252bが、エクト・プロテインキナーゼの活性を阻害するかどうかを調べる場合には、K-252bを反応開始時に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ などとともに、終濃度が2 $\mu\text{M}$ になるように加えた。反応は所定の時間後、反応液を除いてから反応停止液 (組成: 5mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 10%SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, pH8.0) を1穴あたり0.6ml加えて停止させた。

リン酸化させたタンパク質は、反応停止液で可溶化後、1.5ml容のミニチュー



ブに移し、沸騰させた湯の中で5分間処理をした。このサンプルを、2-15%濃度勾配ポリアクリルアミドゲル (ready gel: 第一化学社) を用いて、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) で分離した。電気泳動終了後、ゲルを乾燥させ、イメージングプレート (富士フィルム: type BAS-III) に露光させた。露光は24時間から3日の間で室温にて行った。このイメージングプレートをバイオイメージングアナライザー (BAS-2000: 富士フィルム) を使って解析した。解析は、画像の処理とラベルの取り込まれたバンドの定量的解析とで行なった。

### 3-2-2. リン酸化によって<sup>32</sup>Pの取り込まれるバンドの同定

エクト・プロテインキナーゼによってリン酸化される基質タンパク質を同定するために、前節 (3-2-1) の解析で放射性ラベルの取り込まれた蛋白質バンドのうち、K-252b阻害効果が強く、最も高分子量 (212KDa以上) のバンドをまず同定することにした。

サンプルは5%ポリアクリルアミドゲルを使って電気泳動し、分離した。タンパク質バンドは、クマシーブルー染色し、放射活性の取り込まれたバンドをイメージングプレートとBAS-2000を用いた解析によって検出した。放射性ラベルの取り込まれたバンドのうち、最も高分子量 (212KDa以上) のものに一致するクマシーブルー染色で認められるバンドをゲルより切り出した。ゲル中よりタンパク質を回収し、これを0.1%SDS存在下でプロテアーゼ (リシルエンドペプチダーゼ) で処理し、部分ペプチドを得た。多数得られたペプチドをプレカラム (TSK DEAE-5PW) を通した後、逆相カラム (Vydac 218TP52 column) を用いた microbore-HPLCによって分離し、エレクトロスプレー質量分析計と気相エドマン分解法によって部分ペプチドのアミノ酸配列について解析した。その結果各部分ペプチドのアミノ酸配列を得た (LC/MS法)<sup>79)</sup>。この方法により、HPLCで分離してきたペプチドが均一であるかどうか判定でき、さらに気相シーケンサー (ABI 470A) で得られたアミノ酸配列から分子量を計算して、質量分析の観測値と比較して配列の正確性の確証を得た。

得られた複数のアミノ酸配列からコンピューターによるホモロジー検索を行い、

リン酸化基質タンパク質の同定を行った。

### 3-2-3. エクト・プロテインキナーゼの基質としての 微小管関連タンパク質MAP1Bの解析

エクト・プロテインキナーゼの基質として、微小管関連タンパク質MAP1Bが同定されたため、あらためてMAP1Bの膜タンパク質としての性質を検討した。まずコンピューターにより、Kyte & Doolittleの方法<sup>20)</sup>及び美宅らの方法<sup>21)</sup>に基づいて膜貫通領域の検討を行なった。

さらにその結果予想される細胞内ドメイン、細胞外ドメインのそれぞれの一部の配列に対応するペプチドを合成し、ウサギを使ってペプチド抗体を作成した（合成ペプチドから抗体の作成・精製までは（株）岩城硝子に作成依頼した）。抗体作成部分のアミノ酸配列の内、4168-73抗体と4171-90抗体の抗原として用いた配列を図20に示した。細胞内に対して1種（抗体No.4171-90）、細胞外部分に対して3種（抗体No.4168-73、4169-85、4170-88）の抗体を準備した。これらの抗体と市販の抗MAP1B抗体（Amarsham社）を用いて、MAP1Bの膜貫通性について、免疫細胞染色によって検討した。市販抗体による染色は第1章で述べた染色法で、抗MAP2抗体との二重染色で行なった。この場合MAP1B抗体がマウスモノクローナル抗体であるため、抗MAP2抗体はウサギポリクローナル抗体を用いた。（抗MAP2 ウサギポリクローナル抗体は、東京大学理学部生化学学科の室伏先生より御供与いただいた。）MAP1Bのそれぞれ細胞内配列・細胞外配列に対する抗体で染色する場合は、以下に記す細胞の表面のみを染色する方法・及び細胞内に抗体を浸透させる方法を使い分けて染色を行なった。

#### A. 細胞表面のみの染色法

LabTekプレートにまいたラット大脳皮質細胞を9DIVに染色に用いた。37°Cに温めた10mM HEPESを含むDulbecco改変Eagle培地（HEPES-DMEM、pH7.4）で細胞を3回洗った後、0.5%パラホルムアルデヒド（in PBS）で1分間だけ固定を行なった。固定後HEPES-DMEMで数回洗い、抗体液を加えた。抗体は5%牛新生



仔血清 (NBCS) を含む HEPES-DMEM で 100 倍に希釈して、抗体液とした。抗体によるインキュベーションは 37°C 中で 15 分間行い、HEPES-DMEM で細胞を洗ってから、2 次抗体 (FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体) を反応させた。2 次抗体の場合も 5% NBCS を含む HEPES-DMEM で 500 倍に希釈し、抗体反応は 37°C 中 15 分間行なった。2 次抗体の反応後、4% パラホルムアルデヒド (in PBS) で反応後固定を行い、PermaFluor でカバーガラスをマウントして、蛍光顕微鏡 (Axioskop: Zeiss) で観察した。

#### B. 細胞内まで抗体を浸透させて染色する方法

細胞の内部まで抗体を入れて染色させるためには、細胞を洗った後 4% パラホルムアルデヒド (in PBS) で室温、30 分間固定をした。固定後細胞を PBS で洗い、抗体を細胞内によく透過させるためと抗体の非特異結合を除くため (Blocking) に 0.5% サボニン、5% ヤギ血清を含む PBS (Buffer G) で、37°C 中 15 分間インキュベートした。各抗体は 100 倍の希釈率で Buffer G で希釈した。1 次抗体をいれて 1 時間 37°C に置き、PBS にて洗った後、2 次抗体の反応を行った。2 次抗体は FITC 標識の抗ウサギ IgG 抗体を、Buffer G にて 500 倍希釈して用いた。2 次抗体を 37°C 1 時間反応させて PBS でよく洗ってから、PermaFluor 液でカバーガラスをマウントし、Axioskop (Zeiss 社) 蛍光顕微鏡を用いて観察、写真撮影を行った。

### 3-3. 実験結果

#### 3-3-1. ラット大脳皮質培養細胞に存在する

##### エクト・プロテインキナーゼ活性

細胞外に  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  を短時間だけ与え、ラベルの取り込まれる内在性のリン酸化基質をイメージングプレートと BAS-2000 によって解析したところ、 $^{32}\text{P}$  のとり込まれる複数のバンドが認められた (図 15A)。このリン酸化活性の基質のうち、最もよくラベルの取り込まれる主要なものは、SDS-ポリアクリルアミドゲル上

の分子量が、212KDa以上のところに2本、そして50KDaにくるバンドであった（図15A）。さらに、これらのバンドのリン酸化は、細胞内に透過しにくい<sup>42</sup>K-252bによって阻害を受けた（図15B）。K-252bによるリン酸化活性の阻害は、濃度依存的に強くなり、特に前述の3本のバンドのうち50KDaと最大分子量の2本のバンドは、全体の平均よりもさらに強い程度のリン酸化抑制が観察された（図16A）。これら2つの主要基質へのラベルの取り込みが時間的にどれくらいから観察されるかを検討すると、細胞外に[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATPを添加してから2.5分後にはすでに<sup>32</sup>Pのリン酸化バンドへの取り込みが観察された（図16B）。さらにこのラベルの取り込み量は、5分、10分とたつにつれて、増大した（図16B）。

### 3-3-2. 細胞外リン酸化反応の基質としての微小管関連タンパク質MAP1B

K-252bは、シナプス形成という細胞機能とリン酸化反応の両者を阻害したため、基質となるタンパク質にはシナプス形成に関与しているものが必ずあると考えられた。そこで、複数の基質の中からリン酸化が速やかに起こり、K-252bで著しく阻害され、かつSDS-PAGEのみで明瞭な単一バンドとして得られた最も高分子量(212KDa以上)の基質タンパク質を選び、その分子の同定を試みた。プロテアーゼ処理後のHPLCで得られた部分ペプチドのうち、4つのペプチドが質量分析計によって単一ピークとして確認されたため、まずこの4つについてアミノ酸配列を決定した（図17・図20）。その結果得られた4つのアミノ酸配列を、コンピューターによるホモロジー検索にかけると、4つ全てが微小管結合タンパク質の1種MAP1B<sup>87,88</sup>と一致する事が明らかとなった。電気泳動上の分子量もMAP1Bと一致するので、この基質タンパク質はMAP1Bであろうと結論した。

### 3-3-3. MAP1Bが細胞外ドメインをもっている可能性

これまで、MAP1Bは、微小管に付随して精製されてきたというような経緯から、膜貫通部位の検討が行なわれていなかった。これまでの研究の流れから、MAP1Bが膜タンパク質である可能性が考えられたので、通例のKyte & Doolittleの



hydrophobicity解析<sup>80)</sup>により膜貫通領域の予測を行なった。その結果、MAP1B分子のアミノ酸配列中、696番目から717番目までのアミノ酸部分は疎水性が高く、膜貫通領域となりうることが判明した(図21)。この可能性を確かめるために、より洗練された方法として美宅らの方法によるコンピューターを用いた膜貫通領域予測<sup>81)</sup>を行なった。この方法は、非常に多数の膜タンパク質の膜貫通部位の解析からえた、『膜貫通部位というものは、 $\alpha$ -helix構造をとり、かつ疎水性アミノ酸が $\alpha$ -helix上に二次元的に周期的に並んで両親媒精構造をとっている』という経験則を元に、コンピューターでアミノ酸配列の二次構造をシュミレーションして、先の二点に従って予測するというものである。こちらの結果でも、Kyte & Doolittleの方法で疎水性の高かった領域は、明瞭な膜貫通 $\alpha$ -helixであることが判明し、この領域が膜貫通領域である可能性が高められた(データは省略)。

MAP1Bが、細胞外ドメインをもっている可能性を証明するために、予測されるMAP1Bの細胞内、細胞外それぞれに対する抗体を用いて、免疫細胞染色を行なった。まず、市販されている抗MAP1B抗体によって、抗MAP2抗体との二重染色法によって染色を行なった(図18)。抗MAP1B抗体は、MAP2陽性のニューロンと思われる細胞の細胞体、突起などをMAP2と同様に染めた一方、MAP2と異なり、これらの細胞のバックグラウンドにも、ぼんやりとした染色像が得られた(図18)。さらにより詳細に、MAP1Bの細胞内、細胞外の問題を検討するために、それぞれの領域と考えられる部位に対する抗体で染色をした。固定をしてサポニンを用いた細胞内まで染色する条件では、細胞内と想定した領域に対して作製したペプチド抗体(4171-90)、細胞外と想定した領域に対して作製したペプチド抗体(4168-73)共に、ほぼ同様の染色像が得られた(図19)。これに対して、固定条件を弱くし、サポニンを用いない細胞の外側のみを染色する条件では、4171-90抗体では、ほとんど染色されなかったのに対して、4168-73抗体では細胞内まで染めた場合とは異なるものの、一部細胞とその突起の一部が染色された(図19)。

### 3-4. 考察

#### 3-4-1. 細胞外タンパク質をリン酸化する酵素活性の存在

細胞外に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を短時間だけ与え、ラベルの取り込まれる内在性のリン酸化基質タンパク質を調べたところ、 $^{32}\text{P}$ のとり込まれる複数のバンドが認められた(図15A)。ATPは、一般に細胞の外側から与えられた場合、細胞の内部には透過しないと考えられる。細胞外のATPは、エクトATPaseなどの酵素により、速やかにアデノシンと無機リンにまで分解され<sup>82)</sup>、両者は細胞内に取り込まれて再びATP合成のためにプールされる<sup>49,50)</sup>。本実験条件では、細胞外にラベルのATPを短い間だけ添加しており、しかも分解されて生じるラベルの無機リンが十分に希釈されるように、はるかに高濃度の非標識無機リンを反応時に加えている( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ が62.5nMに対して非標識ATP 5 $\mu\text{M}$ 、さらに非標識無機リンが1mM)。これらの条件とラベルが基質タンパク質に取り込まれる時間経過の速さ(図16B)から、 $^{32}\text{P}$ の取り込まれたのが細胞の中のタンパク質である可能性は低くなると考えられる。従って、図15Aに示したリン酸化活性は、細胞外で起こっている反応である可能性が高い。細胞外のリン酸化であるとする可能性は、このリン酸化活性がK-252b存在下で阻害されるという事実によって支持される(図15B)。プロテインキナーゼ阻害剤K-252bは、細胞の膜を非常に透過しにく<sup>42)</sup>いことがわかっており、この阻害剤の濃度依存的にラベルの取り込みが抑制される(図16A)ことから細胞外のリン酸化反応であることが示唆される。

表2に示したように、これまでにいくつかのグループがさまざまな細胞系を使い、いろいろな方法で細胞外に存在するタンパク質リン酸化活性を証明しようとしてきた<sup>51,52,64-78)</sup>。基本的にはみな細胞外に短時間のみ放射ラベルのATPを添加して電気泳動で解析した場合に、ラベルのリンが速やかに取り込まれるタンパク質バンドが観察されるという事実に基づいている。その他に、細胞を放射ラベルの無機リンと長時間インキュベートして細胞内のATPを標識させておいて細胞内のリン酸化パターンを見ると、全く異なるパターンを示すこと<sup>51,52,70,73)</sup>、また放射ラ



