



Expression of Beta-catenin and Integrin-Linked Kinase in the Mouse Sciatic Nerve

Takeuchi, Junichiro

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Date of Publication)

2011-12-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4484

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004484>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 竹内 純一郎
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第 4484 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付 平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Expression of Beta-catenin and Integrin-linked Kinase in the Mouse Sciatic Nerve
(マウス坐骨神経における β カテニンとインテグリン関連キナーゼの発現)

審 査 委 員

主 査 教 授 田原 真也
教 授 南 康博
教 授 錦織 千佳子

【緒言】

末梢神経系 (PNS) における軸索 - シュワン細胞や軸索 - 軸索の細胞間接着は、カドヘリンスーパーファミリーや免疫グロブリンスーパーファミリーなどの様々な接着分子によって媒介されている。一方、軸索 - 基底膜やシュワン細胞 - 基底膜といった細胞 - 細胞外基質間接着の大部分はインテグリンやラミニンなどによって媒介されている。これまでに、われわれはニワトリ坐骨神経の正常時と損傷後の再生時におけるカドヘリンとカテニンの役割について着目してきた。カドヘリンはその細胞質内ドメインで β カテニンを介して α カテニンと結合し、さらにアクチン細胞骨格と結合することによって強固な細胞間接着を引き起こしている。 α カテニンのサブタイプとしては αE 、 αN カテニンが同定されているが、両者とも PNS での発現が示されている。ところが、これら α カテニンの局在は細胞膜のいわゆる裏打ち部分に集中しているのではなく、細胞質内全体に一樣に拡散しており、こうした α カテニンのびまん性発現は、PNS におけるカドヘリン-カテニン複合体が強固な細胞間接着を媒介するには十分でないことを示唆している。他方、インテグリンはヘテロ 2 量体レセプターファミリーであり細胞 - 細胞外基質間接着に関与している。PNS においてはインテグリン $\alpha 6\beta 4$ とインテグリン $\alpha 1\beta 1$ の発現がすでに明らかにされているが、これらインテグリンの発現はセリン/スレオニンキナーゼの multidomain タンパク質であるインテグリン関連キナーゼ (ILK) によって制御されている。ILK はインテグリンだけではなく、その強制発現により E-カドヘリンと β カテニンの細胞間接着部位への局在を抑制し、細胞間接着を不活化すると同時に β カテニンの核への移行を促進する。これらの状況下において β カテニンは Wnt シグナル経路の下流の構成要素として働いている。PNS においても ILK が強く発現していればカドヘリンと β カテニンの細胞間接着部位への局在が抑制されることにより α カテニンの細胞膜裏打ち部分からの解離が生じると予想されるが、PNS における ILK の発現や軸索やシュワン細胞内での β カテニンの超微細構造的な局在に関する報告はこれまでにない。そこで今回われわれは、マウスの PNS における ILK と β カテニンの発現および超微細構造的な局在を免疫プロットおよび金粒子法を用いた免疫電顕の手法により調べた。

【材料および方法】

動物; 8 週令のマウス(BALB/C)を使用した。PNS としては坐骨神経を用い、陽性コントロールとして脳を用いた。

一次抗体; ウサギ抗 β カテニンポリクローナル抗体(sc-7199)、ウサギ抗 β カテニンモノクローナル抗体(1247-S)、ヤギ抗 ILK ポリクローナル抗体(sc-7516)、ウサギ抗 ILK モノクローナル抗体(1979-S)を使用した。

免疫プロット法; マウスの坐骨神経をホモジネートし溶解液を加えた。陽性コントロールとして同一マウスの脳を同様にホモジネートした。遠心分離にて溶解液中の不溶物を除去し、上清に Laemmli sample buffer を加えた。SDS-PAGE にて展開し、PVDF メンブレンに転写した後、上記一次抗体を使用し、化学発光試薬にて可視化した。

