

称号及び氏名	博士（獣医学）丹野 聡彦		
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 31 日		
論文名	「Expression and function of Slit proteins in neuronal development and regeneration（神経発生及び再生過程における Slit タンパク発現と機能）」		
論文審査委員	主査	教授	津山伸吾
	副査	教授	小崎俊司
	副査	教授	中村洋一
	副査	助教授	小森雅之

論文要旨

緒言

神経組織は神経細胞による複雑なネットワークから構成される。このネットワークの形成には、神経発生期において神経軸索が標的部位へ正確に投射されることが必要である。近年、軸索を標的部位に誘導するガイダンス因子の存在が多数報告され、その分子実体が明らかにされた。誘引因子として Netrin、反発因子として Semaphorin、Ephrin、Slit などが報告されている。ガイダンス因子と神経軸索の成長円錐に存在する受容体との相互作用により、成長円錐内の細胞骨格が変化し、軸索の伸長、退縮、進行方向が決定し、軸索の走行が厳密に制御される。

Slit タンパクは神経軸索を反発する分泌型ガイダンス因子に分類され、3 種類（Slit1～3）が報告されている。その受容体として Robo (Roundabout) が同定されている。Slit のガイダンスシグナルは Robo を介した、成長円錐内の細胞骨格制御機構により調節される。Slit1 および Slit2 は発生過程において神経軸索の反発因子として機能する。さらに Slit2 はタンパク翻訳後のプロセッシングにより

軸索の伸長、分枝にも関与すると報告されている。一方、Slit3 は発生期における横隔膜形成、腎臓形成に関与し、ミトコンドリアに局在すると報告されているが、その機能は不明である。

傷害された末梢神経は Waller 変性の後、再生することから、神経再生研究のモデルに用いられる。末梢神経の再生過程には、発生期の神経ネットワーク形成に関わる分子群の発現が報告されており、ガイダンス因子である Slit タンパクも、発生期同様、再生過程における神経ネットワークの構築に関与すると考えられる。

本研究では、神経における Slit タンパクの役割を明らかにするため、その発現と機能を解析した。

第 1 章 神経組織における slit mRNA の選択的スプライシング産物の発現

いくつかのガイダンス因子には、RNA やタンパクのプロセッシングによるアイソフォームの存在が報告されている。これらアイソフォームは複雑な神経ネットワークの形成に重要であると考えられている。Slit2 にはタンパクのプロセッシングによる 2 種類のアイソフォームが存在し、神経軸索の伸長・分枝に関与する。しかし、Slit1, 3 には Slit2 に見られるような生物種間で保存されたプロセッシング配列はない。また、Little らは slit1, 2, 3 のゲノム配列から、mRNA の選択的スプライシングによるスプライシング産物の存在を予想しているが、その発現は確認されていない。本章では、脳と末梢神経における Slit のスプライシング産物の発現と機能を解析した。

新生ラットの脳から mRNA を調製し、slit1, 2, 3 の全長をコードする cDNA 断片を増幅する RT-PCR を行った。slit2, 3 については 4.7kbp 付近にそれぞれ 1 本のバンドを得たのに対し、slit1 では全長をコードする 4.7kbp のバンドの他に 5.5kbp にバンドが認められた。この配列のスプライシング様式を検討するため、slit1

全長を網羅するように、slit1 を部分的に増幅するプライマーを用いて PCR を行った。5.5kbp のバンドは slit1 配列の 3' 末端に約 0.8kbp の配列が挿入されたものであった。塩基配列を解読した結果、挿入配列には終止コドンが存在し、Cystein knot ドメインを欠く Slit1 スプライシング産物(Slit1 α)をコードしていた。抗 Slit1 抗体を作成し Western blotting を行ったところ、脳では Slit1 と Slit1 α が共に認められた。Slit1 α を発現・分泌する COS 細胞塊と、Robo を発現する神経細胞を含む嗅球組織とを共培養し、Slit1 α の軸索伸長を観察した結果、反発活性を示した。

