

神経細胞内における S-100 蛋白の分布

京都大学医学部脳神経外科学教室 (主任: 半田 肇教授)

織 田 祥 史 武 内 重 二 半 田 肇

(原稿受付: 昭和47年 7 月20日)

The Distribution of the S-100 Protein in the Nerve Cell

YOSHIFUMI ODA, JUJI TAKEUCHI and HAJIME HANDA

The Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School

The localization of the S-100 protein, which is specific to the nervous tissue, was studied in the cultured nerve cells derived from the chick embryo cerebellum and in the nerve cells of the cerebrum, cerebellum and spinal cord of the new born chicken. In the former, the S-100 protein was not noted in the nucleus, but in the cytoplasm with direct fluorescent antibody technique. In the latter, the same distribution was also demonstrated. Such a topographic localization in the nerve cells is the same as that in the glial cells. Thus, it may be considered that the S-100 protein is a common protein in the cells which are originated from the neural tube and plays a fundamental role in the function of the nervous system, such as the excitability or active transport mechanism of the cell membrane, etc.

緒 言

1965年 Moore は DEAE セルロースカラムとデンブengel電気泳動法を組み合わせた2次元展開の方法を用いて、ウシの肝臓と脳の蛋白質を比較し、脳にのみ存在する強酸性の蛋白質 (S-100 蛋白) を発見し、この蛋白が脳以外の組織にはほとんど存在しないことを証明した¹⁾。その後の研究でこの蛋白が種々の脊椎動物の神経組織に存在すること²⁾³⁾、また動物の成長とともに (とくに神経機能の発達と平行して) 増加すること⁴⁾、そしてまた各々の動物によってもほとんど免疫学的な種族差がないこと²⁾³⁾ などがわかり、ますます神経機能に何らかの関連性があることを示唆することとなった。

さらに細胞内における S-100 蛋白の分布については 1966年 Hydén らが間接蛍光抗体法をグリア細胞及び Deiters 神経細胞に應用して、グリア細胞では細胞質に、神経細胞ではその核に S-100 蛋白が存在すると報告した⁵⁾、

一方、Dravid, Moore, Perez, De Robertis らは、脳組織ホモゲネートから得た全細胞の核分画内に disc electrophoresis 法で S-100 蛋白を証明しえないこと⁶⁾、定量補体結合法 (C'-fixation) によって S-100 蛋白が神経線維にも存在すること⁷⁾、Wallerian 変性による神経線維の破壊に平行して S-100 蛋白含有量が増減すること⁸⁾ などを証明し、Hydén の説に反論している。

S-100 蛋白の細胞内における分布が確定されれば、それがこの蛋白質の機能を類推するための1つの有力な手段になるものと考えられる。しかし、前述のように分布に関しては定説がないので、我々は廻転培養法、静置培養法の両者を用いて鶏胎の小脳組織を培養しこれに直接蛍光抗体法を應用して、グリア細胞、神経細胞における S-100 蛋白の分布を検討した。そしてグリア細胞では Hydén の言うように細胞質にのみ存在することを証明したので先に報告したが⁹⁾、今回神経細胞では Hydén の主張と異なって、グリア細胞と同じく S-100 蛋白が細胞質に存在し、核内には存在

しない所見を得た。更に *in vivo* においても、ヒヨコの小脳 Purkinje 細胞、頸髄前角細胞などにおいて同様の所見を得たので報告する。

実験材料および実験方法

1. 組織培養

7～13日目の鶏胎の小脳皮質を 0.5～1.0mm 角に鋭に細切し、reconstituted rat-tail collagen coated cover slip¹⁰⁾上に移植し、roller tube method および Earle フラスコによる静置培養を行なった。培地は Eagle Minimum Essential Medium 65%, chick embryo extract 5%, Bovine serum 30% よりなり、Glucose を最終濃度で 500mg/dl となるように添加、最後に微量 HCl にて培地の pH を 6.8～7.0 に調整した。抗生物質は使用しなかった。培地交換は roller tube method の場合は週1回、静置培養の場合は3～4日に1回とした。標本は倒立位相差顕微鏡 (日本光学 MD 型) で毎日観察し、培養10日目～20日目で良好な神経細胞の得られたときに、一部を 0.1% thionine による Nissle 染色に¹¹⁾、一部を直接蛍光抗体法による染色に使用した。

2. S-100 蛋白抗血清

S-100 蛋白は Moore の方法を一部 modify した武内の方法⁹⁾に従って抽出精製した。この蛋白質は DEAE セファデックス、セファデックス G-100 カラムクロマトグラフィーでいずれも単一ピークをなし、アクリルアミドゲル電気泳動法で buffer front よりわずかに陽極側に単一帯として現われることから、Moore の云う S-100 蛋白と同一のものであることが確認された⁹⁾。Levine and Moore の方法で¹²⁾家兎に抗血清を作った。この γ -グロブリン分画は Kekwick¹³⁾に従い硫酸ナトリウム沈降法を用い、次いで 5mM リン酸緩衝液 pH 8.0 で DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーで精製した。