ベルの無機リンでATPと同じ短期間反応させただけではラベルの取り込みは見られないこと<sup>51)</sup>、細胞に影響しない程度の低濃度のトリプシンで細胞を処理するとリン酸化活性が消失すること<sup>51, 52, 67, 70-73)</sup>、ATPを分解するアピラーゼのような酵素を反応時に加えるとラベルの取り込みがなくなること<sup>71)</sup>などが証拠としてあげられている。さらに、カゼインやヒストンのようなタンパク質を外来性の基質として反応液に加え、反応後回収して調べると、これらのタンパク質にラベルの取り込みが見られ、内在性の基質タンパク質へのラベルの取り込み量は減少したという報告もある<sup>68, 70-75, 77)</sup>。これらの事実から、エクト・プロテインキナーゼの存在は、ほぼ確実と思われる。しかし、タンパク質の細胞外ドメインがリン酸化されていることを直接的に示した報告はなかった。最近、赤血球や血小板の系で、細胞外マトリックスのコラーゲンやトロンボスポンジンに対する受容体で、マラリアに感染した赤血球の内皮細胞への細胞接着にも関与しているとされるCD36という糖タンパク質の細胞外ループ中のスレオニンが、リン酸化・脱リン酸化を受けることで結合能などの機能が変化するという報告がなされた<sup>83)</sup>。site-directed mutagenesisの結果などから、この細胞外ループにリン酸化部位があり、この部位のリン酸化により機能変化が生じることはほぼ間違いない。しかし、この報告では、このリン酸化は生合成の過程で細胞内でプロテインキナーゼCによって行われ、細胞が刺激を受けたときに脱リン酸化酵素が細胞外に放出され、調節を受けているのではないかと考察している<sup>83)</sup>。またアルツハイマー病の病因とも関連して研究されている $\beta$ -アミロイドの前駆体蛋白質：amyloid precursor protein (APP)の細胞外ドメイン中のセリンがリン酸化され、APPの分泌に関与しているらしいことも、CD36と同様の手法を用いて証明されている<sup>84)</sup>。こちらはAPPのリン酸化の機構として、エクト・プロテインキナーゼの関与の可能性についても論じている<sup>84)</sup>。リン酸化反応の場がどこかという問題は置くにしても、タンパク質の細胞外ドメインにリン酸化されたアミノ酸が存在する<sup>85, 86)</sup>ことだけは確かであるといえる。

実は、細胞外にリン酸化アミノ酸が存在するかどうかという問題は、本研究で用いたLC/MS法の応用で決定できる<sup>85, 86)</sup>。HPLCで部分ペプチドを分離して質量分析計にかけた場合に、分離されたペプチドにリン酸化フォームと脱リン酸化フォームが混在していれば、リン酸化フォームは、脱リン酸化フォームに比べて、

80KDaだけ大きなピークを示すはずである。この方法により、リン酸化ペプチドが単離・同定できる。細胞外をリン酸化させる条件でこのようなリン酸化ペプチドが単離でき、その部分が細胞外であることさえ確実にすれば、細胞外のリン酸化のよい証拠となろう。今後の課題である。

### 3-4-2. エクト・プロテインキナーゼの基質としてのMAP1Bの同定

K-252bが培養大脳皮質ニューロン間のシナプス形成だけでなく、細胞外と思われるリン酸化反応をも抑制した（図15A、16A）ため、リン酸化基質の中にはシナプス形成に重要な役割を果たすタンパク質が必ず存在しているはずである。そのため、基質タンパク質の同定を試み、まず、リン酸化基質の主要なものの中から分子量の最も大きいバンドを選んだ。このバンドを選択したのは、リン酸化反応によるラベルの取り込みが強いこと（図15A）、K-252bによる阻害効果が顕著であること、そして1次元のみのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって比較的単一のバンドに分離できたと見えたことによる。ゲルより切り出したタンパク質バンドから、LC/MS法により4種類の部分ペプチドが単離できた（図17・20）。この4つのペプチドを気相アミノ酸シーケンサー（ABI 470A）で配列を調べ、コンピューターによるホモロジー検索にかけたところ、4つ全てが微小管関連蛋白質MAP1B<sup>(87,88)</sup>と一致することが判明した。リン酸化されているタンパク質は、同じバンド位置に混在する別のマイナーなタンパク質だという可能性も考えられるが、さらにいくつかのペプチドが得られたため、それらを分析したところ全てがMAP1Bの配列を示したことで、本研究のリン酸化条件でMAP1B中にリン酸化されていることが確実なペプチド部分が、LC/MS法により見つかったことなどからほぼ間違いないと思われる（データ省略）。



### 3-4-3. MAP1Bの膜タンパク質としての可能性・およびシナプス形成過程への関与についての検討

タンパク質の細胞外ドメインをリン酸化させる条件で、リン酸化されるタンパク質の一つを同定したところ、ホモロジー検索の結果、微小管関連タンパク質MAP1B<sup>87,88)</sup>であることが判明した<sup>89,90)</sup>。MAP1Bは、神経系の細胞骨格の成分として知られ<sup>91,92)</sup>、微小管同士をin vitroでもin vivoにおいても架橋している<sup>93)</sup>微小管関連タンパク質の一種(MAPs)であるが、おもしろいことにMAP2、MAP4、tauといった他の主要なMAPsが持っているような共通する微小管結合部位は持っていない<sup>89)</sup>。また、ニューロンの発生分化の時期、特に突起伸展の時期に発現量のピークを迎え、強くリン酸化されること<sup>94,95)</sup>や、そのリン酸化体が軸索部、特に先端の成長錐に多く分布すること<sup>93,97,98)</sup>などから、ニューロンの分化(おそらくシナプスの形成過程)に重要な役割を果たしている可能性が指摘されてきた。MAP1Bのニューロン分化への関与は、神経成長因子NGFによるPC12細胞の突起伸展作用を解析した結果からも支持されている。それらは、PC12細胞が突起を伸ばす際に、平行してMAP1Bの発現が上昇するという観察<sup>99)</sup>や、MAP1Bに対するアンチセンス・オリゴデオキシヌクレオチド処理によって突起伸展が阻害されるという報告<sup>100)</sup>などである。これらの事実より、MAP1Bは、ニューロンの分化、特にシナプス形成に関わる突起伸展に重要な役割を果たしていると考えられる。ところが、ここで本研究の結果から2つのことが問題となる。第1点は、そもそもの阻害剤K-252bを培養細胞に添加した場合に、シナプス形成が抑えられたが、そのとき突起の様子には著しい変化が見られなかったという結果である(第2章、図13)。MAP1Bが突起伸展に関与しており、K-252bによるシナプス形成の阻害がMAP1Bのリン酸化を抑えた結果であるならば、ニューロンから伸びる突起に変化が見られるはずである。第2点は後述するが、MAP1Bは従来微小管同士を架橋構造でつなぐ<sup>93)</sup>細胞内のタンパク質であると考えられており、本研究で述べてきた細胞外のリン酸化反応という現象とは矛盾するのではないか、という問題である。

第1点については、これまで以上に詳細にもう一度検討してみる必要があると思われる。光学顕微鏡のレベルでは観察できないもっと微細な変化がもしかした

ら起きている可能性はある。また、MAP1Bは、PC12細胞では突起伸展に重要<sup>100)</sup>であったが、本研究で用いた大脳皮質初代培養系ではむしろ突起伸展以降のシナプス形成過程に働いている可能性もないとはいえない。いずれにしろMAP1Bのシナプス形成への関与は他の方法によって証明しなければならない。MAP1Bに対する抗体や、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどによる機能阻害実験などによってMAP1Bがシナプス形成に関与しているかどうか、しているとすればどのようなかなどが明らかになるものと考えられる。MAP1Bは非常に強いリン酸化を受け、K-252bに対する感受性も高いのでシナプス形成に何らかの関与をしている可能性は高い。また、K-252bに感受性を持つリン酸化基質は他にもあるので、それらを同定していき、より総合的に考察すれば、シナプス形成のメカニズムについてさらに詳細に解明されると期待される。

次に、第1点を解決するためにも第2の問題は非常に本質的で、重要な問題である。MAP1Bは、taxol法という特殊な方法で微小管に付随して精製されてきた<sup>101)</sup>というような経緯から、cDNAクローニングの際にも膜貫通部位の検討が行なわれていなかった。これまでの研究の流れから、MAP1Bの膜蛋白質としての可能性が高いので、改めてアミノ酸配列を常法通りKyte & Doolittleのhydrophobicity解析<sup>80)</sup>し、その結果、MAP1Bアミノ酸配列中に1箇所、非常に疎水性の高い膜貫通領域と考えられる領域があり、その領域はmicrotubulesの結合部位と糖結合可能部位の間にあることが判明した(図21)。この領域をさらにコンピューターを用いた美宅らの方法による膜貫通部位予測<sup>81)</sup>によって解析したところ、その結果でもやはり、MAP1Bアミノ酸配列中のこの部位は、明瞭な膜貫通領域の性質をもっていることが判明した。従って、MAP1Bには細胞外ドメインが存在し、この部分のリン酸化によってシナプス形成に対して調節的な役割を果たしている可能性が示唆された。MAP1Bに細胞外ドメインが存在することを実験的に証明しようと、MAP1Bのいろいろな領域に対するペプチド抗体を作成し、免疫細胞染色を行なって検討した。その結果は、細胞外ドメインの存在を支持するものであった(図19)。細胞の外側に対応すると考えられるアミノ酸配列を元に作成した抗体のひとつ(4168-73)では、細胞を固定してサポニン処理をした条件(細胞全体の染色法)でも、ほとんど細胞を処理しない条件(細胞の外側だけ染色する方法)でも、染色像に差があるものの細胞が染色された(図19)。これ



に対して、細胞の内側に対する抗体(4171-90)では、細胞全体を染める条件でしか染色されなかった。このことは、MAP1Bに細胞外ドメインが存在する強力な証拠となる。4168-73抗体で固定のあるなしで染まり方に差があるのは、細胞内には生合成過程あるいは輸送過程にあるMAP1Bがあり、それらを染めたためか、あるいはMAP1Bには膜貫通型と従来からMAPsとして知られてきた細胞内のものと2形態存在しているのかもしれない。

しかしながら、従来蛋白レベルで研究されてきたMAP1Bは、微小管同士を架橋構造で結んでいることがin vitroでもin vivoにおいても証明されており<sup>93)</sup>、この点がどうしても本研究と矛盾する点である。一つの可能性として、従来蛋白質レベルで研究されてきたMAP1B<sup>91-93)</sup>と遺伝子クローニングされたMAP1B<sup>87,88)</sup>とは別のものであるのではないかということが考えられる。というのは、クローニング法に問題があるのである。MAP1BをはじめにクローニングしたCowanらのグループは、次のような手法でMAP1Bをクローニングした<sup>88)</sup>。Cowanらはまず微小管に付随して取れてくる蛋白をMAPsとして、この画分に対して抗体を作製した。そして、マウス脳のmRNAから発現ライブラリーを作製し、先の抗体を用いてスクリーニングを行った<sup>102)</sup>。その中の陽性クローンからフュージョン蛋白質を作り、その産物に対して抗体を作った。最終的なMAP1Bとしての確認は、この抗体を用いたWestern blotなどの結果が従来のMAP1Bと変わらないということでMAP1Bとしている<sup>88)</sup>。つまり、精製した蛋白としてのMAP1Bの部分アミノ酸配列との照合などは行っていないわけである<sup>88)</sup>。さらに、immunoblot法を使って調べた蛋白レベルのMAP1Bの発現は出生後発生が進むにつれて増大すること<sup>103,104)</sup>や、PC12細胞をNGF処理するとMAP1Bのレベルが上昇すること<sup>105,106)</sup>が報告されている。これに対して、クローニングされたMAP1Bは、mRNAの発現を見る限りはむしろ発現レベルは減少している<sup>102)</sup>。蛋白への翻訳レベルで調節を受けている可能性もあるが、Cowanたちは抗体を使っても調べ、その結果でもせいぜい同じレベルを保つ程度であった<sup>102)</sup>(ちなみに抗体を用いたデータは記載のみで図は示していない。)。またクローンから発現させた蛋白質を微小管とともに重合/脱重合の反復反応を繰り返していくと、MAP2などと異なりすぐに消失してしまうことも記載されている<sup>88)</sup>。これらクローニングされたMAP1Bと蛋白レベルでのMAP1Bとの相違点を考えると両者が別のものである可能性も考えられるわけである。

しかし一方では、クローニングされたcDNA配列のconstructをファイブプラスト系の株化細胞・COS cellに遺伝子導入し強制発現させると、その産物が微小管に沿って存在していたとする報告もある<sup>107)</sup>。またクローニングされたMAP1B sequenceは他のMAPsとの相同性は一般に低いが、MAP1A<sup>108,109)</sup>とは相同性を示す部分を共有している。両者の相同性をコンピューターを用いて調べてみると、全体のhomologyは14%程度であるが、MAP1B全アミノ酸配列<sup>87,88)</sup>中（マウスで2464アミノ酸、ラットで2364アミノ酸）、部分的に見るとN末側の300アミノ酸程度だけでは70%、最C末から100アミノ酸位では80%のhomologyを示した。またMAP1Bの微小管結合領域とされる部分と30%程度のhomologyを示すドメインがMAP1Aにも存在している<sup>108)</sup>。ただし、MAP1Aのこの領域はMAP1Bとの相同性から微小管結合領域と考えられていた<sup>110)</sup>が、この部分のcDNA constructをHela細胞に導入した結果では、微小管への結合能は認められず、MAP1Aの微小管結合ドメインはむしろ別の部分であることが示されている<sup>108)</sup>。MAP1B強制発現での結果や他のMAPs（MAP1A）との類似性の事実は、Cowanらのクローニングが正しかったことを示す証拠であるといえる。