末梢神経における Slit の選択的スプライシング産物の発現を検討するため、坐骨神経を用い、slit1, 2, 3 の全長を増幅するプライマーで RT-PCR を行った。slit1, 2, 3 各々について 4.7kbp 付近に 1 本ずつのバンドを得た。脳で見られた slit1 α の発現は認められなかった。

これらのことから、Slit1 には mRNA の選択的スプライシングによって Slit1 と Slit1 α が存在することを明らかにした。また、Slit の選択的スプライシングは中枢神経の神経ネットワーク形成に特異的なものであり、末梢神経には認められなかった。

第 2 章 再生末梢神経における Slit タンパクの発現

末梢神経では、軸索に損傷を与えると損傷部位より遠位側の軸索が変性し、その遺残物がマクロファージに貪食される。軸索との接触を失ったシュワン細胞は基底膜の筒内にシュワン細胞索を形成する。その後、損傷部位近位側の軸索末端より多数の再生繊維が発芽し、標的に向かって伸長する。この神経再生過程には、神経発生期同様、ガイダンス因子が関与すると考えられる。本章では、神経再生過程における Slit タンパクの発現を検討した。

末梢神経の再生モデルとしてラットの坐骨神経を用い、挫滅したものと切断後

縫合したものをを用いた。挫滅はシュワン細胞索や基底膜の連続性を保ったまま神経軸索を再生させるモデルであり、切断後縫合したものは、それらの連続性を絶って軸索を再生させるモデルである。神経再生部位である損傷部より末端側の坐骨神経を術後 2、7、14、21 日目に回収し、その mRNA を鋳型に RT-PCR 法で slit1, slit2, slit3 の発現を解析した。

slit1 は、挫滅・切断モデルの双方でその発現量に経時的な変化が認められなかった。

slit2 は、挫滅モデルではその発現量に変化は認められなかったが、切断モデルでは再生繊維の伸長期にあたる術後 7 日目をピークに 20 倍近く増加し、その後減少した。Slit2 の発現部位を検討するため、抗 Slit2 抗体とシュワン細胞のマーカータンパクである S-100 に対する抗体を用い二重蛍光免疫染色を行った。その結果、2 つの蛍光像が一致したことから、Slit2 はシュワン細胞に発現することが示唆された。Slit2 の受容体である Robo1 および Robo2 の発現を RT-PCR により検討したところ、切断モデルにおいて robo1、robo2 の発現は slit2 同様 7 日目をピークに増加した。

slit3 は、挫滅・切断モデルの双方で、その発現量が術後 2 日目の炎症期に最も増加した。Slit3 の発現部位を検討するため、抗 Slit3 抗体を用い免疫組織染色を行った結果、Slit3 はマクロファージに発現することが明らかになった。

Slit2 は再生繊維の伸長が認められる 7-14 日目に発現し、その受容体である Robo とともに発現したことから、Slit2 は再生末梢神経におけるガイダンス因子であると考えられる。また、Slit3 は再生繊維の伸長期ではなく、炎症期における活性化マクロファージに発現したことから、Slit3 はガイダンス因子としては機能しないことが示された。

Slit3 ノックアウトマウスに見られる表現形は横隔膜ヘルニア、腎臓の形成不全である。また Slit3 はミトコンドリアに局在すると報告されているが、その分子機能は明らかではない。炎症期のマクロファージにおいて Slit3 の発現を見出したことから、本章では、活性化マクロファージにおける Slit3 の機能を解析した。マウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 に Lipopolysaccharide (LPS) を添加し、slit3 の発現を RT-PCR で検討した。slit3 は LPS 添加後 4 時間をピークに発現増加した。活性化 RAW264.7 の培養上清と細胞抽出液を調製し、抗 Slit3 抗体を用いた Western Blotting によって Slit3 の分泌性を検討した。Slit3 は培養上清中に検出されず、細胞抽出液中にのみ検出されたことから、Slit3 は細胞外へは分泌されないことを明らかにした。Slit3 の細胞内局在を検討するため、抗 Slit3 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った結果、Slit3 は核周囲と細胞辺縁に局在した。ミトコンドリア特異的染色剤 Mitotracker と抗 Slit3 抗体との二重蛍光染色の結果、核周囲の Slit3 は一部ミトコンドリアと重なることから、Slit3 はミトコンドリアにも局在すると考えられる。また、F-actin を rhodamine-phalloidin を用いたアクチンと Slit3 の二重蛍光染色の結果、細胞辺縁の Slit3 は F-actin と重なることから、Slit3 は細胞辺縁のラメリポディアに局在すると考えられる。

