

香川県立保健医療大学リポジトリ

平成25年度 香川県立保健医療大学 学内共同研究
課題 「F32分子の発現分布と発現細胞の同定」

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山口, 航, 古山, 達雄, Yamaguchi, Wataru, Furuyama, Tatsuo メールアドレス: 所属:
URL	https://kagawa-puhs.repo.nii.ac.jp/records/262

平成25年度 香川県立保健医療大学 学内共同研究課題 「F32分子の発現分布と発現細胞の同定」

山口 航^{1)*}, 古山 達雄²⁾

¹⁾香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科

²⁾香川県立保健医療大学教養部

2013 Intramural Joint Research at Kagawa Prefectural University of Health Sciences: The Distribution and Identification of Cells Which Express F32

Wataru Yamaguchi^{1)*}, Tatsuo Furuyama²⁾

¹⁾Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Kagawa Prefectural University of Health Sciences

²⁾Department of Liberal Arts and Sciences, Kagawa Prefectural University of Health Sciences

要旨

反発性の軸索ガイダンス因子として見出されたSema 4 Dは、生後の脳において主にオリゴデンドロサイトに発現している。我々はこれまでにSema 4 D欠失により大脳皮質におけるオリゴデンドロサイトの数が増加することを報告した。

Sema 4 DのスプライシングバリエントであるF32は、Sema 4 Dが1回膜貫通型蛋白質であるのに対して、F32は膜貫通領域を持たない分泌型蛋白質という特徴を持つ。F32の蛋白質レベルの解析をすすめるにあたり、特異抗体が必要であった。そこでSema 4 D欠失マウスに抗原を投与して抗体を作製し、免疫組織化学、免疫沈降およびイムノブロットにて各抗体の有用性を検討した。しかしながら各実験において良好な結果を示す抗体は得られず、抗原の再構築が必要と思われた。

Key Words: セマフォリン (Semaphorin), スプライシングバリエント (splicing variant), 分泌型蛋白 (secretory protein), 抗原 (antigen), 抗体 (antibody)

*連絡先: 〒761-0123 香川県高松市牟礼町原281-1 香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科 山口 航

*Correspondence to: Wataru Yamaguchi, Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Kagawa Prefectural University of Health Sciences, 281-1 Murecho-hara, Takamatsu, Kagawa 761-0123, Japan
E-mail: yamaguchi@chs.pref.kagawa.jp

研究背景

Semaphorinは現在20種類を超えるメンバーが同定されており、細胞外にSemaドメインと呼ばれる500程のアミノ酸からなる領域をファミリーで共有し、Semaドメインに続くC末端側の構造の違いから8つのサブクラスに分類されている。Semaphorinの生物活性は、血管・脈管形成¹⁾、がんの転移・浸潤²⁾、骨代謝調節³⁾、免疫調節⁴⁾など多彩であり、アレルギー疾患や自己免疫疾患、骨代謝疾患、神経変性疾患、心臓の突然死、がんの転移・浸潤などの「疾患の鍵分子」であることが示され、疾患の診断・治療の新たな標的としても注目されている⁵⁾。我々はそのなかの1つであるSemaphorin 4 D（以下Sema 4 D）に着目して研究を行い、これまでにSema 4 Dが髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトの細胞死を誘導し、細胞数を調節していることを明らかにした⁶⁾。

Sema 4 DのスプライシングバリエーションであるF32は、構造としてはN末端側からSemaドメインとPSIドメインを共通配列として持つものの、Sema 4 Dとは異なり細胞膜貫通領域を持たない分泌型蛋白質である。学内共同研究課題として採択していただいたから、これまでに*in situ* hybridization法を用いてmRNAレベルにおける発現分布等を解析してきた。生後7日齢から生後42日齢の脳について観察したところ、Sema 4 Dとよく似た分布を示すものの、発現細胞はF32の方がより多く認められた。蛋白質レベルの解析を行うには抗体が必須であり、現在のところeBioscience社から販売されているSema 4 D抗体がある。この抗体はSema 4 DとF32の共通配列部分を抗原として作製された抗体なので、おそらく両方の分子を認識していることが推測される。そこで、蛋白質レベルにおける発現分布、発現量、発現細胞の同定などを遂行していくにあたり、F32特異的抗体の必要性が生じたため作製を試みるに至った。