Cowanらのクローニングが正しいとすれば、本研究で示唆されたこととの矛盾点を整合性をもって説明するのは現在のところ難しい。Cowanらのクローニングが従来のMAP1Bと違うものである、という可能性以外のものを考えると、1つにはMAP1Bは従来通りのタンパク質で、膜貫通などしていないという考え方がある。そうすると本研究で細胞外と考えてきたリン酸化反応も実は細胞の内部のものであるということになる。しかし、この考え方は抗MAP1B抗体による染色結果が正しければこれとは矛盾する。免疫電顕などによりMAP1Bの膜貫通の可能性の有無の決定、リン酸化条件の再検討などがこの可能性に対しては重要である。第2には本研究で問題となったリン酸化タンパク質が実はMAP1Bではなく、既知であるか未知であるかはわからないが違うものであったというものである。同定の手法として、まず1次元のみの電気泳動法での分離から出発しているので、複数のタンパク質がMAP1Bと同一バンド中に混在している可能性は否定できず、それが得られてしまったことはありえる。これらの問題は、本研究で用いたリン酸化反応条件でMAP1B分子中にラベルのリンが本当に取り込まれているかどうか調べれば明らかになると思われる。それにはすでに抗体が得られているので、



これを用いてリン酸化反応後に免疫沈降法などによりMAP1Bを集め、得られたMAP1Bにラベルが取り込まれたかどうかを見ればよい。また二次元電気泳動法によりMAP1Bの含まれるバンドをさらに分離することも有効な手法である。これらのことを行えば、これらの可能性に対して解答が得られるものと考えられる。第3の可能性は本研究で問題となったタンパク質がMAP1Bと極めてよく似ているが、異なるタンパク質であるとする考えである。MAP1BのN末部分のhomologとしてシビレイの電函シナプス小胞から単離されたENP1<sup>114)</sup>が、C末側から1/2ほどに対応するものとしてラット脳でneuraxin<sup>112,113)</sup>が報告されている。また、MAP1Bの最C末部は、MAPs軽鎖(LC1)として翻訳後proteolyticに産生されることが知られている<sup>114)</sup>。最近ではほ乳類centrosome中にMAP1Bとほとんど同一の(若干異なる)MAPsが存在することが示された<sup>115)</sup>。これらのことから、MAP1B分子は、alternative splicingあるいは翻訳後のプロテアーゼによる切断などで多様なアイソフォームが存在している可能性がある。それらの一部が膜貫通あるいは分泌されている可能性は考えられるかもしれない。以上のように、いくつかの可能性について述べたが、現時点においてはそのどれに対しても否定も肯定もできない。今後の更なる進展に負うところである。

最近、MAP1Bに膜貫通部が存在していること支持する報告がなされた<sup>116)</sup>。ニワトリのプロテオグリカン进行研究していたグループが、ニワトリの神経細胞接着やニューロンの突起伸展を阻害するプロテオグリカンを精製した。このプロテオグリカンは、ケラタン硫酸プロテオグリカンで、claustrinと名付けられた<sup>117)</sup>が、その後、コアタンパク質をクローニングしたところ、驚いたことに、MAP1Bと非常に高い相同性が見いだされた<sup>116)</sup>。claustrinはMAP1BのN末部分から1000アミノ酸位までの大きさのタンパク質であるが、その部分の相同性は75%前後にもなった(図20・21)。さらにclaustrinの膜貫通領域と考えられる部分、微小管結合領域糖鎖結合可能部位などは、ラット・マウスのMAP1Bでもよく保存されていた。ニワトリとネズミの種間差を考えると、claustrinはMAP1Bのhomologといってもよいような存在である。この事実は、MAP1Bが膜貫通の分子形態をとりうるということを強く支持すると思われる。MAP1Bは、膜貫通膜蛋白質として存在することができ、claustrinと同様プロテオグリカンとして機能している可能性も考えられる。

また、ペプチド性のプロテアーゼ阻害剤をニューロblastoma細胞の培養外液に加えたところ、突起伸展と共にMAP1Bのリン酸化もが誘導されたという報告<sup>118)</sup>もあり、MAP1Bと細胞外との相互作用にも興味を持たれる。

最後に、以上の結果とタンパク質のモチーフ構造データベースPROSITEを使ったMAP1Bアミノ酸配列からのコンピューター検索から、MAP1Bの分子モデルを図21にあげた。MAP1Bは、膜貫通領域を持ち、その細胞内直下に微小管結合部位が存在している。細胞外ドメインはC末側で、全体の2/3弱にわたり、糖鎖結合可能部位や、無数のリン酸化可能部位が存在している。これらのリン酸化可能部位の中で、カゼインキナーゼIIによるリン酸化可能部位は非常に数が多い。カゼインキナーゼII類似と考えられるリン酸化活性により、MAP1Bがニューロンの分化の時期にリン酸化されているという報告<sup>94)</sup>や、カゼインキナーゼIIに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞に添加するとMAP1Bのリン酸化とニューロンからの突起伸展が抑制されるという報告<sup>119)</sup>などがあり、エクト型タンパク質リン酸化酵素とカゼインキナーゼIIの関連も今後注目される。また、プロテオグリカンのコアタンパク質claustrinとの相溶性<sup>116)</sup>から、MAP1Bと細胞外マトリックスとの関係なども興味深い。claustrinが細胞内で微小管結合部位を介して微小管と相互作用をしていることも示唆されており、もしかしたら、MAP1Bは細胞外マトリックスと細胞内の細胞骨格とを連絡し、細胞外情報を細胞内に伝えるような重要な分子なのかもしれない。

### 3-5. 第3章 まとめ

ラット大脳皮質培養細胞には、細胞外に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を与えると、非常に速い時間経過（図16B）でラベルの取り込まれる細胞外と考えられるリン酸化活性が存在している（図15A）。このリン酸化活性はK-252bによって阻害を受けた（図15B、16A）。K-252bは、ラット大脳皮質ニューロン間のシナプス形成をも阻害することがわかっているので（第2章）<sup>12,13)</sup>、膜タンパク質の細胞外ドメインのE



クト・プロテインキナーゼによるリン酸化が、ニューロン間のシナプス形成において重要な役割を果たしていることが考えられた。従って、このリン酸化反応の基質となるタンパク質はシナプス形成に直接関与しているはずである。そこで、基質となる膜タンパク質の同定を試みた。はじめに、リン酸化基質のうち分子量がもっとも大きく、K-252bによってリン酸化が強く阻害されるバンドを選び、電気泳動で分離後ゲルから切り出し、LC/MS法によって部分ペプチドを単離した。これらのペプチドをシーケンサーにかけてアミノ酸配列を決定し、それに対してホモロジー検索をおこなったところ、微小管関連タンパク質MAP1Bであることが判明した。さらに、従来細胞内タンパク質であると考えられてきたMAP1Bに膜貫通部位の存在する可能性が示唆され（図21）、MAP1Bの部分ペプチドに対する抗体を用いた細胞染色法によってもこの可能性は支持された（図19）。MAP1Bについては、プロテオグリカンのコアタンパク質である、claustrinとの相同性も報告されており<sup>116)</sup>（図20・21）、細胞外ドメインを持つ可能性はますます高くなった。

### 3-6. 第3章の図

図15A. 細胞外 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ による培養ラット大脳皮質細胞タンパク質のリン酸化。  
 レーン1と2は無添加群。レーン3と4はK-252b  $2\mu\text{M}$ 存在下のパターンである。さらに、1と4はクマシーブルー染色、2と3はオートラジオグラフィーを示している。

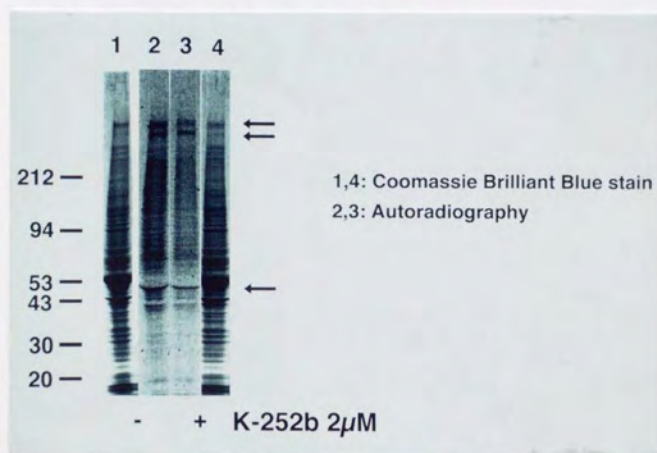




図15B. リン酸化された主要な3つのバンドに対するK-252bの効果。図15A中の矢印で示した3つのバンドへの $^{32}\text{P}$ の取り込みをImaging PlateとBAS2000を使って定量した。3つのバンドともK-252bの添加により $^{32}\text{P}$ の取り込みが阻害を受けていることがわかる。

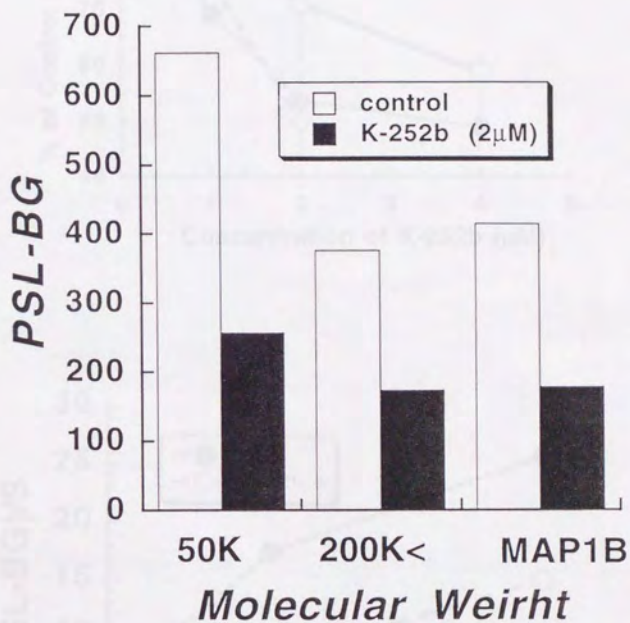


図16. A:細胞外リン酸化反応に対するK-252bの濃度依存的な効果。リン酸化タンパク質を電気泳動で分離し、イメージングプレートに露光、BAS-2000によって各バンドに取り込まれたラベルの量を定量した。○は全バンドの平均値、●は50KDaの主要バンド、◇は後にMAP1Bと同定された、最高高分子量のバンドを示す。B:細胞外リン酸化反応の時間経過。●◇はA図と同じ。

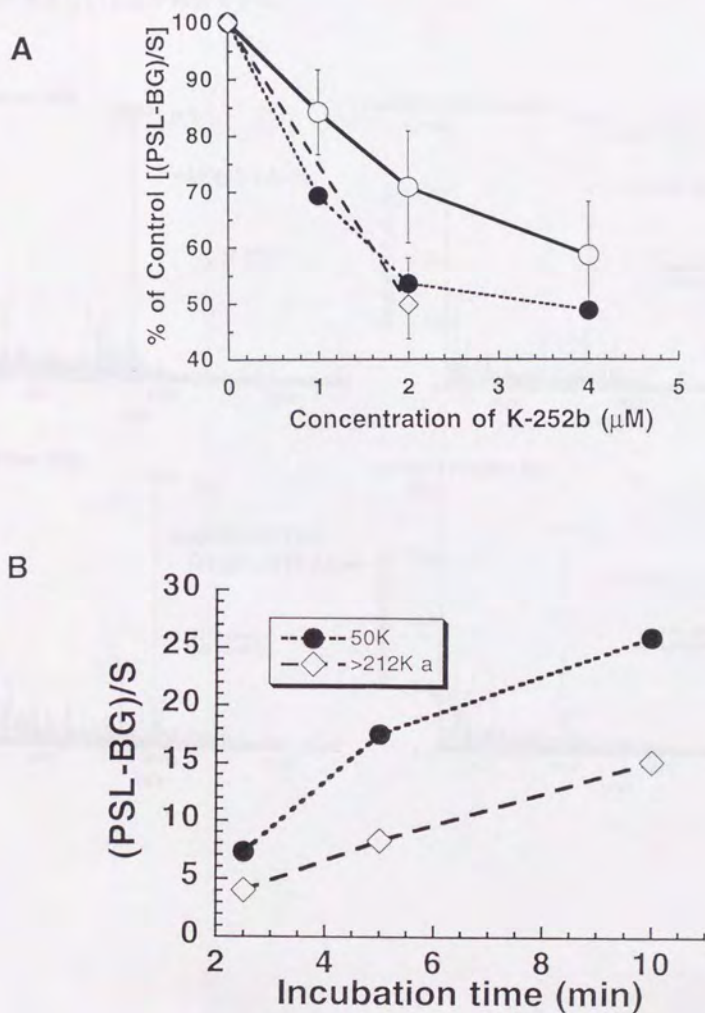




図17. ゲルからバンドを切り出して得られたタンパク質を限定分解し、HPLCで分離して得られた4つのペプチドのエレクトロスプレー式質量分析計によるマススペクトル。主要ピーク横の ( ) 数字はペプチドの荷電数を示し、+2なら2個イオンのシグナルであることを示す。これらのペプチドのアミノ酸配列は気相シーケンサーを使って決定した。(obs.)は質量分析で測定された値、(calc.)はシーケンサーで得られたアミノ酸配列から計算した値を示す。両者がよく一致するので、これらの配列が正しいことが確定できる。