免疫電顕(金粒子法); 間接酵素抗体法にて免疫染色を行った。二次抗体として金粒子標識抗ウサギ IgG 抗体(no.2004)、金粒子標識抗ヤギ IgG 抗体(no.2006)を反応させ、銀増感を行い、光顕による観察を行った後、EPON812 に包埋して超薄切片を作製し、クエン酸鉛で染色を行い、透過型電顕にて観察を行った。なお陰性コントロールとしては各一次抗体の代わりにウサギ血清およびヤギ血清を使用した。

【結果】

1)免疫プロット法

マウスの脳および坐骨神経において、抗 β カテニン抗体(sc-7199、1247-S)により、88kD の単一のバンドが検出され、抗 ILK 抗体(sc-7516、1979-S)により、59kD の単一のバンドが検出された。

2)免疫電顕

β カテニン; 有髄線維においてその免疫反応は軸索とシュワン細胞の outer loop や lateral loop の細胞質内全体にびまん性にみられ、特に細胞間接着部位や細胞小器官付近に集積する所見はなかった。またシュワン細胞の核内にも免疫反応が認められたが、その単位面積あたりの金粒子数は核周囲の細胞質内と比較して少なかった。髄鞘には免疫反応が認められなかった。無髄線維においての免疫反応は軸索とシュワン細胞の細胞間接着部位にやや集積する傾向にあったが、軸索とシュワン細胞の細胞質内全体にも拡散して認められた。またシュワン細胞の核内にも免疫反応が認められたが、その単位面積あたりの金粒子数は核周囲の細胞質内と比較して少なかった。

ILK; 有髄線維における免疫反応はシュワン細胞の outer loop や軸索の細胞質内にびまん性に認められた。これらは軸索とシュワン細胞の細胞間接着部位や、シュワン細胞と基底膜の接触部位において集積することはなかった。また髄鞘には免疫反応が認められなかった。無髄線維においては、ILK の免疫反応は、軸索とシュワン細胞の細胞間接着部位に集積するものも認められたが、大部分は軸索とシュワン細胞の細胞質内全体にびまん性に分布しており、シュワン細胞と基底膜の接触部位では集積することはなかった。

【考察】

これまでにわれわれは無髄線維の軸索 - シュワン細胞間では両者の細胞膜に N-および R-カドヘリンが発現し、有髄線維の軸索 - シュワン細胞間では N-および R-カドヘリンが発現せず、シュワン細胞 - シュワン細胞間に相当する軸索間膜では発現していることを報告してきた。今回の β カテニンの局在においても有髄線維の軸索膜裏打ち部分では集積が認められず、無髄線維の軸索 - シュワン細胞間の両者の細胞膜裏打ち部分に集積する傾向が認められたことは、前述のカドヘリンの局在とほぼ一致しており、同部位での β カテニンはカドヘリンと複合体を形成している可能性が考えられた。しかしながら、無髄線維軸索内の β カテニンがすべて細胞膜裏打ち部分に集積しているわけではなく、一部の β カテニンは軸索細胞質内にびまん性に局在しており、この局在はわれわれが以前に報告した αN カテニンの局在にも類似していた。カドヘリン-カテニン複合体からの β カテニンや α カテニン

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 1975 号	氏 名	竹内 純一郎
論文題目 Title of Dissertation	Expression of Beta-catenin and Integrin-linked Kinase in the Mouse Sciatic Nerve マウス坐骨神経におけるβカテニンとインテグリン関連キナーゼの発現		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner	田原真也	
	副 査 Vice-examiner	錦織 伸子	
	副 査 Vice-examiner	南 康博	

(要旨は1,000字～2,000字程度)

の解離は細胞間接着が不十分であることを意味しており、無髄線維の軸索-シュワン細胞間の接着は、強固ではなく弱くダイナミックな接着である可能性が考えられた。一方、有髄線維での軸索-シュワン細胞間の接着はカドヘリンを介さないさらに弱いものと想像された。βカテニンのカドヘリン-カテニン複合体からの解離については、βカテニンのチロシンリン酸化、またはβカテニンと3量体G蛋白質のG12サブファミリー(Gα12とGα13からなる)の変異体とのカドヘリン細胞質ドメインに対する競合などが考えられるが、今回の研究では、それを明らかにすることはできなかった。