研究目的

F32分子の機能解析を進めていくにあたり、特異抗体の必要性が生じた。そこで、Sema 4 D欠失マウスにF32抗原を投与してF32特異抗体を作製することを目的とした。

実験方法

マウス

大阪大学医学系研究科より分与頂いたSema 4 D欠失マウスを使用した。このマウスはSema 4 DおよびF32蛋白質共に発現していない。本動物実験は香川県立保健医療大学動物実験委員会の承認を得ておこない（承認番号25-8）、全ての実験は動物の倫理的な使用に関する国際ガイドラインに従っておこなった。

抗原の調整と投与

Sema 4 Dとの共通配列以降であるC末端領域の172アミノ酸を抗原とするため、GST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）融合F32蛋白質を生成した。

生成した抗原はマウス1匹の1回の投与に30 μ gを使用し、28日毎に再投与を行い、3回目の投与後28日目に血清を回収した。マウスは9匹を使用し、各個体から回収した血清に含まれる抗体をそれぞれclone 1～9とした。

抗体

免疫組織化学には抗Sema 4 D抗体（eBioscience）および抗myelin-associated glycoprotein（MAG）抗体⁷⁾を使用した。免疫沈降に使用したのは抗HA抗体（Santa Cruz Bio）および上記と同じ抗Sema 4 D抗体である。市販のSema 4 D抗体はSema 4 DとF32の共通配列部位を抗原として得られた抗体であり、両方を認識している可能性がある。

F32抗原を免疫することにより得られたクローンのうち、抗体価の高かったclone 9を免疫組織化学、免疫沈降、イムノブロット解析に使用できるか試みた。

免疫組織化学

動物はペントバルビタールを使用して深い麻酔下のもと、冷却した生理食塩水で灌流後さらに2あるいは4%のパラホルムアルデヒド（PFA）を灌流させた。前脳の切片はクリオスタット（Leica CM3050S）を使って20 μ mに薄切した。0.3% Triton X-100と5%ウシ胎仔血清を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）でブロッキングを行い、0.3% Triton X-100と2%ウシ胎仔血清を含むPBSで希釈した一次抗体を4℃で一晩反応させた。PBSで3

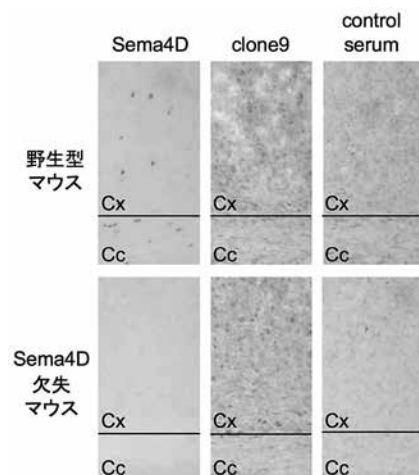


図1 免疫組織化学(DAB基質によるペルオキシダーゼ染色) 野生型(上段)およびSema4D欠失(下段)マウスの大脳皮質(cerebral cortex: Cx)と脳梁(corpus callosum: Cc)における免疫組織化学像を示す。Sema4D抗体(左)、clone 9(中央)、control serum(右)を使用した。ここで用いたcontrol serumはF32抗原を投与する前に回収したマウス血清である。

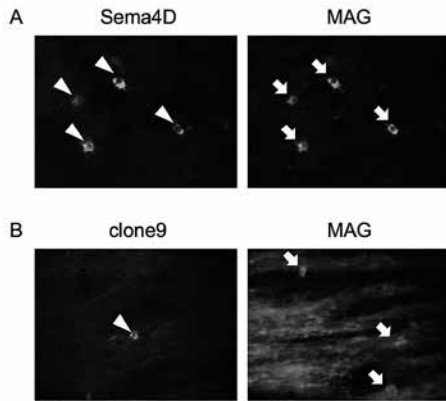


図2 免疫組織化学(蛍光二重染色)