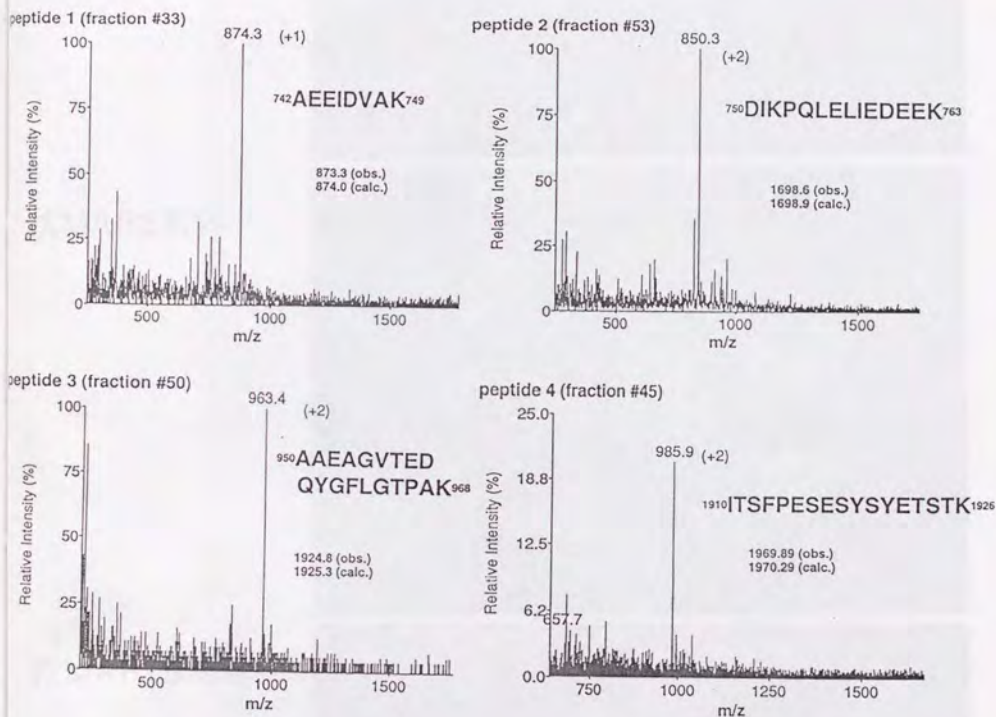
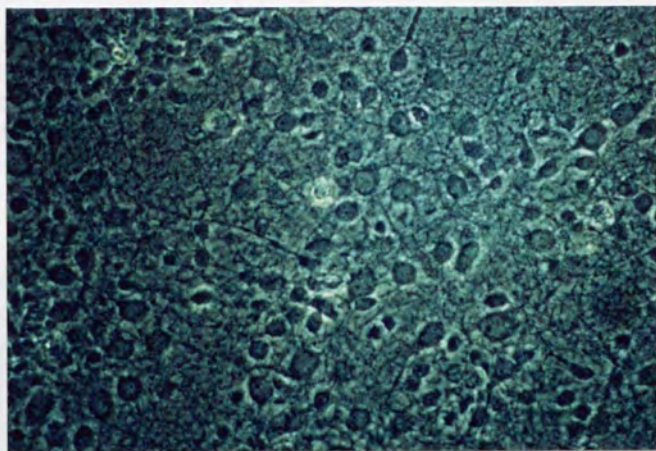
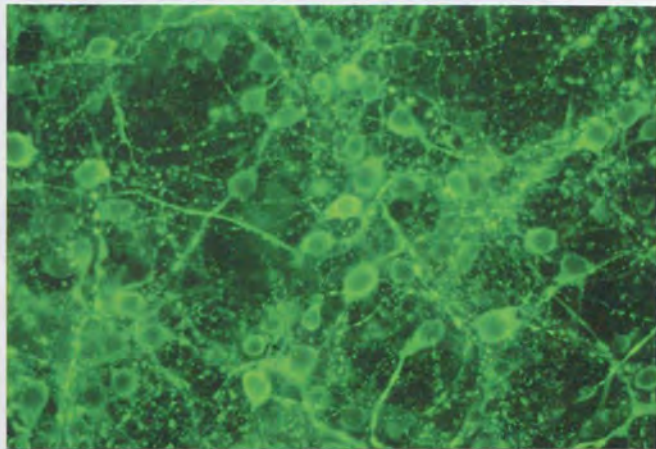


図18. ラット大脳皮質培養細胞の抗MAP2抗体、抗MAP1B抗体による染色（1）。両者は同じ細胞を染めているが、抗MAP1B抗体では、それ以外の背景にぼんやりとした染色像が見られる。

位相差



抗MAP2抗体



抗MAP1B抗体

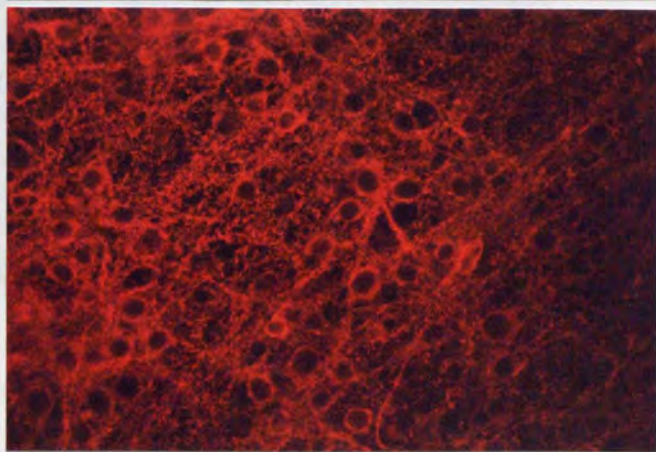
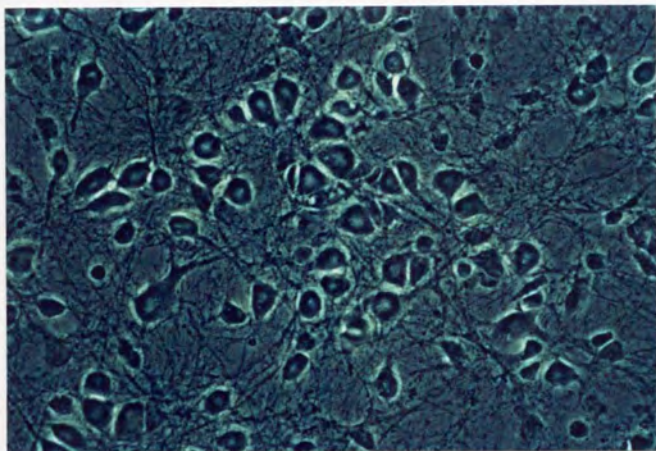




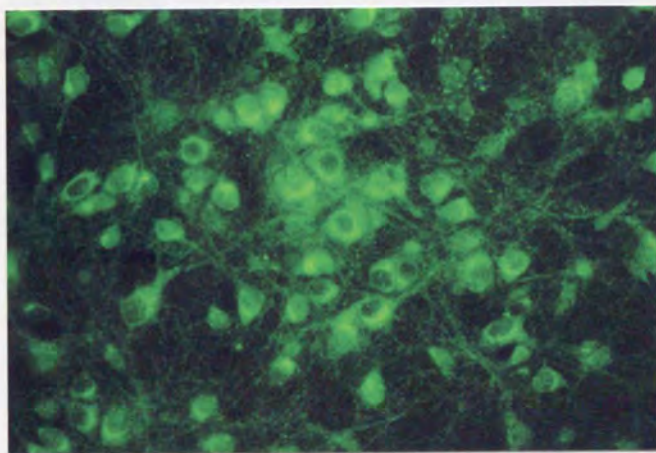
図19A,B. ラット大脳皮質培養細胞の抗MAP1B抗体による染色（2）。位相差像（A）とMAP1Bの細胞内領域と思われる部分に対する抗体：4171-90での染色像（B）。この染色では細胞内まで染色する条件として、固定した後サポニンで処理して抗体の細胞内への透過性を高めている。

4171-90抗体  
+ サポニン

A



B

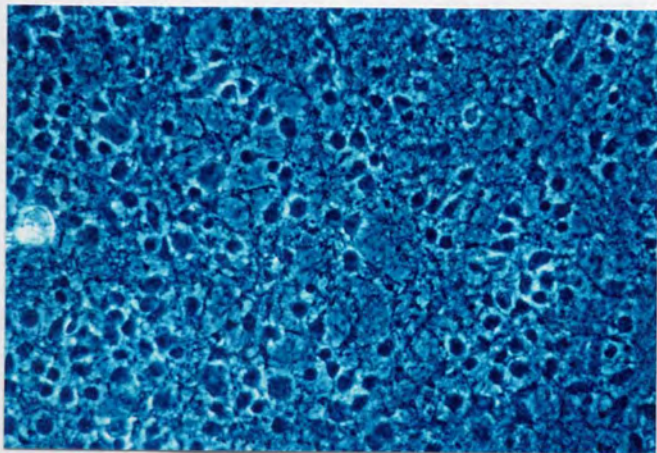


50  $\mu$ m

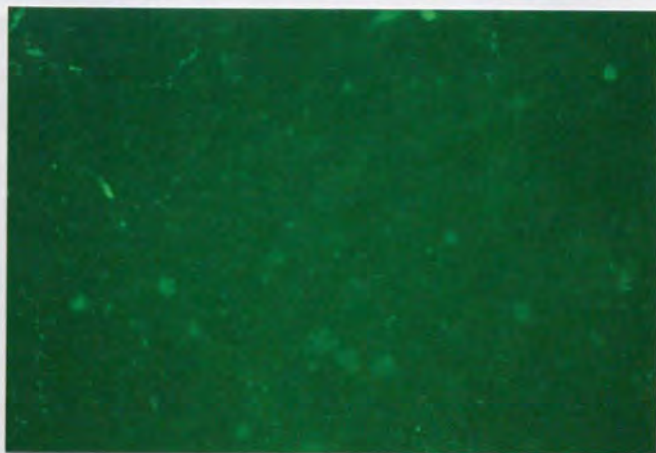
図19C,D. ラット大脳皮質培養細胞の抗MAP1B抗体による染色(2)。位相差像(C)とMAP1Bの細胞内領域と思われる部分に対する抗体:4171-90での染色像(D)。この染色では細胞外のみを染色する条件として、短時間固定のみでサポニン処理を行わずに染色している。この抗体を用いてもこの条件では細胞の染色像は得られなかった。

4171-90抗体  
- サポニン

C



D



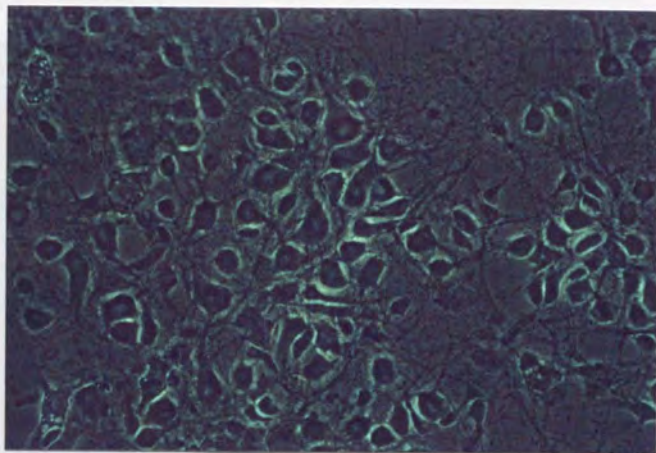
50  $\mu$ m



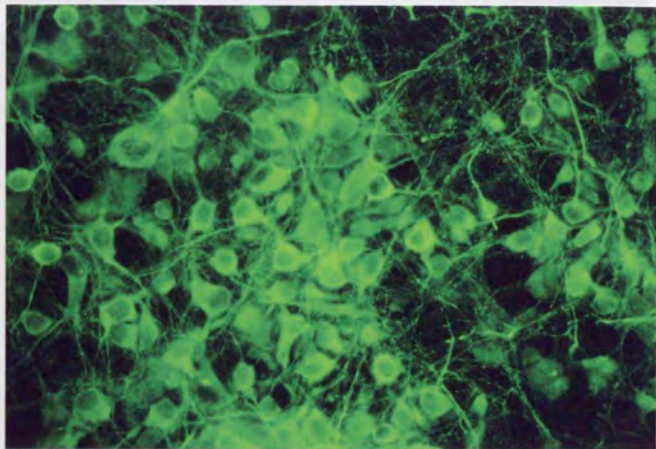
図19E,F. ラット大脳皮質培養細胞の抗MAP1B抗体による染色（2）。位相差像（E）とMAP1Bの細胞外領域と思われる部分に対する抗体：4168-73での染色像（F）。この染色では細胞内まで染色する条件として、固定した後サポニンで処理して抗体の細胞内への透過性を高めている。同じ条件で4171-90抗体（図19A-D）を用いた場合とほぼ同じ様な染色像が得られた。

