

## MAGの神経突起退縮作用におけるGT1b specific raftの役割の解明

その他（別言語等）の研究課題名	Binding of soluble myelin associated glycoprotein to specific gangliosides induces the association of p75NTR to lipid rafts and signal transduction
研究代表者	安田 斎, 前田 憲吾, 川合 寛道
発行年	2004-03
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10422/3475">http://hdl.handle.net/10422/3475</a>

**MAG の神経突起退縮作用における GT1b specific raft の役割の解明**

**研究課題番号：14570590**

**平成14-平成15年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書**

**平成16年3月**  
**研究代表者 安田齋**  
**(滋賀医科大学医学部助教授)**

## はじめに

古くから中枢神経はミエリンにより再生が起こりにくいことが知られていたが、近年、ミエリン由来の軸索伸展阻害蛋白が同定され、現在、Myelin associated glycoprotein (MAG), Nogo, Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp)が知られている。最近、これらの蛋白が、GPI anchor 型蛋白である nogo receptor や p75 neurotrophin receptor (p75NTR) を介してシグナル伝達されることが証明された。しかし、以前より MAG の nogo receptor を介さないシグナル伝達機構についての報告があり、その中でも糖脂質であるガングリオシドを介する経路の重要性が指摘されている。しかし、ガングリオシドの生合成経路は非常に複雑であり、またその特異的な阻害剤がないため未解決な部分が多かった。

一方、p75NTR は NGF と結合すると、シグナル伝達の場合である lipid raft へ集積することが報告されているが、ガングリオシドの抗体で細胞を架橋すると軸索伸展阻害が起こることが知られており、そのメカニズムとして、ガングリオシドと共受容体を形成している p75NTR の lipid rafts への移行が重要である可能性がある。

以上を勘案し、本研究は研究協力者である川合らによって作成された2系統のノックアウトマウスを用いることにより、MAG のガングリオシドを介するシグナル伝達を検討することを主目的として、さらに、MAG や Nogo による p75NTR の lipid rafts への集積する調節機構についても検討した。

## 研究組織

- 研究代表者：安田斎（滋賀医科大学医学部助教授）  
研究分担者：前田憲吾（滋賀医科大学医学部助手）  
研究分担者：川合寛道（滋賀医科大学医員）

## 交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	2900	0	2900
平成15年度	1000	0	1000
総計	3600	0	3600

滋賀医科大学附属図書館



2003009098

## 研究発表

### 1. 学会誌等

**Fujitani M, Yamashita T, Kawai H, Proia RL, Kashiwagi A, Thohyama M, Yaduda H: Binding of soluble myelin-associated glycoprotein to specific gangliosides induces the association of p75NTR to lipid rafts and signal transduction. (in submission)**

### 2. 口頭発表

**藤谷昌司、川合寛道、安田齋、山下俊英、遠山正彌：Myelin-associated glycoprotein の lipid microdomain を介するシグナル伝達機構：ガングリオシド合成酵素 KO マウスを用いた検討、厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「遺伝性ニューロパチーの診断システムの確立及び治療に関する研究」班平成15年度総会、平成15年12月11日**

## 研究成果

### 1. GalNacT ノックアウトマウスにおける MAG の軸索進展阻害作用の消失

ミエリン由来の軸索伸長阻害作用を持つ蛋白である MAG の機能的 binding partner を検討するために、スフィンゴ糖脂質であるガングリオシドの生合成酵素をノックアウト(KO)した2系統のマウスを用いて検討を行った。脳内の主要な複合ガングリオシドを持たない  $\beta$  1,4-N-acetyl galactosaminyl transferase (GalNacT)KO マウス及び b-series のガングリオシドを持たない GD3 Synthase (GD3S)KO マウスに加えて、野生型マウスを用いて MAG の軸索進展阻害作用を比較検討した。

PCRにて遺伝子型を確認した生後6-9日齢のマウスの小脳から単離した顆粒細胞を用いて neurite outgrowth assay を行った。GD1a を発現するが GT1b を発現しない GD3S の KO マウスでは野生型と同様の軸索進展阻害効果が観察されたが、この2つのガングリオシドを発現しない GalNacT の KO マウスでは soluble MAG の軸索伸長阻害作用は消失した。従って、soluble MAG のこの作用の発現には GD1a 及び GT1b の両者が必要であることが分かった。

一方、Nogo の添加では、両 KO マウスも野生型と同様に軸索進展阻害効果は保たれていたが、PI-PLC で細胞を処理して Nogo 受容体の GPI-anchor を切断すると消失した。以上より GD1a,GT1b 及び Nogo は MAG の機能的 binding partner と考えられた。

### 2. MAG の効果は RhoA の活性化と連関していた。

成長円錐の collapse をひきおこす small GTPase RhoA 活性について検討した。MAG による RhoA の活性は、GD3S KO マウスでは野生型と変わらなかったが、GalNacT KO マウスでは低下していた。しかし、Nogo の添加では、両マウスとも野生型と同様に保たれていた。

さらに、抗 GD1a 抗体及び抗 GT1b 抗体によっても RhoA は活性化されたが、GM1 抗体では活性化されなかった。

### 3. p75NTR の lipid raft への集積

MAG の情報伝達には p75NTR が関与しており、p75NTR は Nogo 受容体と一体となって MAG の効果発現に関与することが知られている。p75NTR の過剰発現により RhoA 活性化が惹起されることから MAG のガングリオシドへの結合が p75NTR の clustering を介して RhoA を活性化する可能性が考慮される。そこで小脳顆粒細胞 p75NTR の Lipid raft への集積をシヨ糖密度勾配遠心法により検討した。

Flotillin-1 や Lyn などの lipid raft のマーカーは Triton X-100 や Brij58 などの界面活性剤に不溶性の分画に含まれるのでこれらをマーカーにして検討した。刺激のない条件では、p75NTR の lipid raft への集積は極めて少なかったが、MAG, Nogo で顆粒細胞を刺激した時、有意に増加した(不溶性分画 p75NTR と flotillin-1 の比率から検討)。また、GT1b に対する特異的な IgM 抗体により細胞を架橋した場合も同様の結果を得た。

#### 4. Lipid raft の MAG 及び Nogo の効果発現における役割

さらに、lipid raft が MAG や Nogo の情報伝達や効果の発現に必要などうかを検討した。Lipid raft の除去にはコレステロールのキレーターである methyl- $\beta$ -cyclodextrin(m $\beta$ CD)を用いた。Chick E12 の DRG を用いて MAG 及び Nogo の効果を m $\beta$ CD の存在、非存在下で growth cone collapse assay を行ったところ、両方のリガンド共に同存在下で有意な collapse の増加を示した。

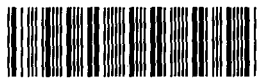
以上より、soluble MAG は Nogo receptor ではなくガングリオシドを介する経路により情報伝達されると思われる。この際、MAG と Nogo のシグナル伝達経路は最終的に p75NTR を共有するものの、異なる経路であることが示された。さらに、MAG はガングリオシドに結合した後、共受容体でもあり、シグナルトランスデューサーでもある p75NTR を lipid raft へ集積させ、その下流の RhoA を活性化し、軸索伸展阻害を起こすメカニズムが示唆された。

MAGの神経突起退縮作用におけるGTL1b specificraftの役割の解明

安田 齋

平成十六年三月

滋賀医科大学附属図書館



2003009098