
脳精巢に特異的に発現する新規免疫グロブリン
スーパーファミリーメンバーの機能解析

15590219

平成 15 年度～平成 17 年度 文部科学省科学研究費補助金
基盤研究(C)(2) 研究成果報告書

平成 18 年 5 月

研究代表者 林 要喜知
旭川医科大学 医学部 教授

目次

はしがき	2
研究組織および研究経費	3
研究発表	4
研究成果の概要	6
研究成果	9
1.高齢化にともなう痴呆症予防のための機能性食物食材 に関する研究：アルツハイマー病病態モデル細胞系を 用いた探索	9
2.アミロイドによる神経細胞死に関する研究：アミロイド 蛋白質による細胞死誘導	15
3.アミロイド神経毒に及ぼす抑制効果測定前駆体蛋白質 (APP) 遺伝子高発現ニューロンの細胞変性	18
4.BT-IgSF, a novel immunoglobulin superfamily protein, functions as a cell adhesion molecules	23
5.精子形成、および精子成熟に伴う細胞接着分子 BT-IgSF の発現と局在	31
6.脳精巣に特異的な免疫グロブリン BT-IgSF はニューロ ンの細胞接着に関わっている	45

はしがき

この研究報告書は、平成 15 年～17 年度の 3 年間にわたる文部省科学研究補助金基盤研究 (C)(2)「脳精巣に特異的に発現する新規免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーの機能解析」(研究課題番号 15590219)の成果を中心にまとめたものである。

本研究は 先ず、新規免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーの発見に至ったアルツハイマー病病態モデル研究をさらに進め、病態モデル細胞死誘導に抗する機能性食物食材のスクリーニングを行った。その結果、アミロイド前駆体蛋白質(APP)の高発現細胞などの孤発性アルツハイマー病 (SAD) 病態モデルの細胞死の抑制に働く食材として、チキンエキスおよび大豆・米糠抽出物を明らかにした。さらに、チキンエキスの有効成分の一つとしてアンセリン・カルノシンを明らかにすることができた。また、大豆・米糠抽出物中の有効成分の同定は完成しなかったが、活性物質は Cu^{2+} のキレート剤としての働きが考えられた。

一方、新規免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーである BT-IgSF は、脳や精巣に特異的な分子であるため、両器官における役割を明らかにした。まず、免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーとしての基本的な作用様式、即ち、ホモフィリックな相互作用が働くことを明らかにした。精巣での遺伝子発現や蛋白質の局在から、精子形成プロセスで遺伝子発現し、成熟精子の機能に関わることを明らかにした。脳における遺伝子発現を調べるため、海馬ニューロンの遺伝子発現や局在などを調べ、神経突起の伸展というニューロンの基本的な形態形成に関わっていることを明らかにした。また、過剰発現した細胞では、周囲細胞との接着性を低下させることから、細胞死誘導にいたることを見出した。この現象から、BT-IgSF は細胞接着を高めたり低めたりすることで、神経突起の成長や方向性を調節する役割が存在する可能性を秘めていることも明らかにした。

残念なことは、BT-IgSF がアルツハイマー病病態モデル細胞でどのような働きをするかを明らかにできなかったことと、アデノウイルス作製が進まず、研究計画の一部を修正せざるを得なかった。それゆえ、本研究は、決して十分な成果を上げたプロジェクトとは言えないが、SAD 発症予防の可能性や、脳・精巣の細胞機能を解析する新たな手段を明らかにできたと考えている。また、脳や生殖研究を発展させていくための手段をえたことは望外の喜びであり、本研究による財政的な支援を頂いた文部省に心からお礼を申し上げる。

平成 18 年 5 月

研究代表者 旭川医科大学医学部生命科学
林要喜知

文部科学省科学研究補助金 平成 15 年度ー平成 17 年度

基盤研究(C)(2) 脳精巢に特異的に発現する新規免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーの機能解析