4168-73抗体  
+ サポニン

E



F

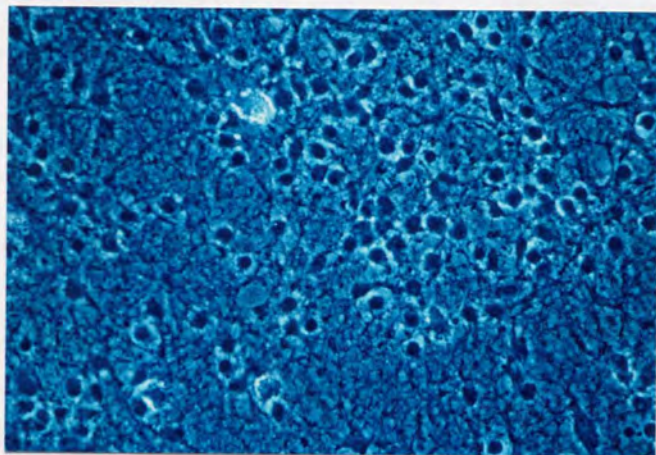


50  $\mu$ m

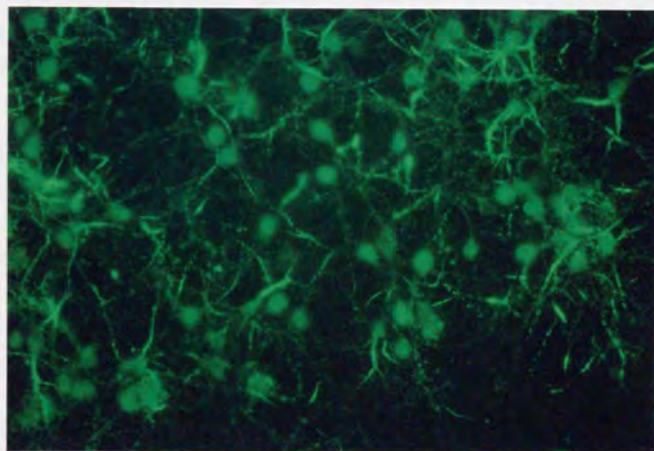
図19G,H. ラット大脳皮質培養細胞の抗MAP1B抗体による染色(2)。位相差像(G)とMAP1Bの細胞外領域と思われる部分に対する抗体:4168-73での染色像(H)。この染色では細胞外のみを染色する条件として、短時間固定のみでサポニン処理を行わずに染色している。4171-90抗体を用いた場合(図19C,D)と異なり、MAP1Bの細胞外ドメインを認識すると思われるこの抗体を用いて染色すると、この条件でも細胞の染色像が得られた。

4168-73抗体  
- サポニン

G



H



50  $\mu$ m



図20. ラット及びマウスのMAP1Bとニフトリケラタン硫酸プロテオグリカンのコアタンパク質claustrinのアミノ酸配列の比較。

MAP1B(mouse)	1	MATVVVEATE	PEPSGSIGNP	AASTSPSLSH	RFLDSKFYLL	VVVGTEVTEE	50
claustrin(chick)	1	MATVVVEA-D	SEPSCSLPNP	AAP-SPSLSH	RFLDSKFYLL	VVIGELVTEE	48
MAP1B(rat)						....GQKIL	5
MAP1B(mouse)	51	HLRRAIGNIE	LGIRSWDTNL	IECNLDQELK	LFVSRHSARF	SPEVPQGKIL	100
claustrin(chick)	49	HLRRAIANIE	RGIRSWDTNL	IECNLDQELK	LFVSRHSARF	SPEVRGQKIL	98
MAP1B(rat)	6	HHRSDVLETV	VLINPSDEAV	STEVRLMITD	AARHKLLVLT	GQCFFENTGEL	55
MAP1B(mouse)	101	HHRSDVLETV	VLINPSDEAV	STEVRLMITD	AARHKLLVLT	GQCFFENTGEL	150
claustrin(chick)	99	HHRSDVLETV	VLINPSDEAV	STEVRLMITD	AARHKLLVLT	GQCFFENTGEL	148
MAP1B(rat)	56	ILQSGSFSFQ	NFIEIFTDQE	IGELLSTTHP	ANKASLTFLC	PEEGDWKNSN	105
MAP1B(mouse)	151	ILQSGSFSFQ	NFIEIFTDQE	IGELLSTTHP	ANKASLTFLC	PEEGDWKNSN	200
claustrin(chick)	149	ILQSGSFSFQ	NFIEIFTDQE	IGELLSTTHP	ANKASLTFLC	PEEGDWKNSN	198
MAP1B(rat)	106	LDRHNLQDFI	NIKLNASAIL	PEMEGLSEFT	EYLSSESVEVP	SPFDILEPPT	155
MAP1B(mouse)	201	LDRHNLQDFI	NIKLNASAIL	PEMEGLSEFT	EYLSSESVEVP	SPFDILEPPT	250
claustrin(chick)	199	LDRHNLQDFI	NIKLNSSSIL	PEMEGLSEFT	EYLSSESVEVP	SPFDILEPPT	248
MAP1B(rat)	156	SGGFLKLSKP	CCYIFPGGRG	DSALFAVNGF	NMLINGGGER	KSCFWKLIRH	205
MAP1B(mouse)	251	SGGFLKLSKP	CCYIFPGGRG	DSALFAVNGF	NMLINGGGER	KSCFWKLIRH	300
claustrin(chick)	249	SGGFLKLSKP	CCYIFPGGRG	DSALFAVNGF	NMLINGGGER	KSCFWKLIRH	298
MAP1B(rat)	206	LDRVDSILLT	HIGDDNLPGL	NSMLQRKIAE	LEEE-SQGST	SNSDWMKNLI	254
MAP1B(mouse)	301	LDRVDSILLT	HIGDDNLPGL	NSMLQRKIAE	LEEE-SQGST	SNSDWMKNLI	350
claustrin(chick)	299	LDRVDSILLT	HIGDDNLPGL	NSMLQRKIAE	LEEE-SQGST	TNSDWMKNLI	348
MAP1B(rat)	255	SPDLGVVFLN	VPENLKN--P	EPNIKMKRSI	EEACFTLQYL	NKLSMKPEPL	302
MAP1B(mouse)	351	SPDLGVVFLN	VPENLKN--DP	EPNIKMKRSI	EEACFTLQYL	NKLSMKPEPL	398
claustrin(chick)	349	SPDLGVVFLN	VPENLKNMDP	--SFRVKRSV	EEACFTLQYL	NKLSMKPEPL	396
MAP1B(rat)	303	FRSVGNATIEP	VILFQKMGVG	KLKMYVLNPV	KSSKEMQYFM	QQWTGTNKDK	352
MAP1B(mouse)	399	FRSVGNATIEP	VILFQKMGVG	KLKMYVLNPV	KSSKEMQYFM	QQWTGTNKDK	448
claustrin(chick)	397	FRNVGNATIDP	VILFQKMGVG	KLKMYVLNPV	KSSKESKYFM	HQWSGTSKDK	446
MAP1B(rat)	353	AE-LILPNGQ	EVDIPISYLA	SVSSLIVWHP	ANPAEKIIRV	LFPGNSTQYN	401
MAP1B(mouse)	449	AE-LILPNGQ	EVDIPISYLT	SVSSLIVWHP	ANPAEKIIRV	LFPGNSTQYN	497
claustrin(chick)	447	AEFL-LPNGQ	ELDIPLSYFT	SVSSLIVWHP	ANPAEKIIRV	LFPGNSTQYN	495
MAP1B(rat)	402	ILEGLEKLKH	LDFLKQPLAT	QKDLTGQV-S	TPPVKQVKLK	QRADSRESLK	450
MAP1B(mouse)	498	ILEGLEKLKH	LDFLKQPLAT	QKDLTGQV-P	TPPVKQVKLK	QRADSRESLK	546
claustrin(chick)	496	ILEGLEKLKH	LDFLKQPMVT	QKDLTGNIAS	-PAVKQAKLK	QRADSRESLK	544
抗体4171-90							
MAP1B(rat)	451	PA---TKPL	SSKSVR--KE	SKEEAPKATK	A-S-Q--V--	-EKTP-KVES	486
MAP1B(mouse)	547	PA---TKPV	ASKSVR--KE	SKEETPEVTK	T-S-Q--V--	-EKTP-KVES	582
claustrin(chick)	545	PAAKTTTKQD	CQK--RNLK-	-K-----K	HWSLQSLVQK	LEK-PQKLES	582
MAP1B(rat)	487	KEKVIKDKD	PGKVESKPSV	TEKEVPSKEE	QSPVKAEEVAE	KAATES---K	533
MAP1B(mouse)	583	KEKVLKDKD	PKVTEKPSV	TEKEVSSKEE	QSPVKAEEVAE	KQATES---K	629
claustrin(chick)	583	KEKTPVKKEK	AVKPKTKTIV	AEKDVTTKEE	QLG-KSETSE	KQASEKQDVK	631
MAP1B(rat)	534	PKVTDKDVVK	KEIKTKPEEK	K-E-EKPKKE	VAKKEDKTPL	-KKDEKPKKE	580
MAP1B(mouse)	630	PKVTDKDVVK	KEIKTKLEEK	K-E-EKPKKE	VAKKEDKTPL	-KKDEKPKKE	676
claustrin(chick)	632	PKVTKESVK	KEVKAKPEEK	KDEKPKPKKE	VSKKEEK-PL	IKKEKPKKE	680

MAP1B(rat)	581	EAKKEIKKEI	KKEEKELKK	EVKKETPLKD	AKKEVKKDEK	KEVKKEEKEP	630
MAP1B(mouse)	677	EVKKEIKKEI	KKEERKELKK	EVKKETPLKD	AKKEVKKEEK	KEVKKEEKEP	726
claustrin(chick)	681	DIKKEVKKKEV	KKEEKKEAKK	EVKKEAPPKE	AKKEVKKEEK	REIKKEEKEV	730

MAP1B(rat)	631	KKEIKKISKD	IKKSTPL-SD	T--KKPAALK	PKVAKKEEPT	KKE--PIAAG	675
MAP1B(mouse)	727	KKEIKKISKD	IKKSTPQ-SD	T--KKPSALK	PKVAKKEEST	KKE--PLAAG	771
claustrin(chick)	731	KKDIKKVPKE	IKK-TPTPS-	TEAKKPAA-K	PKPQKKEPA	KKEAVP--AG	775

膜貫通領域と予想される部位

MAP1B(rat)	676	KLKDKGKVK-	VIKKEGKTTE	A--A-ATAVG	TAA--VAA--	-AAGVAASGP	716
MAP1B(mouse)	772	KLKDKGKVK-	VIKKEGKTTE	A--A-ATAVG	TAATT-AAVV	AAAGIAASGP	816
claustrin(chick)	776	KAKEKGKIKT	V-KKESKVS	AQTALA-AVG	AAATTVAAV-	AAAEITASG-	821

図17のpeptide 1 図17のpeptide 2

MAP1B(rat)	717	AKLEAERSL	MSSPEDLTGD	FEELKAE--	-IDVAKDIKP	QLELIEDEEK	763
MAP1B(mouse)	817	VKELEAERSL	MSSPEDLTGD	FEELKAE--	-IDVAKDIKP	QLELIEDEEK	863
claustrin(chick)	822	-KELEAERSL	MSSPEDLTGD	FEELKAEVE	TI---KATRP	QVALIEDELK	867

MAP1B(rat)	764	LKET--EPGE	AY-VIQUET-	--EVSKGS	AE SPDEGITTTT	GECECEQTPE	807
MAP1B(mouse)	864	LKET--QPGE	AY-VIQUET-	--EVSKGS	AE SPDEGITTTT	GECECEQTPE	907
claustrin(chick)	868	L--TGKEHKD	AFEV-QKEKL	DNE--GP	AE SSDEGITTTT	AECECEQTPE	911

MAP1B(rat)	808	ELEPVEKQGV	DDIEKFDEGD	AGFEESSEAG	DYEEKAETEE	AEEPEEDGED	857
MAP1B(mouse)	908	ELEPVEKQGV	DDIEKFDEGD	AGFEESSETG	DYEEKAETEE	AEEPEEDGED	957
claustrin(chick)	912	ELEPVEKQGV	DDIEKFDEGD	TGLEESSEAG	DYEEKAETEE	AEE---RGED	958

MAP1B(rat)	858	NVSGSASKHS	PTDEEIAKA	EADVHIKEKR	ESVASGDDRA	EEDMDEALEK	907
MAP1B(mouse)	958	NASGSASKHS	PTEDDESACA	EADVHLKEKR	ESVVSAGDDRA	EEDMDVLEK	1007
claustrin(chick)	959	EEETPLDAT	KPYMEEARRI	HDYSDEIMSE	ADANIKDEKY	TEKADYETSD	1008

MAP1B(rat)	908	GEAEQSEEEG	EEEEKAEDA	REEDHEPDKT	EAEDYVMVAV	DKAAEAGVTE	957
MAP1B(mouse)	1008	GEAEQSEEEG	EEE-DKAEDA	REEGYEPDKT	EAEDYVMAVA	DKAAEAGVTE	1056
claustrin(chick)	1009	ERAEEDREEA	VEKAETEETE	EEEEEDKVEDN			1038

図17のpeptide 3

MAP1B(rat)	958	DQYDFLGTPA	KQPGVQSPSR	EPASSIHDET	LPGGSESEAT	ASDEENREDQ	1007
MAP1B(mouse)	1057	EQYGYLGTPA	KQPGVQSPSR	EPASSIHDET	LPGGSESEAT	ASDEENREDQ	1106

抗体4168-73

MAP1B(rat)	1008	PEEFTATSGY	TQSTIEISSE	PTPMDMSTP	RDVMTDETNN	EETESPSQEF	1057
MAP1B(mouse)	1107	PEEFTATSGY	TQSTIEISSE	PTPMDMSTP	RDVMSDETNN	EETESPSQEF	1156

MAP1B(rat)	1058	VNITKYESSL	YSQEYSKPVV	ASFNGLSGDS	KTDATDGRDY	NASASTISPP	1107
MAP1B(mouse)	1157	VNITKYESSL	YSQEYSKPAV	ASFNGLSGDS	KTDATDGDY	NASASTISPP	1206

