

糖尿病性末梢神経障害における蛋白糖化修飾の意義

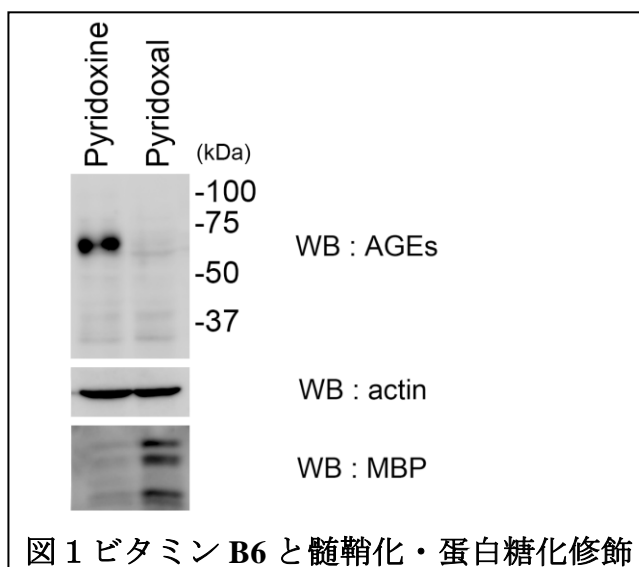
独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第五部
荒木 敏之

1. はじめに

糖尿病性末梢神経障害は糖尿病患者の日常生活動作能力にも重要な影響を及ぼすが、血糖コントロール以外に有効な治療法は存在しない。ヒトで見られる糖尿病性末梢神経障害はマウスなど実験小動物の糖尿病モデルでは再現困難であり、その研究自体が簡単ではない。

我々は最近、DRG（後根神経節）神経細胞と Schwann 細胞の共培養による末梢神経髄鞘化の培養モデル（*in vitro* myelination）において、培養液中のビタミン B6 の有無により髄鞘形成の起こり方が大きく変化すること、この際、通常の培養条件に比べて髄鞘形成が著明に低下している条件下でのみ、共培養における Advanced glycation endproduct (AGE) の産生亢進を認めることを明らかにした。（図 1）

昨年度の本助成研究において、ミエリン化できない培養条件における糖化蛋白が CRMP2 (Collapsin response mediator protein-2) であることを示した。今年度の研究においては、CRMP2 分子のなかでどのリジン残基が糖化修飾を受けているのかを明らかにし、その糖化修飾の髄鞘形成過程における機能を明らかにすることで、糖尿病性末梢神経障害の発症機序の理解と治療法開発に資することを目的とした