皮膚損傷時には上皮-間充織形質転換(EMT)と間充織-上皮形質転換(MET)と呼ばれる転換過程があり、EMTにおいてはカドヘリン接着が减弱しインテグリン接着活性が上昇、METではその逆の変化が起きているとされている。ILKはβ1およびβ3インテグリン細胞内領域と結合してこの相互の連携を介在する、セリン/スレオニンキナーゼである multidomain タンパク質である。PNSにおいてはインテグリンα1β1の発現が報告されているため、ILKはPNSでのカドヘリン・カテニン発現相互調整を行っている可能性がある。ILKの局在については、セラチノサイトの分化誘導系において未分化時に焦点接着部位と細胞質内にび慢性に分布していたILKが、その分化とともに細胞-細胞間接着部位に集積するというダイナミックな局在変化が観察されている。また神経系においては、生後初期(生後1日から5日)の髄鞘形成においてILKが末梢神経線維に濃縮し、特にRanvier絞輪部のシュワン細胞突起に集積しているとの報告や、生後2日の中枢神経系のオリゴデンドロサイトでは細胞体と先端を含む突起全体に局在しているとの報告がある。本研究においてILKは有髄線維と無髄線維の両者の軸索細胞質内にび慢性に局在していたが、シュワン細胞の基底膜と接着する膜裏打ち部分には集積を認めなかった。ILKは本来インテグリンが集積する細胞-細胞外基質間の焦点接着に局在するが、これにはILK-PINCH-Parvin複合体の形成が重要であり、これが阻害された細胞ではフィブロネクチンなどへの接着活性が低下するといわれている。今回の実験でILKが基底膜と接するシュワン細胞の膜の裏打ち部分に集積していなかったことは、こうした複合体の形成不全が理由とも考えられた。また細胞質内に拡散して存在するILKがシグナル伝達分子として機能している可能性なども考えられたが結論には至らず、シュワン細胞の核内に認められたβカテニンが転写制御因子として機能しているかなどについても今後の研究課題と思われた。

末梢神経系 (PNS) における軸索 - シュワン細胞や軸索 - 軸索の細胞間接着は、カドヘリンスーパーファミリーなどの接着分子によって媒介され、軸索 - 基底膜やシュワン細胞 - 基底膜といった細胞 - 細胞外基質間接着の大部分はインテグリンなどによって媒介されている。PNS におけるインテグリンの発現は既に知られており、インテグリン関連キナーゼ (ILK) がこれを制御している。ILK の強制発現により E-カドヘリンと β カテニンの細胞間接着部位への局在が抑制され、細胞間接着を不活化すると同時に β カテニンの核への移行を促進すると言われている。PNS における ILK の発現や、軸索およびシュワン細胞内の β カテニンの超微細構造的な局在に関する報告はこれまでになく、故に本研究においてマウス PNS における ILK と β カテニンの発現および超微細構造的な局在が調べられた。

【材料および方法】 8 週令のマウス (BALB/C) が使用された。PNS として坐骨神経が用いられた。抗 β カテニンポリクローナル抗体 (sc-7199)、抗 β カテニンモノクローナル抗体 (1247-S)、抗 ILK ポリクローナル抗体 (sc-7516)、抗 ILK モノクローナル抗体 (1979-S) を使用した免疫プロット、および間接酵素抗体法による免疫染色が行われた。二次抗体としては金粒子標識抗ウサギ IgG 抗体 (no.2004)、抗ヤギ IgG 抗体 (no.2006) が用いられ、光顕による観察後、超薄切片を作製し、透過型電顕による観察が行われた。