MAP1B(rat)	1108	SSMEEDKFSK	SALRDAYRPE	ETDVKTGAEL	DIKDVSDERL	SPAKSPSLSP	1157
MAP1B(mouse)	1207	SSMEEDKFSK	SALRDAYCSE	EKELKASAE	DIKDVSDERL	SPAKSPSLSP	1256

MAP1B(rat)	1158	SPPSPIEKT	LGERSVNFSL	TPNEIKASAE	GEATAVVSPG	VTQAVVEEHC	1207
MAP1B(mouse)	1257	SPPSPIEKT	LGERSVNFSL	TPNEIKVSAE	GEARSV-SPG	VTQAVVEEHC	1305

MAP1B(rat)	1208	ASPEEKTLEV	VSPSQSVTGS	AGHTPPYQSP	TDEKSSHLPT	EVTEAQAQVP	1257
MAP1B(mouse)	1306	ASPEEKTLEV	VSPSQSVTGS	AGHTPPYQSP	TDEKSSHLPT	EVSENAQAQVP	1355



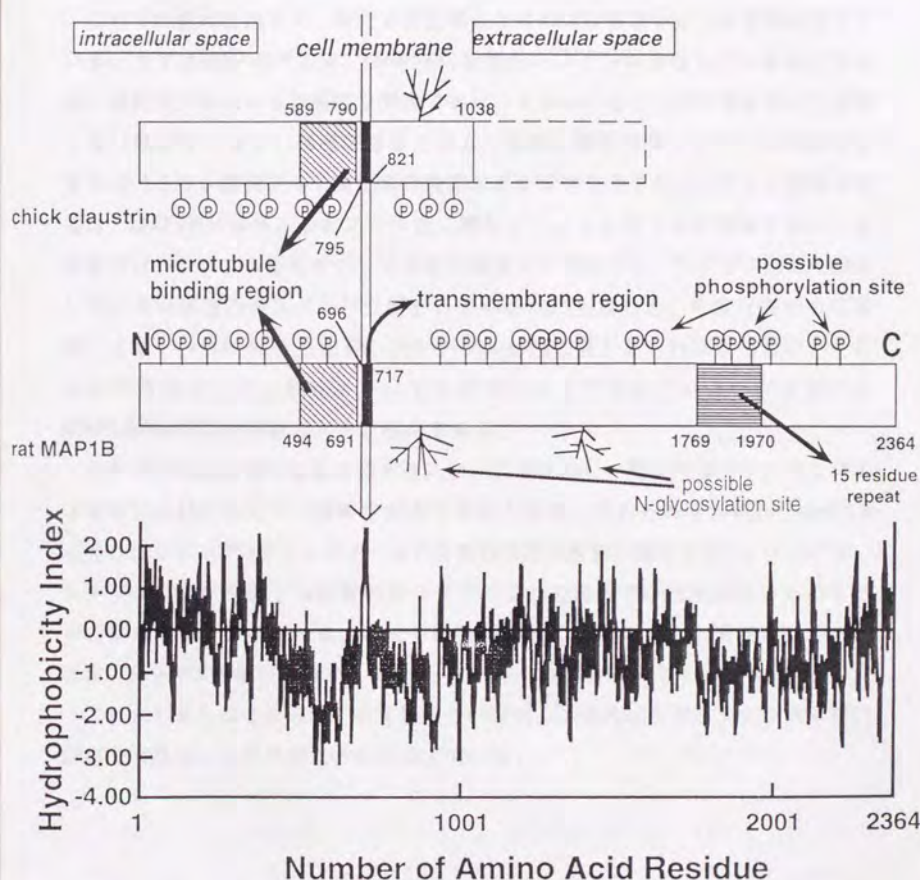
MAP1B(rat)	1258	VSFEFTEAKD ENERSSISPM DEVPDSESP	IEKVLSPLRV PPLIGSESAY	1307
MAP1B(mouse)	1356	VSFEFSEAKD ENERASLSPM DEVPDSESP	VEKVLSPLRV PPLIGSESPY	1405
MAP1B(rat)	1308	EDFLSADDKA LGRRSESPFE GKNGKQGFS	KESPVSDLTS D-LYQDKQEE	1356
MAP1B(mouse)	1406	EDFLSADSKV LGRRSESPFE GKNGKQGF	RESPVSDLTS TGLYQDKQEE	1455
MAP1B(rat)	1357	KRAGFIPIKE DFSPEKKASD AEIMSSQSAL	ALDERKLGGD GSPTQVDVSD	1406
MAP1B(mouse)	1456	KSTGFIPIKE DFGPEKKTSD VETMSSQSAL	ALDERKLGGD VSPTQIDVSD	1505
MAP1B(rat)	1407	FGSFKEDTKM SISEGTVSDK SATPVDEG-A	EDTYSHMEGV ASVSTASVAT	1455
MAP1B(mouse)	1506	FGSFKEDTKM SISEGTVSDK SATPVDEGVA	EDTYSHMEGV ASVSTASVAT	1555
MAP1B(rat)	1456	SSFPEPTDD VSPSLHAEVG SPHSTEVDSD	LSVSVVQTPT TFQETEMSPS	1505
MAP1B(mouse)	1556	SSFPEPTDD VSPSLHAEVG SPHSTEVDSD	LSVSVVQTPT TFQETEMSPS	1605
MAP1B(rat)	1506	KEECPRPMSI SPPDFSPKTA KSRTPVQDHR	SEQSSMSIEF GQESPEHSLA	1555
MAP1B(mouse)	1606	KEECPRPMSI SPPDFSPKTA KSRTPVQDHR	SEQSSMSIEF GQESPEHSA	1655
MAP1B(rat)	1556	MDFSQRQSPDH PTVGAGMLHI TENGTEVDY	SPSDIQDSSL SHKIPTEEP	1605
MAP1B(mouse)	1656	MDFSQRQSPDH PTLGASVLHI TENGTEVDY	SPCDIQDSSL SHKIPTEEP	1705
MAP1B(rat)	1606	SYTQDNDLSE LISVSQVEAS PSTSSAHTPS	QIASPLQEDT LSDVVPPRDM	1655
MAP1B(mouse)	1706	SYTQDNDLSE LISVSQVEAS PSTSSAHTPS	QIASPLQEDT LSDVVPPRDM	1755
MAP1B(rat)	1656	SLYASLASEK VQSLEGEKLS PKSDISPKLS	RESSPTYSPG FSDSTSGAKE	1705
MAP1B(mouse)	1756	SLYASLASEK VQSLEGEKLS PKSDISPLTP	RESSPLYSPG FSDSTSAAKE	1805
MAP1B(rat)	1706	STAAY-QTSS SPPIDAAAAE PYGFRSSMLF	DTMQHHLALS RDLTSSVEK	1754
MAP1B(mouse)	1806	-TAAAHQASS SPPIDAATAE PYGFRSSMLF	DTMQHHLALN RDLTSSVEK	1854
MAP1B(rat)	1755	DNGGKTPGDF NYAYQKPEST TESPDEEDYD	YESHEKTIQA HDVGGYYEYK	1804
MAP1B(mouse)	1855	DSGGKTPGDF NYAYQKPENA AGSPDEEDYD	YESQEKTIQT HDVVRYEYK	1904
MAP1B(rat)	1805	TERTIKSPCD SGYSYETIEK TTKTPEDGGY	SCEITEKTTR TPEEGGYSYE	1854
MAP1B(mouse)	1905	TERTIKSPCD SGYSYETIEK TTKTPEDGGY	TCEITEKTTR TPEEGGYSYE	1954
MAP1B(rat)	1855	ISEKTTRTPE VSGYTYEKTE RSRRLDDIS	NGYDDTEDGG HTLGDCSYSY	1904
MAP1B(mouse)	1955	ISEKTTRTPE VSGYTYEKTE RSRRLDDIS	NGYDDTEDGG HTLGDCSYSY	2004
□17のpeptide 4				
MAP1B(rat)	1905	ETTEKITSFP ESESYSYETS TKTRSPDTS	AYCYETMEKI TKTPQASTYS	1954
MAP1B(mouse)	2005	ETTEKITSFP ESESYSYETS TKTRSPDTS	AYCYETMEKI TKTPQASTYS	2054

MAP1B(rat)	1955	YETSDRCYTP	ERKSPSEARQ	DVDLCLVSSC	EFKHPKTELS	PSFINPNPLE	2004
MAP1B(mouse)	2055	YETSDRCYTT	EKKSPSEARQ	DVDLCLVSSC	EFKHPKTELS	PSFINPNPLE	2104
MAP1B(rat)	2005	WFAGEEPTTE	SERPLTQSGG	APPPSGGKQQ	GRQCDETPPT	SVSESAPSQT	2054
MAP1B(mouse)	2105	WFAGEEPTTE	SEKPLTQSGG	APPPSGGKQQ	GRQCDETPPT	SVSESAPSQT	2154
MAP1B(rat)	2055	DSDVPPETEE	CPSITADANL	DSEDESETIP	TDKTVTYKHM	DPPPAPMQDR	2104
MAP1B(mouse)	2155	DSDVPPETEE	CPSITADANI	DSEDESETIP	TDKTVTYKHM	DPPPAPMQDR	2204
MAP1B(rat)	2105	SPSPRHPDVS	MVDPEALAE	QNLGKALKKD	LKEKAKTKKP	GTKTKSSSPV	2154
MAP1B(mouse)	2205	SPSPRHPDVS	MVDPDALAVD	QNLGKAVKKD	LKEKTKTKKP	GTKTKSSSPV	2254
MAP1B(rat)	2155	KKGDGKSKPS	AASPKPGALK	ESSDKVSRVA	SPKKKESVEK	AMKTTTTPEV	2204
MAP1B(mouse)	2255	KKGDGKSKPL	AASPKPGALK	ESSDKVSRVA	SPKKKESVEK	ATKTTTTPEV	2304
MAP1B(rat)	2205	KATRGEEKDK	ETKNAANASA	SKSVKTATAG	PGTTKTAKSS	TVPPGLPVYL	2254
MAP1B(mouse)	2305	KATRGEEKDK	ETKNAANASA	SKSAKTATTG	PGTTKTAKSS	TVPPGLPVYL	2354
MAP1B(rat)	2255	DLCYIPNHSN	SKNVDVEFFK	RVRSSYYVVS	GNDPAAEEPS	RAVLDALLEG	2304
MAP1B(mouse)	2355	DLCYIPNHSN	SKNVDVEFFK	RVRSSYYVVS	GNDPAAEEPS	RAVLDALLEG	2404
MAP1B(rat)	2305	KAQWGSNMVQ	TLIPTHDSEV	MREWYQETHE	KQQDLNIMVL	ASSSTVVMQD	2354
MAP1B(mouse)	2405	KAQWGSNMVQ	TLIPTHDSEV	MREWYQETHE	KQQDLNIMVL	ASSSTVVMQD	2454
MAP1B(rat)	2355	ESFPACKIEL					2365
MAP1B(mouse)	2455	ESFPACKIEL					2465

膜貫通領域と予想される部分、抗体4171-90及び4168-73の作成時に抗原に用いたペプチド配列部分、LS/MS法により単離した4つのペプチド部分(図17)について図示した。



図21. Kyte & Doolittleの解析に基づいたhydrophobicity blot (下) とMAP1Bの分子構造モデル (中)。Kyte & Doolittleの解析によりアミノ酸696から717までは非常に疎水性が高く、膜貫通領域と考えられる。この部分はMAP1Bと非常に相同性の高い、ニワトリ脳から見出されたケラタン硫酸プロテオグリカンclaustrinのコアタンパク質でもよく保存されている。この部分を挟んで、微小管結合部位が細胞内にくるようなモデルを想定した。Claustrinの分子構造についても表示した(上)。リン酸化可能部位と糖鎖結合可能部位 (N-glycosylation site) は、タンパク質のモチーフ構造のデータベースPROSITEを用いたコンピュータプログラムにより検索した。



## おわりに

本論文でシナプス形成のアクセシ系の開発、この系を用いてのシナプス形成を阻害する薬剤K-252bのスクリーニング、K-252bの標的となるエクト・プロテインキナーゼ活性の存在とその基質タンパク質の1つとしてのMAP1Bの同定などについて論じてきた。さらに、従来微小管結合蛋白質の1つとされてきたMAP1Bに細胞外ドメインが存在する可能性まで示唆された。

これらの結果を踏まえ、まだまだ証明しなければならないことが多数存在している。まずはMAP1Bである。MAP1Bに細胞外ドメインが存在しているかどうかは、本研究の流れからは重要な問題であり、さらにいろいろな手法を用いて証明しなければならない。免疫電顕などでより微細に解析することや、K-252bで阻害を受けるリン酸化アミノ酸部位の決定などができそうである。さらに重要な問題は、MAP1Bが本当にシナプス形成に関与しているかどうかの証明である。本研究では、シナプス形成のアクセシ系の開発から出発して、シナプス形成に関与している可能性のあるタンパク質としてMAP1Bに到達した。今度は逆からの証明、すなわちMAP1Bから出発してシナプス形成に至らなければならない。そのための方法として、抗体またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたMAP1Bの機能阻害実験などを計画中である。

シナプス形成過程には実に様々なステップが存在し、関与する分子メカニズムは非常に多岐にわたり、複雑であると考えられる。そのため1つには、MAP1B以外のエクト・プロテインキナーゼの基質の同定は重要な意味を持つ。2つには、シナプス形成に影響する物質のスクリーニングの過程でK-252b以外にもいくつかの候補をすでに得ている。これらの物質からK-252bのように研究を進めていけば、シナプス形成に関与するまた違ったメカニズムが見えてくるかもしれない。

