



USING PROMEGA ANTIBODIES FOR NEUROSCIENCE RESEARCH

REVIEW BY MICHELE ARDUENGO, PH.D., PROMEGA CORPORATION

本稿では、神経の発達や疾病の進行における分子イベントを追跡するためにプロメガの抗体を使用した文献に焦点をあてました。抗体は様々なモデル系の中でシグナル伝達のカスケードや細胞死の形態、シナプスの可塑性の研究に使用され、初代培養細胞、線虫から哺乳動物まで幅広く用いられています。

はじめに

現在の神経科学分野における研究者の多くは、ノーマルな発達の基本となる分子イベントや神経の疾病で病態に導く分子イベントを理解しようとしています。研究者は細胞内プロセスを制御する分子経路を見つけるために、細胞や組織に存在する特定の分子を追跡し、変化(タンパク質のリン酸化など)を検出しなければなりません。ここで紹介する文献ではプロメガの抗体を用いて、シグナル伝達カスケードを構成する分子を研究し、ある特定の細胞タイプに特異的なマーカータンパク質を検出しています。

プロメガの抗体は、様々なモデル系の中でシグナル伝達のカスケード、細胞死の形態やシナプスの可塑性の研究に使用され、初代培養細胞、線虫から哺乳動物まで幅広く用いられています。

リン酸化プロテインキナーゼを検出する抗体

神経系の発達には、プログラムされた遺伝的イベントと周囲からの信号の両方が必要です。皮質性神経形成は胚形成の間起こりますが、それを促進するシグナル伝達経路についてはほとんど知られていません。最近、皮質前駆細胞が分裂終了神経細胞に移行する際のMEK-C/EBP経路の役割を調べた研究がなされました(1)。著者らは、神経形成初期の胎生マウスから単離した皮質前駆細胞でのリン酸化ERK(MEKの下流側の基質)のレベルを調べました。ウェスタンブロット分析の結果では、FGF2の存在下で培養した前駆細胞でERKがリン酸化されていることが示されました。培養細胞に優性阻害型のMEKを含むアデノウイルスを感染させ、コンストラクトのMEK活性に対する阻害効果を確認するためにAnti-ACTIVE® MAPK pAb(カタログ番号V8031)を用いた細胞免疫染色実験を行いました。著者らは細胞の生存や分化への阻害効果を調べ、このシステムにおいてMEK-C/EBP経路の活性化が皮質前駆細胞の神経分化への移行を促進させていると結論付けました。

神経系の発達は胚形成後も停止しません。視覚皮質の神経配線は、多くの部分が活性あるいは経験に依存したイベントにより形成されます。プロテインキナーゼ CaM KIIは、シナプスの可塑性のメカニズムに関与しており、神経細胞の核や樹状突起へのシグナルを開始し、自己リン酸化によりシグナルが維持されます。一次視覚野におけるCaM KIIの転写および翻訳は、視覚的な経験により影響されます。自己リン酸化が起きないCaM KII変異体を持つトランスジェニックマウスでは、CaM KIIの自己リン酸化が視覚皮質の眼優位性の可塑性に要求されます(2)。著者らはトランスジェニックマウスから単離した組織から、Anti-ACTIVE® CaM KII pAb(カタログ番号V1111)を用いた免疫組織染色およびウェスタン分析によりリン酸化したCaM KIIを検出しています。

神経栄養因子およびレセプターに対する抗体

神経栄養因子およびそのレセプターは、発達期における神経系を形成する分子であり、可塑性や組織修復、神経組織の損傷に対する反応決定にも直接的な関わりを持っています。中枢神経系(CNS)の損傷への反応では、ニューロトロフィンレセプター(p75)が誘導されます。Beattieら(3)の近年の発表では、p75の誘導には脊髄損傷への反応としてのオリゴデンドロサイトの細胞死および前駆体NGFが必要であると報告されています。著者らは、脊髄損傷後の損傷中央部におけるNGF、BDNF、NT-3の前駆型と成熟型のレベルをウェスタン分析によりモニタリングしました。プロメガのAnti-Human NT-3 pAb(カタログ番号G1651)およびAnti-Human BDNF pAb(カタログ番号G1641)はこれらの神経栄養因子の成熟型をモニタリングするために使用されました。脊髄損傷に対する反応では、NT-3およびBDNFの前駆型、成熟型とも顕著な増加は認められませんでした。NGFについては前駆型、成熟型とも増加しました。前駆体NGF分子は、脊髄損傷後のp75活性化アポトーシスにおいて重要であると考えられました。この実験では、前駆体NGFがp75^{+/+}オリゴデンドロサイト培養細胞ではp75活性化アポトーシスを誘導するが、p75^{-/-}オリゴデンドロサイトでは誘導しないことを示しています。