野生型マウス的大脑皮質, 脳梁における蛍光二重染色像を示す。(A)Sema4D陽性細胞(矢頭)とMAG陽性細胞(矢印)。(B)clone 9陽性細胞(矢頭)とMAG陽性細胞(矢印)。

回洗浄後, 適切な二次抗体(Amersham)を2時間室温で反応させた。免疫ペルオキシダーゼ組織化学解析では, 切片は免疫反応をする前に0.3%過酸化水素処理を行い, diaminobenzidine (DAB)を基質とするペルオキシダーゼABCキット(Vector Laboratories)を使って, アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ反応にて可視化した。画像は光学顕微鏡(Nikon)とデジタルカメラ(Olympus DP70)を使用して取得した。DyLight488, DyLight549, Alexa488およびAlexa555標識された種特異的二次抗体(KPL)は二重免疫蛍光染色の際に, 核染色を行うヘキスト33258(Nacalai Tesque)と共に使用し, 蛍光顕微鏡(Nikon)を使用することで蛍光顕微鏡像を得た。

免疫沈降

HEK (human embryonic kidney) 293細胞にpEF-BOSプラスミドをポリエチレンイミン試薬を用いて遺伝子導入し, HAタグ付きのSema 4 D蛋白質およびF32蛋白質を強制発現させた。回収した細胞は50mM Tris-HCl

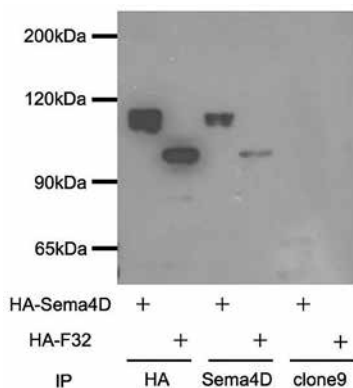


図3 免疫沈降

HEK293細胞にHAタグの付いたSema4DあるいはF32蛋白質を強制発現させ, HA抗体(左), Sema4D抗体(中央), clone 9(右)それぞれで免疫沈降をおこないHA抗体にて検出した。

(pH7.5), 150mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10mM MgCl₂, 1 % Triton X-100, 1 % phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)を含む溶液に溶解し氷上に30分静置した。細胞溶解液に各抗体を添加し, プロテインGセファロースにて目的の蛋白質を分離した。

イムノブロット解析

8 %のsodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelectrophoresis (SDS-PAGE)にて電気泳動を行い, Immobilon-P メンブレン (Millipore) にイムノブロットした。一次抗体を4℃で一晩反応させ, 室温にて二次抗体を一時間反応後, ECL (GE Healthcare)により目的のバンドを検出した。

結 果

免疫組織化学

生後21日齢の野生型とSema 4 D欠失マウスの脳切片を用いた(図1)。まず陽性コントロールとして使用したSema 4 D抗体では大腦皮質, 脳梁ともに陽性細胞を認め, 欠失マウスでは認められなかった。次にclone 9の免疫組織化学染色では欠失マウスにおいても陽性細胞が認められ, かなりバックグラウンドが高く本物の陽性細胞が存在するのか判断することが困難であった。

我々は以前の研究で, Sema 4 D陽性細胞は成熟したオリゴデンドロサイトであるMAG陽性細胞と一致することを明らかにしている。そこでclone 9陽性細胞とMAG陽性細胞が一致するか検討するため, 蛍光二重染色を行った(図2)。陽性コントロールとして使用したSema 4 D陽性細胞とMAG陽性細胞は一致したが(図2 A), clone 9陽性細胞は一致しなかった(図2 B)。

免疫沈降

次に免疫沈降の結果を図3に示す。陽性コントロールとして使用したHA抗体による免疫沈降では, Sema 4 Dは約110kDa, F32は約100kDaに認められた。しかしclone 9による免疫沈降においてはそのようなバンドは認めら

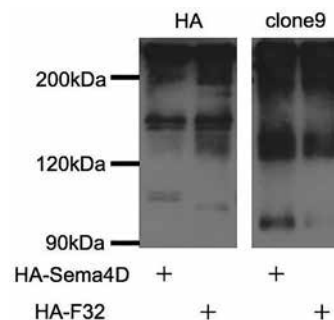


図4 イムノブロット

免疫沈降同様に, HAタグの付いたSema4DあるいはF32蛋白質を強制発現させ, 細胞溶解後の上清をサンプルとした。HA抗体(左)とclone 9(右)にて検出をおこなった。