これからさらにこれらのことを進めていけば、おぼろげながらシナプス形成の端緒でも見出せるのではないかと考えている。



## 引用文献

1. Cotman, C.W., Nieto-Sampedro, M. & Harris, E.W.: Synapses replacement in the nervous system of adult vertebrate., *Physiol.Rev.*, **61** (1981) 684-784.
2. Lee, K.S., Schottler, F., Oliver, M. & Lynch, G.: Brief burst of high-frequency stimulation produce two types of structural change in rat hippocampus., *J.Neurophysiol.*, **44** (1980) 247-258.
3. Desmond, N.L. & Levy W.B.: Synaptic correlates of associative potentiation/depression: an ultrastructural study in the hippocampus., *Brain Res.*, **265** (1983) 21-30.
4. Chang, F.-L. & Greenough, W.T.: Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice., *Brain Res.*, **309** (1984) 35-46.
5. Tsukahara, N.: Synaptic plasticity in the mammalian central nervous system., *Ann.Rev.Neurosci.*, **4** (1981) 351-379.
6. Tsukahara, N. & Oda, Y.: Appearance of new synaptic potentials at cortico-rubral synapses after the establishment of classical conditioning., *Proc.Jpn.Acad.Ser.B*, **57** (1981) 398-401.
7. Purves, D., Voyvodic, J.T., Magrassi, L. & Yano, H.: Nerve terminal remodeling visualized in living mice by repeated examination of the same neuron., *Science*, **238** (1987) 1122-1126.
8. Kuroda, Y.: "Tracing Circuit" model for the memory process in human brain: Roles of ATP and adenosine derivatives for dynamic change of synaptic connections., *Neurochem.Intern.*, **14** (1989) 309-319.
9. Kudo, Y. & Ogura, A.: Glutamate-induced increase in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in isolated hippocampal neurons., *Br.J.Pharmacol.*, **89** (1986) 191-198.
10. Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y.: A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties., *J.Biol.Chem.*, **260** (1985) 3440-

11. Ogura,A., Iijima,T., Amano,T. & Kudo,Y.: Optical monitoring of excitatory synaptic activity between cultured hippocampal neurons by a multi-site  $\text{Ca}^{2+}$  fluorometry., *Neurosci.Lett.*, **78** (1987) 69-74.
12. Muramoto,K., Kobayashi,K., Nakanishi,S., Matsuda,Y. & Kuroda,Y.: Functional synapse formation between cultured neurons of rat cerebral cortex: block by a protein kinase inhibitor which does not permeate the cell membrane., *Proc.Jpn.Acad.Ser.B*, **64** (1988) 319-322.
13. Kuroda,Y., Ichikawa,M., Muramoto,K., Kobayashi,K., Matsuda,Y., Ogura,A. & Kudo,Y.: Block of synapse formation between cerebral cortical neurons by a protein kinase inhibitor., *Neurosci.Lett.*, **135** (1992) 255-258.
14. Banker,G.A. & Cowan,W.M.: Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture., *Brain Res.*, **126** (1977) 397-425.
15. 小倉明彦、工藤佳久：海馬神経細胞での細胞内Ca濃度の測定、*生体科学*, **38** (1987) 597-603.
16. Uchida,Y. & Tomonaga,M.: Neurotrophic action of Alzheimer's disease brain extract is due to the loss of inhibitory factors for survival and neurite formation of cerebral cortical neurons., *Brain Res.*, **481** (1989) 190-193.
17. Ichikawa,M., Muramoto,K., Kobayashi,K., Kawahara,M. & Kuroda,Y.: Formation and maturation of synapses in primary cultures of rat cerebral cortical cells: an electron microscopic study., *Neurosci.Res.*, **16** (1993) 95-103.
18. 御子柴克彦：ニューロンとグリアの発生と分化、シリーズ分子生物学の進歩11巻、分子神経生物学（御子柴克彦、野田昌晴 編集）pp15-34.
19. Kobayashi,K., Ichikawa,M., Kawahara,M., Muramoto,K. & Kuroda,Y.: Development of synapses and neurites of hippocampal and cortical neurons during 6 months in culture: Estimation of the number of synapse by ELISA., *Abstr.Soc.Neurosci.*, (1993).
20. De Camilli,P., Miller,P.E., Navone,F., Theurkauf,W.E. & Vallee,R.B.: Distribution of microtubule-associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence., *Neurosci.*, **11** (1984) 819-846.



21. Ramón y Cajal, S.: *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*, Tome II. Paris, (1911) Maloine.
22. Lorente de Nó, R.: Cerebral cortex: Architecture, intracortical connections, motor projections. In *Physiology of the Nervous System*. (Fulton, J.F., ed.) pp.291-325. (1938) London: Oxford Univ. Press.
23. Ribak, C.E.: Aspinous and sparsely-spinous stellate neurons in the visual cortex of rats contain glutamic acid decarboxylase., *J. Neurocytol.*, **7** (1978) 461-478.
24. Jones, E.G.: Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey., *J. Comp. Neurol.*, **160** (1975) 205-268.
25. Feldman, M. & Peters, A.: The forms of non-pyramidal neurons in the visual cortex of the rat., *J. Comp. Neurol.*, **179** (1978) 761-794.
26. Vogt, B.A. & Peters, A.: Form and distribution of neurons in rat cingulate cortex: Areas 32, 24 and 29., *J. Comp. Neurol.*, **195** (1981) 603-625.
27. Beaulieu, C.: Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population., *Brain Res.*, **609** (1993) 284-292.
28. Stichel, C.C. & Müller, H.W.: Dissociated cell culture of rat cerebral cortical neurons in serum-free, conditioned media: GABA-immunopositive neurons., *Dev. Brain Res.*, **64** (1991) 145-154.
29. Kuriyama, K., Tomono, S., Kishi, M., Mukainaka, T. & Ohkuma, S.: Development of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)ergic neurons in cerebral cortical neurons in primary culture., *Brain Res.*, **416** (1987) 7-21.
30. Robinson, H.P.C., Kawahara, M., Jimbo, Y., Torimitsu, K., Kuroda, Y. & Kawana, A.: Periodic synchronized bursting and intracellular calcium transients elicited by low magnesium in cultured cortical neurons., *J. Neurophysiol.*, **70** (1993) 1606-1616.
31. Romijn, H.J., Mud, M.T., Habets, A.M.M.C. & Wolters, P.S.: A quantitative electron microscopic study on synapse formation in dissociated fetal rat cerebral cortex in vitro., *Dev. Brain Res.*, **1** (1981) 591-605.
32. Muramoto, K., Ichikawa, M., Kawahara, M., Kobayashi, K. & Kuroda, Y.: Frequency of synchronous oscillations of neuronal activity increases during development and

- is correlated to the number of synapses in cultured cortical neuron networks., *Neurosci.Lett.*, **163** (1993) 163-165.
33. 村本和世、黒田洋一郎：細胞内カルシウム測定法とその応用-シナプス形成の定量的解析-、*Dementia*、**7** (1993) 172-184.
  34. Watanabe,M., Inoue,Y., Sakimura,K. & Mishina,M.: Developmental changes in distribution of the NMDA receptor channel subunit mRNAs in the brain., *NeuroRept.*, **3** (1992) 1138-1140.
  35. Monyer,H., Seeburg,P.H. & Wisden,W.: Glutamate-operated channels: Developmentally early and mature forms arise by alternative splicing., *Neuron*, **6** (1991) 799-810.
  36. Nowak,L., Bregestovski,P., Ascher,P., Herbert,A. & Prochiantz,A.: Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons., *Nature*, **307** (1984) 462-465.
  37. Ichikawa,M., Kimura-Kuroda,J., Yasui,K. & Kuroda,Y.: Expression of synaptophysin during synapse formation between dissociated cortical neurons., *Neurosci.Res.*, **12** (1991) 452-458.
  38. Nakanishi,K., Okouchi,Y., Ueki,T., Asai,K., Isobe,I., Eksioglu,Y.Z., Kato,T., Hasegawa,Y. & Kuroda,Y.: Astrocytic contribution to functioning synapse formation estimated by spontaneous neuronal intracellular  $Ca^{2+}$  oscillation., *Brain Res.*, **659** (1994) 169-178.
  39. Nedergaard,M.: Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells., *Science*, **263** (1994) 1768-1771.
  40. Uchida,Y., Takio,K., Titani,K., Ihara,Y. & Tomonaga,M.: The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein., *Neuron*, **7** (1991) 337-347.
  41. Asai,K., Hirano,T., Kaneko,S., Moriyama,A., Nakanishi,K., Isobe,I., Eksioglu,Y.Z. & Kato,T.: A novel glial growth inhibitory factor, gliostatin, derived from neurofibroma., *J.Neurochem.*, **59** (1992)307-317
  42. Nagashima,K., Nakanishi,S. & Matsuda,Y.: Inhibition of nerve growth factor-induced neurite outgrowth of PC12 cells by a protein kinase inhibitor which does



- not permeate the cell membrane., *FEBS Lett.*, **293** (1991) 119-123.
43. Nakanishi, S., Matsuda, Y., Iwahashi, K. & Kase, H.: K-252b, c and d, potent inhibitors of protein kinase C from microbial origin., *J. Antibiot.*, **39** (1986) 1066-1071.
  44. Kase, H., Iwahashi, K., Nakanishi, S., Matsuda, Y., Yamada, K., Takahashi, M., Murakata, C., Sato, A. & Kaneko, M.: K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinase., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142** (1987) 436-440.
  45. Kuroda, Y. & McIlwain, H.: Uptake and release of [<sup>14</sup>C]adenine derivative at beds of mammalian cortical synaptosomes in superfusion system., *J. Neurochem.*, **22** (1974) 691-699.
  46. White, T.D.: Release of ATP from a synaptosomal preparation by elevated extracellular K<sup>+</sup> and by veratridine., *J. Neurochem.*, **30** (1978) 329-336.
  47. Inoue, K., Nakazawa, K., Fujimori, K., Watano, T. & Takanaka, A.: Extracellular adenosine 5'-triphosphate-evoked glutamate release in cultured hippocampal neurons., *Neurosci. Lett.*, **134** (1992) 215-218.
  48. Edwards, F.A., Gibb, A.J. & Colquhoun, D.: ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system., *Nature*, **359** (1992) 144-147.
  49. Kuroda, Y.: Physiological roles of adenosine derivatives which are released during synaptic transmission in mammalian brain., *J. Physiol. Paris*, **74** (1978) 463-470.
  50. 黒田洋一郎: A T P ・ アデノシン受容体と記憶シナプスの可塑性、蛋白質 核酸 酵素, **35** (1990) 757-767.
  51. Ehrlich, Y.H., Davis, T.B., Bock, E., Kornecki, E. & Lenox, R.H.: Ecto-protein kinase activity on the external surface of neural cells., *Nature*, **320** (1986) 67-70.
  52. Tsuji, S., Yamashita, T. & Nagai, Y.: A novel, carbohydrate signal-mediated cell surface protein phosphorylation: ganglioside GQ1b stimulates ecto-protein kinase activity on the cell surface of a human neuroblastoma cell line, GOTO., *J. Biochem.*, **104** (1988) 498-503.
  53. Ryan, T.A., Reuter, H., Wendland, B., Schweizer, F.E., Tsien, R.W. & Smith, S.J.:

- The kinetics of synaptic vesicle recycling measured at single presynaptic boutons., *Neuron*, **11** (1993) 713-724.
54. Kelly, R.B.: The cell biology of the nerve terminal., *Neuron*, **1** (1988) 431-438.
  55. Kobayashi, E., Nakano, H., Morimoto, M. & Tamaoki, T.: Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **159** (1989) 548-553.
  56. Tokumitsu, H., Chijiwa, T., Hagiwara, M., Mizutani, A., Terasawa, M. & Hidaka, H.: KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, is a specific inhibitor of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II., *J.Biol.Chem.*, **265** (1990) 4315-4320.
  57. Hagiwara, M., Inagaki, M., Watanabe, M., Ito, M., Onoda, K., Tanaka, T. & Hidaka, H.: Selective modulation of calcium-dependent myosin phosphorylation by novel protein kinase inhibitors, isoquinolinesulfonamide derivatives., *Mol.Pharmacol.*, **32** (1987) 7-12.
  58. Edelman, A.M., Blumenthal, D.K. & Krebs, E.G.: Protein serine/threonine kinases., *Annu.Rev.Biochem.*, **56** (1987) 567-613.
  59. Ito, M. & Yamagata, T.: A novel glycosphingolipid-degrading enzyme cleaves of the linkage between the oligosaccharide and ceramide of neutral and acidic glycosphingolipids., *J.Biol.Chem.*, **261** (1986) 14278-14282.
  60. Muramoto, K., Kawahara, M., Kobayashi, K., Ito, M., Yamagata, T. & Kuroda, Y.: Endoglycoceramidase treatment inhibits synchronous oscillations of intracellular Ca<sup>2+</sup> in cultured cortical neurons., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **202** (1994) 398-402.
  61. Lancet editorial.: Is aluminium a dementing ion?, *Lancet*, **339** (1992) 713-714.
  62. Terry, R.D., et al.: Physical basis of cognitive alteration in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment., *Ann.Neurol.*, **30** (1991) 572-580.
  63. Kawahara, M., Muramoto, K., Kobayashi, K. & Kuroda, Y.: Functional and morphological changes in cultured neurons of rat cerebral cortex induced by long-term application of aluminium., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **189** (1992)



1317-1322.