RNAi 法により slit3 の発現を抑制した RAW264.7 を樹立した。この細胞を LPS で刺激した結果、活性化マクロファージに認められる細胞の伸展は認められなかった。また、LPS 刺激により産生される IL-1、TNF α の発現は slit3 RNAi による影響を受けないのに対し、inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現は減少した。iNOS の発現を制御する MAP キナーゼファミリー ERK, p38, JNK のリン酸化を検討した結果、slit3 RNAi 細胞では ERK のリン酸化のみが減少した。このことから、Slit3 は LPS 刺激による ERK を介した iNOS 遺伝子の転写制御に関与することが示された。さらに、slit3 RNAi 細胞において細胞骨格制御に関与する低分子量 G タンパク質 Rho ファミリー Rac, Cdc42 の活性化が低下したことから、

Slit3 は LPS 刺激による Rac や Cdc42 を介したシグナル伝達経路にも関与することが示された。wound-healing assay により活性化マクロファージの移動能を検討したところ、slit3 RNAi 細胞の移動能は低下した。よって Slit3 は活性化マクロファージの運動機構において重要な役割を担っていると考えられる。従って、末梢神経再生過程の炎症期において、Slit3 は活性化マクロファージの NO 産生、細胞運動を制御すると考えられる。

総括

1. Slit1 には mRNA の選択的スプライシングによる Slit1 と Slit1 α のアイソフォームが存在し、Slit1 α は神経軸索発因子として機能する。選択的スプライシングは中枢神経に特異的であり、末梢神経では認められない。
2. Slit2 は末梢神経の再生過程においてシュワン細胞に発現し、ガイダンス因子として機能する。
3. Slit3 は末梢神経の炎症期においてマクロファージに発現し、活性化マクロファージの NO 産生、細胞運動に関わるシグナル伝達経路に関与する。

本研究に関する論文

1. Tanno T., Takenaka S., Tsuyama S., (2004) Expression and function of Slit1 α , a novel alternative splicing product for Slit1. J. Biochem. 136, 575-581.
2. Tanno T., Fujiwara A., Takenaka S., Kuwamura M., Tsuyama S., Expression of

a chemorepellent factor Slit2 in peripheral nerve regeneration. Biosci. Biotechnol.

Biochem. (in press)

3. Tanno T., Fujiwara A., Tanaka Y., Takenaka S., Tsuyama S., Slit3 is required for LPS-induced activation of cell spreading and NO production in macrophages. (in preparation)

その他の論文

1. Takenaka S., Takubo K., Watanabe F., Tanno T., Tsuyama S., Nanano Y., Tamura Y. (2003) Occurrence of coenzyme forms of vitamin B12 in a cultured purple laver (*Porphyra yezoensis*). Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, 2480-2482.

審査結果の要旨

中枢神経組織は神経細胞による複雑なネットワークから構成され、このネットワークの形成には、神経発生期において神経軸索が標的部位へ正確に投射されることが必要である。近年、その分子実体が明らかにされつつあり、誘引因子として Netrin、反発因子として Semaphorin、Ephrin、Slit などが報告されている。これらは、誘引因子と神経軸索の成長円錐に存在する受容体との相互作用により、成長円錐内の細胞骨格が変化し、軸索の伸長、退縮、進行方向を決定し、軸索の走行が厳密に制御されていると考えられている。Slit タンパクは神経軸索を反発する分泌型誘引因子に分類される。また、傷害された末梢神経の再生過程には、発生期の神経ネットワーク形成にも関わる分子群の関与の可能性が報告されており、Slit タンパクも、発生期同様、再生過程における神経ネットワークの構築に関与すると考えられている。