神経系修復の研究では、CNSミエリンで認められるいくつかの再生阻害因子の1つであるMAG(myelin-associated glycoprotein; 4)のシグナル伝達経路が調べられています。これらの因子はNogo receptor(NgR)と高い親和性を持っていますが、NgRには細胞質ドメインが無いためコレセプターとともに機能していると考えられています。Anti-Human p75 pAb(カタログ番号G3231)は、免疫沈降実験で使用され、NgRのコレセプターとしての役割をp75が担っており、さらにp75^{NTR}の軸索の再生に関する役割についての証拠を提供しました。

-ガラクトシダーゼに対するマーカー抗体

マーカータンパク質は、細胞や組織内に存在するタンパク質を追跡するために不可欠なツールです。Lac-Z遺伝子は、生物学において標準的なマーカーとして有用であり、細胞運命に特異的なタンパク質に付加するタグとして、あるいは遺伝子上異なる細胞から特定の細胞群を判別するために汎用されています。最近の研究では、線虫(*Caenorhabditis elegans*)の中で特異的に分化した細胞群を検出するためにAnti-β-Galactosidase mAb(カタログ番号Z3781)が使用されています(5)。著者らは、アルツハイマー病に関わるヒト-プレセリン遺伝子のホモログ*C.elegans sel-12*のサブレッサーとして同定された遺伝子を調べました。細胞内のプレセリンの厳密な役割は完全には理解されていません。この研究は、線虫プレセリンと相互作用する遺伝子を調べるための探索です。*Sel-12*変異は、雌雄同体である線虫のuterusとvulvaの間に位置する膜を形成するpi細胞が正常な特性を示すために欠かせないLIN12/Notchシグナル経路に影響を与えると考えられました。著者らは遺伝子導入した*Lin-11::lac-Z*の特異的発現を基にpi細胞の同定を行いました。検出にはAnti-β-Galactosidase mAbが用いられました。