64. Agren, G. & Ronquist, G.: ( $^{32}$ P)phosphoryl transfer by endogenous protein kinase at the glia and glioma cell surface in culture into extrinsic acceptor proteins., *Acta Physiol.Scand.*, **92** (1974) 430-432.
65. Mastro, A.M. & Rozengurt, E.: Endogenous protein kinase in outer plasma membrane of cultured 3T3 cells., *J.Biol.Chem.*, **251** (1976) 7899-7906.
66. Remold-O'Donnell, E.: Protein kinase activity associated with the surface of guinea pig macrophages., *J.Exp.Med.*, **148** (1978) 1099-1104.
67. Chaing, T.M., Kang, E.S. & Kang, A.H.: Ecto-protein kinase activity of fibroblasts., *Arch.Biochem.Biophys.*, **195** (1979) 518-525.
68. Kang, E.S. & Chiang, T.M.: Characterization of the major phosphoprotein and its kinase on the surface of the rat adipocyte., *Exp.Cell Res.*, **167** (1986) 343-359.
69. Emes, C.H. & Crawford, N.: Ecto-protein kinase activity in rabbit peritoneal polymorphonuclear leucocytes., *Biochim.Biophys.Acta*, **717** (1982) 98-104.
70. Skubitz, K.M. & Goueli, S.A.: Basic fibroblast growth factor is a substrate for phosphorylation by human neutrophil ecto-protein kinase activity., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **174** (1991) 49-55.
71. Halder, S. & Majumder, G.C.: Phosphorylation of external cell-cell-surface proteins by an endogenous ecto-protein kinase of goat epididymal intact spermatozoa., *Biochim.Biophys.Acta*, **887** (1986) 291-303.
72. Majumder, G.C., Dey, C.S., Halder, S. & Barua, M.: Biochemical parameters of initiation and regulation of sperm motility., *Arch.Androl.*, **24** (1990) 287-303.
73. Kubler, D., Pyerin, W. & Kinzel, V.: Protein kinase activity and substrates at the surface of intact HeLa cells., *J.Biol.Chem.*, **257** (1982) 322-329.
74. Chen, X.Y. & Lo, T.C.Y.: Phosphorylation of a cell surface 112kDa protein by an ecto-protein kinase in rat L6 myoblasts., *Biochem.J.*, **279** (1991) 467-474.
75. Chen, X.Y. & Lo, T.C.Y.: Involvement of a cell surface protein and an ecto-protein kinase in myogenesis., *Biochem.J.*, **279** (1991) 475-482.
76. Lognonne, J.L. & Wahrmann, J.P.: A cell surface phosphoprotein of 48kDa specific for myoblast fusion., *Cell Differ.*, **22** (1988) 245-258.

77. Naik, U.P., Kornecki, E. & Ehrlich, Y.H.: Phosphorylation and dephosphorylation of human platelet surface proteins by an ecto-protein kinase / phosphatase system., *Biochim.Biophys.Acta*, **1092** (1991) 256-264.
78. Pawlowska, Z., Hogan, M.V., Kornecki, E. & Ehrlich, Y.H.: Ecto-protein kinase and surface protein phosphorylation in PC12 cells: Interaction with nerve growth factor., *J.Neurochem.*, **60** (1993) 678-686.
79. Taniguchi, H., Suzuki, M., Manenti, S. & Titani, K.: A mass spectrometric study on the *in vivo* posttranslational modification of GAP-43., *J.Biol.Chem.*, **269** (1994) 22481-22484.
80. Kyte, J. & Doolittle, R.F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein., *J.Mol.Biol.*, **157** (1982) 105-132.
81. Suwa, M., Mitaku, S. & Kuroda, Y.: Theoretical analysis of amino acid sequence of human dystrophin., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **191** (1993) 782-789.
82. Nagy, A.K., Shuster, T.A. & Delgado-Escueta, A.V.: Ecto-ATPase of mammalian synaptosomes: Identification and enzymic characterization., *J.Neurochem.*, **47** (1986) 976-986.
83. Asch, A.S., Liu, I., Bricetti, F.M., Barnwell, J.W., Kwakye-Berko, F., Dokun, A., Goldberger, J. & Pernambuco, M.: Analysis of CD36 binding domains: Ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain., *Science*, **262** (1993) 1436-1440.
84. Hung, A.Y. & Selkoe, D.J.: Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of  $\beta$ -amyloid precursor protein., *EMBO J.*, **13** (1994) 534-542.
85. Taniguchi, H., Manenti, S., Suzuki, M. & Titani, K.: Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS), a major protein kinase C substrate, is an *in vivo* substrate of proline-directed protein kinase(s): A mass spectroscopic analysis of the post-translational modifications., *J.Biol.Chem.*, **269** (1994) 18299-18302.
86. 谷口寿章: 生体高分子の質量分析法、蛋白質 核酸 酵素、39 (1994) 1842-1851.
87. Zauner, W., Kratz, J., Staunton, J., Feick, P. & Wiche, G.: Identification of two



- distinct microtubule binding domains on recombinant rat MAP 1B., *Eur.J.Cell Biol.*, **57** (1992) 66-74.
88. Nobel,M., Lewis,S.A. & Cowan,N.J.: The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau., *J.Cell Biol.*, **109** (1989) 3367-3376.
89. 村本和世、谷口寿章、川原正博、小林和夫、諏訪牧子、美宅成樹、黒田洋一郎：微小管関連タンパク質MAP1Bの細胞外ドメインのリン酸化と培養大脳皮質ニューロン間のシナプス形成への関与、*神経化学*, **33** (1994) 602-603.
90. Muramoto,K., Taniguchi,H., Kawahara,M., Kobayashi,K., Nonomura,Y. & Kuroda,Y.: A substrate of ecto-protein kinase is microtubule-associated protein (MAP) 1B in cortical cell cultures undergoing synaptogenesis., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **205** (1994) 1467-1473.
91. Bloom,G.S., Luca,F.C. & Vallee,R.B.: Microtubule-associated protein 1B: Identification of a major component of the neuronal cytoskeleton., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **82** (1985) 5404-5408.
92. Bloom,G.S., Schoenfeld,T.A. & Vallee,R.B.: Widespread distribution of the major polypeptide component of MAP1 (microtubule-associated protein 1) in the nervous system., *J.Cell Biol.*, **98** (1984) 320-330.
93. Sato-Yoshitake,R., Shiomura,Y., Miyasaka,H. & Hirokawa,N.: Microtubule-associated protein 1B : Molecular structure, localization and phosphorylation-dependent expression in developing neurons., *Neuron*, **3** (1989) 229-238.
94. Diaz-Nido,J., Serrano,L. & Avila,J.: A casein kinase II-related activity is involved in phosphorylation of microtubule-associated protein MAP1B during neuroblastoma cell differentiation., *J.Cell Biol.*, **106** (1988) 2057-2065.
95. Diaz-Nido,J., Serrano,L., Hernandez,M.A. & Avila,J.: Phosphorylation of microtubule proteins in rat brain at different developmental stages: Comparison with that found in neuronal cultures., *J.Neurochem.*, **54** (1990) 211-222.
96. Fischer,I. & Romano-Clarke,G.: Changes in microtubule-associated protein MAP1B phosphorylation during rat brain development., *J.Neurochem.*, **55** (1990) 328-333.

97. Mansfield, S.G., Diaz-Nido, J., Gordon-Weeks, P.R. & Avila, J.: The distribution and phosphorylation of the microtubule-associated protein MAP1B in growth cones., *J. Neurocytol.*, **21** (1992) 1007-1022.
98. Black, M.M., Slaughter, T. & Fischer, I.: Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is concentrated in the distal region of growing axons., *J. Neurosci.*, **14** (1994) 857-870.
99. Aletta, J.M., Lewis, S.A., Cowan, N.J. & Greene, L.A.: Nerve growth factor regulates both the phosphorylation and steady-state levels of microtubule-associated protein 1.2., *J. Cell Biol.*, **106** (1988) 1573-1581.
100. Brugg, B., Reddy, D. & Matus, A.: Attenuation of microtubule-associated protein 1B expression by antisense oligodeoxynucleotides inhibits initiation of neurite outgrowth., *Neurosci.*, **52** (1993) 489-496.
101. Vale, R.B.: Purification of brain microtubules and microtubule-associated protein 1 using taxol., *Methods Enzymol.*, **134** (1986) 104-115.
102. Lewis, S.A., Sherline, P. & Cowan, N.J.: A cloned cDNA encoding MAP1 detects a single copy gene in mouse and a brain-abundant RNA whose level decreases during development., *J. Cell Biol.*, **102** (1986) 2106-2114.
103. Bernhardt, R., Huber, G. & Matus, A.: Differences in the developmental patterns of three microtubule-associated proteins in the rat cerebellum., *J. Neurosci.*, **5** (1985) 977-991.
104. Riederer, B. & Matus, A.: Differential expression of distinct microtubule-associated proteins during brain development., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82** (1985) 6006-6009.
105. Drubin, D.G., Feinstein, S.C., Shooter, E.M. & Kirschner, M.W.: Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors., *J. Cell Biol.*, **101** (1985) 1799-1807.
106. Greene, L.A., Liem, R.K.H. & Shelanski, M.L.: Regulation of a high molecular weight microtubule associated protein in PC12 cells by nerve growth factor., *J. Cell Biol.*, **96** (1983) 76-83.



107. Takemura,R., Okabe,S., Umeyama,T., Kanai,Y., Cowan,N.J. & Hirokawa,N.: Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau., *J.Cell Sci.*, **103** (1992) 953-964.
108. Cravchik,A., Reddy,D. & Matus,A.: Identification of a novel microtubule-binding domain in microtubule-associated protein 1A (MAP1A)., *J.Cell Sci.*, **107** (1994) 661-672.
109. Garner,C.C., Garner,A., Huber,G., Kozak,C. & Matus,A.: Molecular cloning of microtubule-associated protein 1 (MAP1A) and microtubule-associated protein 5 (MAP1B): identification of distinct genes and their differential expression in developing brain., *J.Neurochem.*, **55** (1990) 146-154.
110. Langkopf,A., Hammarback,J.A., Muller,R., Vallee,R.B. & Garner,C.C.: Microtubule-associated proteins 1A and LC2. Two proteins encoded in one messenger RNA., *J.Biol.Chem.*, **267** (1992) 16561-16566.
111. Ngsee,J.K. & Scheller,R.H.: Isolation and characterization of two homologous cDNA clones from Torpedo electromotor neurons., *DNA*, **8** (1989) 555-561]
112. Rienitz,A., Grenningloh,G., Hermans-Borgmeyer,I., Kirsch,J., Littauer,U.Z., Prior,P., Gundelfinger,E.D., Schmitt,B. & Betz,H.: Neuraxin, a novel putative structural protein of the rat central nervous system that is immunologically related to microtubule-associated protein 5., *EMBO J.*, **8** (1989) 2879-2888.
113. Kirsch,J., Littauer,U.Z., Schmitt,B., Prior,P., Thomas,L. & Betz,H.: Neuraxin corresponds to a C-terminal fragment of microtubule-associated protein 5 (MAP5) ., *FEBS Lett.*, **262** (1990) 259-262.
114. Hammarback,J.A., Obar,R.A., Hughes,S.M. & Vallee,R.B.: MAP1B is encoded as a polypeptide that is processed to form a complex N-terminal microtubule-binding domain., *Neuron*, **7** (1991) 129-139.
115. Domínguez,J.E., Buendía,B., López-Otín,C., Antony,C., Karsenti,E. & Avila,J.: A protein related to brain microtubule-associated protein MAP1B is a component of the mammalian centrosome., *J.Cell Sci.*, **107** (1994) 601-611.
116. Burg,M.A. & Cole,G.J.: Claustrin, an antiadhesive neural keratan sulfate

- proteoglycan, is structurally related to MAP1B., *J.Neurobiol.*, **25** (1994) 1-22.
117. Cole,G.J. & McCabe,C.F.: Identification of a developmentally regulated keratan sulfate proteoglycan that inhibits cell adhesion and neurite outgrowth., *Neuron*, **7** (1991) 1007-1018.
118. Díaz-Nido,J., Armas-Portela,R. & Avila,J.: Addition of protease inhibitors to culture medium of neuroblastoma cells induces both neurite outgrowth and phosphorylation of microtubule-associated protein MAP1B., *J.Cell Sci.*, **98** (1991) 409-414.
119. Ulloa,L., Díaz-Nido,J. & Avila,J.: Depletion of casein kinase II by antisense oligonucleotide prevents neuritogenesis in neuroblastoma cells., *EMBO J.*, **12** (1993) 1633-1640.



## 謝 辞

本研究を行なっていくうえで、終始ご指導ご鞭撻を賜りました東京大学医学部薬理学教室 野々村禎昭教授、並びに、直接的に懇切な御指導をいただき、研究以外の面でも御鞭撻・叱咤激励を賜りました東京都神経科学総合研究所神経生化学研究部門副参事研究員 黒田洋一郎先生に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究の形態学的な部分において、ご協力とご指導いただいた東京都神経科学総合研究所解剖発生学研究部門研究員 市川眞澄先生、質量分析計・アミノ酸シーケンサーなどでリン酸化基質の同定のためにご協力いただき、貴重なご助言をいただきました藤田保健衛生大学総合医科学研究所医高分子学部門講師 谷口寿章先生に深く感謝いたします。

まだ市販されていない時期に貴重なK-252bをご供与いただいた協和発酵工業東京研究所 松田譲博士に感謝いたします。

細胞内 $Ca^{2+}$ 変動多点同時観測システムの立ち上げ時、問題点の解決などの際に、ご助言をいただきました、三菱化成（現三菱化学）生命科学研究所 工藤佳久博士（現東京薬科大学教授）、小倉明彦博士（現大阪大学理学部生物学教室教授）に感謝いたします。

最後に、本研究ならびに論文作成時に多大なるご協力、貴重なご意見をいただいた東京都神経科学総合研究所神経生化学部門黒田研究員グループのみなさま、並びに東京大学医学部薬理学教室のみなさまにこの場を借りて御礼申し上げます。