研究課題番号 15590219

研究組織

研究代表者：林要喜知 (旭川医科大学・生命科学・教授)
研究協力者：春見達郎 (旭川医科大学・解剖学講座・助手)
研究協力者：中村正雄 (旭川医科大学・化学・教授)
研究協力者：岡田誠治 (熊本大学・エイズ学研究所・教授)
研究協力者：柳井延也 (独立行政法人食品総合研究所・研究員)

研究経費

交付決定額 (配分額)

	直接経費	間接経費	合計 (金額単位：千円)
平成 15 年	1,400	0	1,400
平成 16 年	900	0	900
平成 17 年	800	0	800
総計	3,100	0	3,100

研究発表

学会誌等

1. Nagai, N. Hayashi, Y., and Yamada, S. (2003)

A flow cytometric analysis for evaluation of human salivary neutrophils.

Asahikawa Medical College Research Bulletin, 4, 39-43.

2. 林要喜知、柳井延也 (2004)

高齢化に伴う痴呆症予防のための機能性食物食材に関する研究：アルツハイマー病病態モデル細胞系を用いた探索。食肉に関する助成研究調査成果報告書。

22、264-269.

3. 林要喜知 (2005)

アミロイドによる神経細胞死に関する研究：アミロイド前駆体蛋白質による細胞死誘導。老年痴呆研究会、14、1-3.

4. Harada, H., Suzu, S., Hayashi, Y., and Okada, S. (2005) BT-IgSF, a novel immunoglobulin superfamily protein, function as a cell adhesion molecule, *J. Cell. Physiol.* 204, 919-926.

5. Harumi, T., Pandi-Perumal, S.R., Martinez, G.R., Mascio, P.D., and Hayashi, Y. (2006) Chromatographic analyses of biogenic melatonin and its related indoleamines. In "From Molecules to Therapy" (Editors: S. R. Pandi-Perumal (Mount Sinai School of Medicine, New York, USA) and Daniel P. Cardinali (University of Buenos Aires, Argentina)). In press.

口頭発表

1. 春見達郎、渡部剛、鈴木伸也、林要喜知 (2003)

新規細胞接着因子(BT-IgSF)のラット精巣における発現
第74回日本動物学会 (函館、9月)

2. 春見達郎、渡部剛、鈴木伸也、林要喜知 (2004)

精子形成、および精子成熟に伴う細胞接着分子 BT-IgSF の発現と局在
第75回日本動物学会 (神戸、2004年9月)

3. Hayashi, Y., Harumi, T., Watanabe, T., and Suzu, S. (2004)

Expression and function of brain- and testis-specific immunoglobulin superfamily (BT-IgSF) in the central nervous system. 第44回アメリカ細胞生物学会 (ワシントンDC、12月8 - 12日)

4. Harumi, T., Hayashi, Y., T. Watanabe, T., and S. Suzu (2004) Expression and distribution of BT-IgSF during spermatogenesis and sperm maturation. 第44回アメリカ細胞生物学会 (ワシントンDC, 12月8-12日)

5. 林 要喜知、春見 達郎、渡部 剛、鈴 伸也 (2005) 脳精巣に特異的な免疫グロブリンBT-IgSFはニューロンの細胞接着に関わっている。第76回日本動物学会 (つくば市、10月6-8日)

6. M. Nakamura, N. Shishido, Y. Hayashi, K. Nakayama, and T. Hayashi (2005) Chelation of copper by three histidine residues of amyloid beta peptide inhibits the redox activity of copper. *Oxidants and Antioxidants in Biology* (イタリア アルバ市、9月7-10日)

研究成果の概要

1. 高齢化にともなう痴呆症予防のための機能性食物食材に関する研究:アルツハイマー病病態モデル細胞系を用いた探索

アルツハイマー病病態モデル系として知られる 3 つの培養系を用いて細胞死を誘導させながら、食物食材の保護効果を調べた。すなわち、1) アミロイドペプチド添加による培養海馬ニューロンの変性誘導、2) アミロイド前駆体蛋白質 (APP) 遺伝子の過剰発現による海馬ニューロン死の誘導、さらには、3) APP に対する抗体による海馬ニューロン死の誘導系であるが、これらのすべてにチキン抽出物が細胞保護的に働いた。その抽出物から活性物質を分離精製したところ、一つの活性物質としてアンセリン・カルノシンであることが判明した。