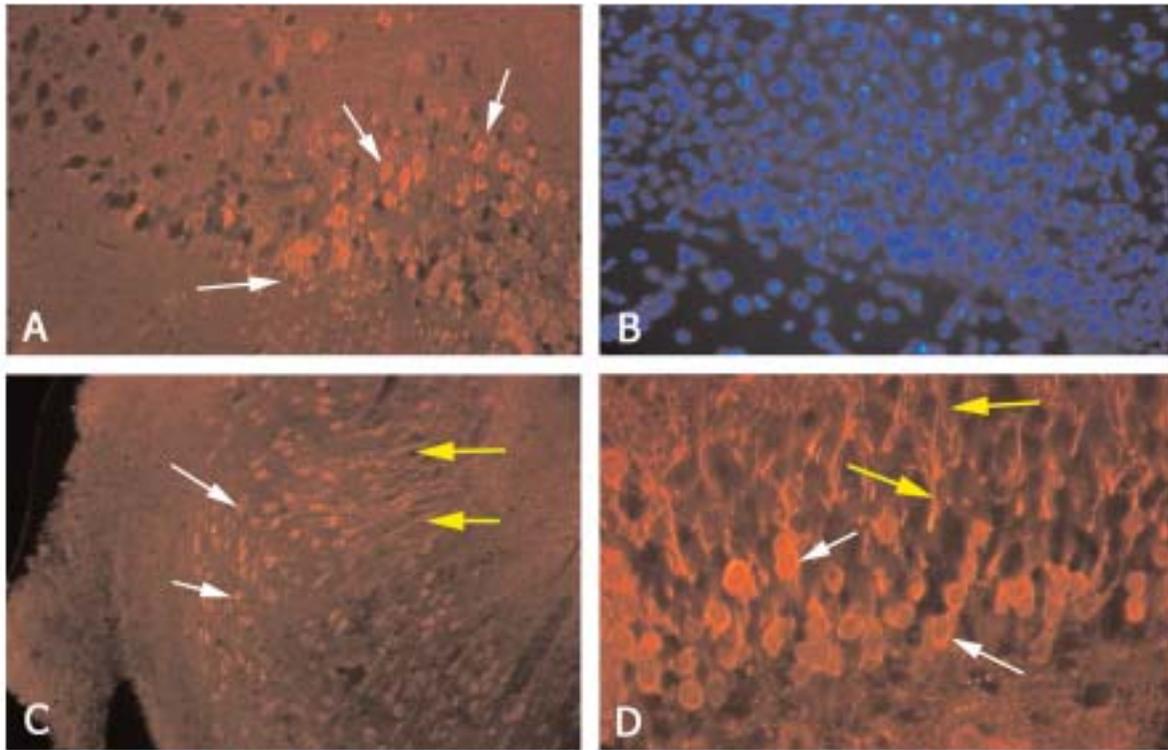


図1. ラット海馬細胞のAnti-ACTIVE® CaM KIIによる染色

4つのイメージは全て同じ切片を用いた。パネルA：標識された部分は、錐体神経細胞の部分集合部に特異的（白矢印部）。パネルB：Aと同じ部分をDAPIによる核染色を行い、さらにAnti-ACTIVE® CaM KIIを用いて細胞部分集合を染色した。パネルC：Anti-ACTIVE® CaM KIIで染色した異なる領域の神経細胞の細胞体（白矢印）および流体樹状突起（黄矢印）を示した（low power image）。パネルD：神経細胞 細胞体（白矢印）および樹状突起（黄矢印）が強く染色された錐歯状顆粒細胞のイメージ（high power image）。Hoffman *et al.* (2001) *Cell Notes* **1**, 4-7.より転載。

他の研究では、哺乳動物の神経管の発達形成における *Sonic Hedgehog* (SHH) の役割が調べられました。この研究では、キメラマウスの野生型宿主細胞と変更を加えた胚性幹細胞を見分けるために Anti-β-Galactosidase mAb を使用しています (6)。 *Drosophila Hedgehog* 遺伝子に関連する脊椎動物の3つの遺伝子の1つである *Sonic Hedgehog* は、発達する神経管の背部-腹部および前後軸に沿った神経前駆細胞の運命決定に関わっています。著者は *Smoothened* (*Smo*) キメラの細胞運命に見られる神経管のパターンにおける *shh* の役割を調べました。 *Smoothened* は *Hedgehog* のシグナリングに必要な遺伝子です。作製されたキメラマウスは様々な遺伝的バックグラウンドを持った *smo^{+/+}*、*smo^{-/-}* または *smo^{+/+}* です。キメラの作製の間、β-ガラクトシダーゼは遺伝的に変更された胚性細胞のマーカーとして使用されました。

参考文献

1. Menard, C. *et al.* (2002) An essential role for a MEK-C/EBP pathway during growth factor-regulated cortical neurogenesis. *Neuron* **36**, 597–610.
2. Taha, S. *et al.* (2002) Autophosphorylation of αCaMKII is required for ocular dominance plasticity. *Neuron* **36**, 483–91.
3. Beattie, M.S. *et al.* (2002) ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* **36**, 375–86.
4. Wong, S.T. *et al.* (2002) A p75^{NTR} and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat. Neurosci.* **5**, 1302–7.
5. Jarriault, S. and Greenwald, I. (2002) Suppressors of the egg laying defective phenotype of *sel-12* presenilin mutants implicate the CoREST corepressor complex in LIN-12/Notch signaling in *C. elegans*. *Genes and Development* **16**, 2713–28.

6. Wijgerde, M. *et al.* (2002) A direct requirement for Hedgehog signaling for normal specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord. *Genes and Development* **16**, 2849–64.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Anti-Human NT-3 pAb	200µg	G1651	51,000
Anti-Human BDNF pAb	200µg	G1641	51,000
Anti-Human p75 pAb	200µg	G3231	51,000
Anti-ACTIVE® MAPK pAb, Rabbit (pTEpY)	40µl	V8031	65,000
Anti-ACTIVE® CaM KII pAb, Rabbit, (pT ²⁸⁶)	40µl	V1111	65,000
Anti-β-Galactosidase mAb	100µg	Z3781	5,500
	2mg	Z3783	44,000