【結果】 免疫プロット法では、抗 β カテニン抗体による 88kD の単一のバンドと、抗 ILK 抗体による 59kD の単一のバンドが検出された。免疫電顕では、 β カテニンの免疫反応が有髄線維の軸索とシュワン細胞の outer loop や lateral loop の細胞質内全体にび慢性にみられた。無髄線維における免疫反応は軸索とシュワン細胞の細胞間接着部位にやや集積する傾向にあったが、軸索とシュワン細胞の細胞質内全体にも拡散して認められた。有髄、無髄線維ともにシュワン細胞の核内にも免疫反応が認められたが、その単位面積あたりの金粒子数は核周囲の細胞質内と比較して少なかった。ILK の免疫反応は有髄線維ではシュワン細胞の outer loop や軸索の細胞質内にび慢性に認められ、軸索とシュワン細胞の細胞間接着部位やシュワン細胞と基底膜の接触部位において集積することはなかった。無髄線維での免疫反応は、軸索とシュワン細胞の細胞間接着部位に集積するものも認められたが、大部分は軸索とシュワン細胞の細胞質内全体にび慢性に分布しており、シュワン細胞と基底膜の接触部位では集積することはなかった。

【考察】 申請者らのグループからは過去に、無髄線維の軸索 - シュワン細胞間にお

いて両者の細胞膜に N-および R-カドヘリンが発現し、有髄線維の軸索 - シュワン細胞間では発現せず、シュワン細胞 - シュワン細胞間に相当する軸索間膜では発現していることが報告されている。今回の β カテニンの局在においても有髄線維の軸索膜裏打ち部分では集積が認められず、無髄線維の軸索 - シュワン細胞間の両者の細胞膜裏打ち部分に集積する傾向が認められたことは、前述のカドヘリンの局在とほぼ一致し、同部位での β カテニンはカドヘリンと複合体を形成している可能性が考えられたが、無髄線維軸索内の β カテニンがすべて細胞膜裏打ち部分に集積しているわけではなく、一部の β カテニンは軸索細胞質内にび慢性に局在していた。これらのことはカドヘリン-カテニン複合体からの β カテニンの解離、つまり細胞間接着が不十分であることを意味し、無髄線維の軸索 - シュワン細胞間の接着は、強固ではなく弱くダイナミックな接着である可能性が考えられた。有髄線維での軸索 - シュワン細胞間の接着はカドヘリンを介さないさらに弱いものと想像された。 β カテニンのカドヘリン-カテニン複合体からの解離については、 β カテニンのチロシンリン酸化、または β カテニンと 3 量体 G 蛋白質の G12 サブファミリーの変異体とのカドヘリン細胞質ドメインに対する競合などが考えられている。

さて、皮膚損傷時には上皮-間充織形質転換 (EMT) と間充織-上皮形質転換 (MET) と呼ばれる転換過程があり、ILK はこの相互の連携を介在している。ILK は PNS でのカドヘリン-カテニン発現相互調整を行っている可能性がある。ケラチノサイトの分化誘導系において未分化時に焦点接着部位と細胞質内にび慢性に分布していた ILK が、その分化とともに細胞 - 細胞間接着部位に集積するというダイナミックな局在変化が報告され、また神経系においては、生後初期 (生後 1 日から 5 日) の髄鞘形成において ILK が末梢神経線維に濃縮し、特に Ranvier 絞輪部のシュワン細胞突起に集積しているとの報告がある。本研究において ILK は有髄線維と無髄線維の両者の軸索細胞質内にび慢性に局在していた。本来 ILK は焦点接着に局在するが、これには ILK-PINCH-Parvin 複合体の形成が重要であり、これが阻害された細胞ではフィブロネクチンなどへの接着活性が低下するといわれている。今回の実験で ILK が基底膜と接するシュワン細胞の膜の裏打ち部分に集積していなかったことは、こうした複合体の形成不全が理由の 1 つとも考えられた。本研究は、マウス PNS における ILK と β カテニンの発現およびその超微細構造的な局在について研究したものであるが、今回の研究で得られた知見は PNS における細胞間接着様式についての重要な知見を得たものと認める。よって、本研究者は博士 (医学)

の学位を得る資格があると認める。

A large rectangular area with horizontal dotted lines, intended for handwritten text or notes.