れなかった。また、Sema 4 D抗体による免疫沈降ではHA抗体で認められたのと同じバンドが見られ、市販のSema 4 D抗体はF32分子も認識することが明らかとなった。

イムノブロット

免疫沈降の時と同様に、HA抗体ではSema 4 Dは約110kDa、F32は約100kDaに認められたが、clone 9では認められなかった(図4)。

考 察

欠失マウスを使用してF32分子に対する特異抗体を作製し、免疫組織化学、免疫沈降、イムノブロットにてその有用性について検討した。

残念ながら良好な結果は得られなかった。原因としては抗原として用いた蛋白質がGST融合蛋白質であり、GSTに対する抗体も多く作られたためではないかと思われる。実際、陰性コントロールとして生成したGST単独蛋白質にも各個体の血清は反応していた。よってF32蛋白質のみを抗原として投与することが望ましいと思われた。

一方、本実験とは直接関係はないが、市販のSema 4 D抗体が免疫沈降実験においてSema 4 DのみならずF32を沈降できることが確認できた。このことからSema 4 D抗体はSema 4 Dと共にF32も認識することが明らかとなった。つまり、この抗体を使用した研究において、Sema 4 Dの作用と考えられていたものが、実はF32の作用である可能性も否定できないわけである。Sema 4 Dは1回膜貫通型蛋白質であるものの、細胞外領域で切断され可溶性Sema 4 Dとして存在することが知られている。分泌型蛋白質であるF32とどのような関係で機能を調節しているのか、あるいは全く異なる機能を有するのか、非常に興味深いところである。その解析をすすめるためには、受容体の同定と特異抗体が必須であり、明らかにできるよう今後も研究に邁進していきたいと思う。

謝 辞

本研究は学内共同研究費助成のもとに行われたものである。本研究にご理解いただき深く感謝致します。

引用文献

- 1) Conrotto P, Valdembrì D, Corso S, Serini G, Tamagnone L, et al. Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1. *Blood* 105(11) : 4321-4329, 2005.
- 2) Ch'ng E, Tomita Y, Zhang B, He J, Hoshida, et al. Prognostic significance of CD100 expression in soft tissue sarcoma. *Cancer* 110(1) : 164-172, 2007.
- 3) Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, et al. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat Med* 17(11) : 1473-1480, 2011.
- 4) Kumanogoh A, Watanabe C, Lee I, Wang X, Shi W, et al. Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity* 13(5) : 621-631, 2000.
- 5) 熊ノ郷淳. “セマフォリンによる疾患制御のダイナミクス”, 羊土社, 東京, 実験医学 31(4), 2013.
- 6) Yamaguchi W, Tamai R, Kageura M, Furuyama T, Inagaki S. Sema4D as an inhibitory regulator in oligodendrocyte development. *Mol Cell Neurosci* 49(3) : 290-299, 2012.
- 7) Matsuda Y, Okitsu A, Sato S, Koito H, Yamamoto H. Soluble myelin-associated glycoprotein-immunoglobulin G1 chimera protein promotes neurite outgrowth from mouse cerebellar neurons. *Neurosci Lett* 205(2) : 87-90, 1996.

Abstract

Semaphorin 4D (Sema4D), originally found as a negative regulator of axon guidance, is mainly expressed by oligodendrocytes in the postnatal brain. We have previously reported an increase in the number of oligodendrocytes in the cerebral cortex by a lack of Sema4D.

F32, a splicing variant of Sema4D, is a novel molecule without any transmembrane region, unlike Sema4D with a single transmembrane region. For the protein analysis of F32, its specific antibodies are needed. Thus, antibodies were raised by injecting an antigen into Sema4D-deficient mice, and examined for their usefulness in immunohistochemistry, immunoprecipitation, and immunoblotting. However, no antibodies showing a favorable result were obtained. Therefore, further reconstruction of effective antigens is necessary.

受付日 2015年10月8日

受理日 2016年1月25日