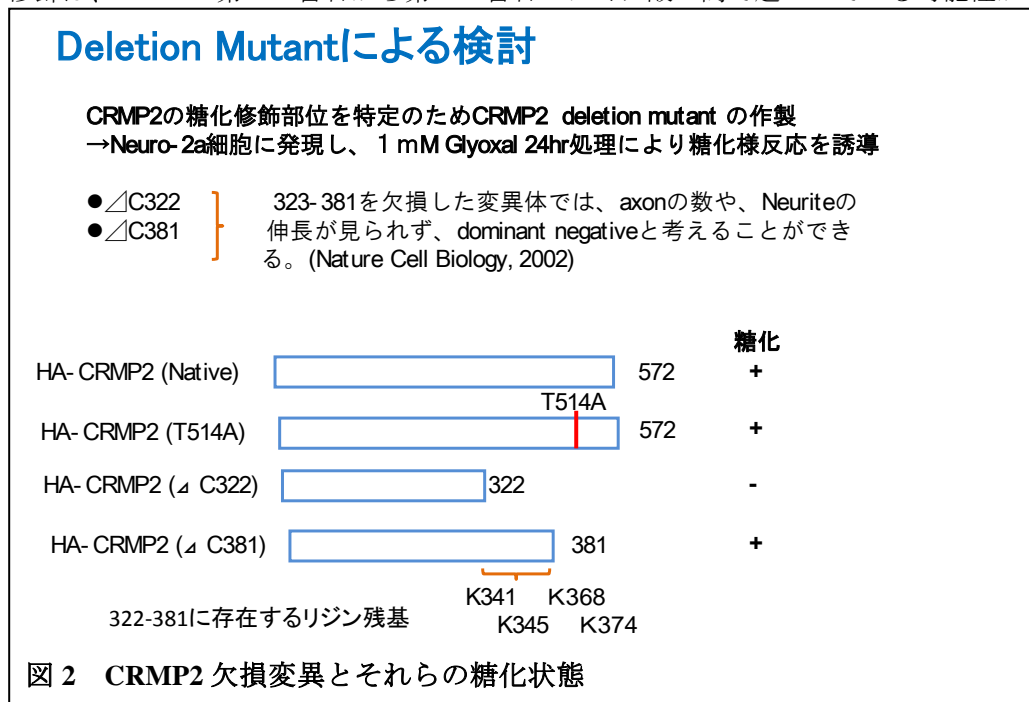
2. 方法

CRMP2 の糖化修飾部位を同定するために、まず図 2 に示すような Deletion mutant を作成した。（全長 572 アミノ酸のうち、 Δ C322 は C 末端側 323 番目以降、 Δ 381 は C 末端側 382 番目以降をそれぞれ欠損する。）これらの分子をそれぞれ培養細胞（Neuro2a 細胞）に発現させ、糖化修飾の状態を検討した。

糖化修飾は非酵素的反応で Gain-of-function 実験が通常難しいため、ここでは Glyoxal を培養液に加えて糖化修飾様反応を加速させ、その結果起こる変化を観察した。Neuro2a 細胞での検討結果はその後初代培養ラットシュワン細胞でも検証した。

3. 結果

図 2 に示すように、今回作成した CRMP2 の C 末側欠損分子のうち、 Δ 381 は Glyoxal による糖化をみとめたが、 Δ C322 は糖化を検出しなかった。同様の結果は、シュワン細胞の初代培養を用いた実験によっても確認された。これらのことから、非ミエリン化培養条件で検出された CRMP2 の糖化修飾は、CRMP2 の第 323 番目から第 381 番目のアミノ酸の間で起こっている可能性が考えられた。



4. 考察

CRMP2 は、微小管関連蛋白として殆ど全ての細胞種に発現しているものと考えられる。過去の報告では神経細胞における機能に関する論文が多く、Schwann 細胞における CRMP2 に関する報告は殆ど見られないが、これまでの検討から、神経細胞における発現レベルより相当程度少ないものの、Schwann 細胞における CRMP2 発現も認められている。また、DRG 神経細胞、Schwann 細胞をそれぞれ個別に培養し、共培養における糖化修飾亢進が認められるのと同じ培養条件で維持したところ、CRMP2 蛋白の糖化は、神経細胞、Schwann 細胞共に検出することができた。これらのことから、現時点では、神経細胞における CRMP2 と Schwann 細胞における CRMP2 のどちらの糖化修飾が髄鞘化との関連において重要なのかは現時点では確定的でない。CRMP2 は、神経細胞においては、軸索に存在する微小管を構成する主要な蛋白である Tubulin の順行性軸索輸送に関連するアダプター蛋白としての機能があり、GSK3 などの酵素が媒介するリン酸化の有無による機能調節を受けることで、軸索の伸展を調節しているものと考えられている。神経細胞の CRMP2 の糖化修飾による影響である場合には、神経細胞・神経突起側の変化を介した反応をがある可能性を示唆するものであると考えられる。

CRMP2 の第 323 番目から第 381 番目のアミノ酸の間には、4 箇所（第 341、345、368、374 番アミノ酸残基）にリジン残基が存在する。図 1 に示す糖化修飾蛋白が Immunoblot 上単一のバンドとして観察されていることから、糖化修飾を受けているのは単一のアミノ酸であるものと推定される。今回示した領域にあるリジン残基に関しては、今後個別に変異を導入し、どの部位の残基が糖化修飾を受けているのかを明らかにする。また、糖化修飾を受ける残基の同定後、その残基に変異を導入し

た CRMP2 を過剰発現したシュワン細胞もしくは CRMP2 を過剰発現した神経細胞を用いて *in vitro* myelination 実験を行った場合に、ミエリン化誘導実験がどのような経過をたどるかを検討する。

5. 参考文献

Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Ménager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H, Kaibuchi K.

CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. Nat Cell Biol. 2002 4(8):583-591.

Wakatsuki S, Saitoh F, Araki T

ZNRF1 promotes Wallerian degeneration by degrading AKT to induce GSK3B-dependent CRMP2 phosphorylation. Nat Cell Biol. 2011 13(12):1415-1423.