本研究では、神経の発生期のネットワーク形成と再生期における Slit タンパクの役割を明らかにするため、その発現と機能を解析し、次のような成果を得ている。

1. 脳と末梢神経における Slit の発現と機能を解析するため、経時的に新生ラットの脳から mRNA を調製し、slit1, 2, 3 の全長をコードする cDNA 断片を増幅する RT-PCR を行った。slit2, 3 については 4.7kbp 付近にそれぞれ 1 本のバンドを常に得たのに対し、中枢神経ネットワーク形成時にのみ slit1 全長をコードする 4.7kbp のバンドと新たに 5.5kbp にバンドを見いだした。5.5kbp のバンドは slit1 配列の 3' 末端に約 0.8kbp の配列が挿入されたものであった。挿入配列には終止コドンが存在し、Cystein knot ドメインを欠く Slit1 スプライシング産物(Slit1 α)をコードしていることを明らかにした。抗 Slit1 抗体を作成し Western blotting を行い、脳発生期に Slit1 と Slit1 α タンパクを見いだした。Slit1 α を発現・分泌する組み替え COS 細胞塊と、Robo を発現する神経細胞を含む嗅球組織とを共培養し、Slit1 α の細胞突起の反発活性を見いだした。これらの結果は、中枢神経ネットワークの形成に、Slit1 と共に、新たに見いだした選択的スプライシング産物 Slit1 α が中枢神経ネットワーク形成に機能することを示した。

2. 神経再生部位である損傷部より末端側の坐骨神経を術後経時的に回収し、RT-PCR 法で slit1, slit2, slit3 の発現を解析した。slit1, slit1 α は、その発現量に経時的な変化がないが、切断モデルでは slit2 は再生線維の伸長期にあたる術後 7 日目をピークに 20 倍近く増加し、その後減少した。二重蛍光免疫染色を行い、Slit2 はシュワン細胞に発現することを示した。Slit2 の受容体である Robo1 および Robo2 の発現は、7 日目をピークに増加することを明らかにし、Slit2 は切断された再生末梢神経の誘導型反発因子であることを示した。

3. 末梢神経切断による炎症期に、Slit3 が免疫組織化学的にマクロファージに見いだしたことから、マクロファージ細胞株 RAW 264.7 をモデルに Lipopolysaccharide (LPS) を添加した結果、slit3 は LPS 添加後 4 時間をピークに発現増加し、各種標識抗体を用いた免疫組織化学や細胞分画によって、Slit3 はミトコンドリアと F-actin と重なる細胞辺縁のラメリポディアに局在することを明らかにした。RNAi 法により slit3 の発現を抑制した RAW264.7 を樹

立し、細胞を LPS で刺激した結果、活性化マクロファージに認められる細胞の伸展は認めず、LPS 刺激により産生される誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS)の発現は減少し、iNOS の発現を制御する MAP キナーゼファミリー のリン酸化のうち、ERK のリン酸化のみが減少した。このことから、Slit3 は LPS 刺激による ERK を介した iNOS 遺伝子の転写制御に関与することが解り、同様に細胞骨格を制御する低分子量 G タンパク質 Rho ファミリー の活性化が低下したことから、Rac や Cdc42 を介した情報伝達経路にも関与することを示した。これらの結果は、末梢神経再生過程の炎症期に、Slit3 は活性化マクロファージの NO 産生、細胞運動を制御することを明確にした。

審査委員会の所見

この成果は、中枢神経ネットワーク形成や末梢神経の再生機構に重要な示唆を与え、動物医学のみならず医学に貢献するところが大きく、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。

本研究成果は動物の生理学・薬理学を中心とする獣医学のみならず、医学・薬学分野にも広く貢献する重要な知見を含んでおり、本論文の審査及び最終試験の結果を併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。