2. アミロイドによる神経細胞死に関する研究: アミロイド前駆体蛋白質による細胞死誘導

孤発性アルツハイマー病 (SAD) の病態は、老人斑の主成分であるアミロイド A β ペプチドの生産や細胞外蓄積、さらにはその細胞毒性と深く関わっていると考えられている。しかし、アミロイド A β ペプチドをつくり出す APP の発現上昇や代謝異常そのものもニューロンの変性、死滅を誘導することを、本研究で明らかにした。この発見は、SAD 病態の新たな側面を示しており、A β の作用とともにアルツハイマー病の症候群としての多様な一面を反映していると考えられる。

3. アミロイド神経毒性に及ぼす抑制効果測定

アルツハイマー病などで形成される老人斑の主成分であるアミロイド (A β) は、Cu²⁺存在下でニューロンに対する細胞毒性を増強させるが、この毒性を大豆や米糠抽出物が著明に抑制した。また、これらの抽出物は A β の凝集をも阻害する傾向をあわせ持つことから、アルツハイマー病に抗するニューロン保護作用が存在すると考えられた。

4. BT-IgSF, a novel immunoglobulin superfamily protein, functions as a cell adhesion molecule

BT-IgSF 遺伝子を恒常的に発現する白血球がん細胞を作成し、BT-IgSF による細胞凝集塊の形成を調べたところ、BT-IgSF 発現量に応じて凝集塊の大きさが対応していた。次に、発現誘導できるベクターに BT-IgSF 遺伝子を組み込み、NIH3T3 細胞に遺伝子導入した。ホルモンにより BT-IgSF の発現量を上昇させ

たところ、その量に応じて細胞塊が形成された。しかし、BT-IgSF の発現の有無にかかわらず、細胞増殖にはなんの影響も認められなかった。インテグリン β 1 の阻害抗体処理では、細胞塊の形成には何ら影響は及ぼさなかったのみならず、Ca や Mg イオンの依存性も検出されなかった。以上のことから、この細胞塊は、BT-IgSF 同士のホモフィリックな結合様式により形成されたものと考えられた。

5. 精子形成、および精子成熟に伴う細胞接着分子 BT-IgSF の発現と局在

BT-IgSF の遺伝子をラットからクローニングし、インサツハイブリダイゼーションや免疫組織化学により精子形成における BT-IgSF の *in vivo* および *in vitro* の遺伝子発現を調べた。BT-IgSF の mRNA は、先体形成期を中心とした限られた時期に対応する円形精子細胞で認められたが、他の精子形成細胞やセルトリ細胞では認められなかった。BT-IgSF 分子は、精巣上体尾の成熟精子では、頭部、頭部と中片の中間部、および、尾部で、BT-IgSF の陽性反応が確認できた。人工的な先体反応の惹起により BT-IgSF が消失したことや、受精に及ぼす抑制効果が認められた。以上のことから、BT-IgSF は、精子形成、および精子成熟過程、さらには、受精時のイベントにも何らかの作用する分子と考えられた。

6. 脳精巣に特異的な免疫グロブリン BT-IgSF はニューロンの細胞接着に関わっている。

BT-IgSF は、脳精巣で発現する免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーの一つである。今回、BT-IgSF に対する抗体を作製し、その局在や作用をニューロンや神経組織で検討した。培養ニューロンでは、BT-IgSF は細胞膜に存在していたが、長期培養により一部の分子が局在化してきた。海馬組織切片では、錐体細胞層や歯状回顆粒細胞層のニューロンに存在していた。BT-IgSF は培養ニューロンの接着や突起伸展を促進させたことから、ニューロンの接着や突起伸展を制御する分子の一つと考えられた。