3. 螢光色素による抗体のラベル

精製した γ -グロブリンを Goldstein¹⁴⁾ らに従い、Fluorescent Isothiocyanate (FITC): BBL 製と結合させ、セファデックスカラムクロマトグラフィーで未結合色素を除去し、更に DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーで 0.05M リン酸緩衝食塩溶液 pH 7.2 で精製した。この色素:蛋白モル比 (F/P ratio モル比) は 1:1 である。

4. 螢光抗体による染色

cover slip 上に培養された細胞を位相差顕微鏡 (日

本光学 SUR-Ke 型) で観察、神経細胞を同定の後 diamond marker でチェックし、これを浜島、京極の法¹⁵⁾に従い染色した。染色用緩衝液は、0.15M NaCl-0.01M リン酸ソーダ緩衝液 pH 7.2 を使用し、培養細胞を10分間、冷純メタノールで固定後、FITC 標識螢光抗体で 37°C、60分処理した。観察には Carl Zeiss 螢光顕微鏡、Osram HBC-200 光源、BG-12 exciter filter, Zeiss barrier filter, 明視野コンデンサーを使用、フィルムは Tri-X pan (ASA 400) を使用した。

5. *in vivo* 標本

in vivo の標本は、生後1日目の鶏雛を断首後すばやく大脳、小脳、頸髄を摘出し、同じく浜島、京極の安田変法¹⁶⁾に従い、螢光染色に応用した。

実験結果

rat tail collagen で処理した cover slip 上に植えた組織片からは、培養2日目頃より周囲に向かって線維芽細胞、グリア細胞の遊出が盛んに見られるようになり、どんどん組織小片の平坦化がすすんだ。ほぼ1週目頃には、かつて組織小片が占めていたと考えられる培養片の中央部と、これに続く傾斜部に円形、楕円形あるいは三角形の大型細胞が認められるようになった。核は円形で大きく、核形質は明かるく半透明泡状に見え、特別の内部構造を示さなかった。核小体は通常1個、円形で大きく、かつ明確、核内に占める位置は不定であった。細胞形質は比較的 phase dense で、多数の粗大あるいは微細顆粒と無数の糸状、桿状あるいは垂鈴状をしたミトコンドリア様物質を含有していた。(図1) これらの形態学的特徴から¹⁷⁾、この大型細胞は神経細胞であると推定できたが、これを更に確実にするために Nissle 染色を行なった。(図2) 次に位相差顕微鏡下で比較的平坦な部に孤立している神経細胞を選び、これに FITC 標識螢光抗体を反応させると明らかに核を除く細胞質のみが反応した。

(図3 a. b) 螢光の強さはグリア細胞における反応(図4)よりやや弱く、その細胞質内における分布は、不均一で核膜近くで強く、ときに神経細胞線維様構造物にそってより高濃度に存在するようにみえた。

この *in vitro* における神経細胞における局在を更に確認するため *in vivo* の標本として、生後1日目の鶏雛の小脳 Purkinje cell、脊髄前角細胞、大脳神経細胞について調べたが、その低温パラフィン切片標本での反応は(図5, 6, 7) いずれも核を除いた細胞質に

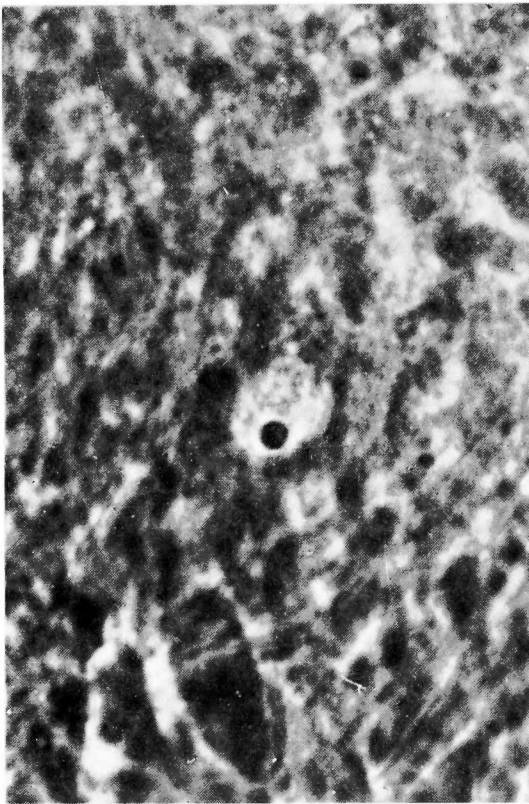


Fig. 1 cultured cerebellar nerve cell of the chick embryo (12 days in vitro); The round and clear-cut nucleolus is definitely noted and eccentrically situated in the nucleus that is relatively phase bright and round shaped. The cytoplasm is phase dense. Cellular boundary is not noted clearly in this figure.: phase contrast $\times 1500$

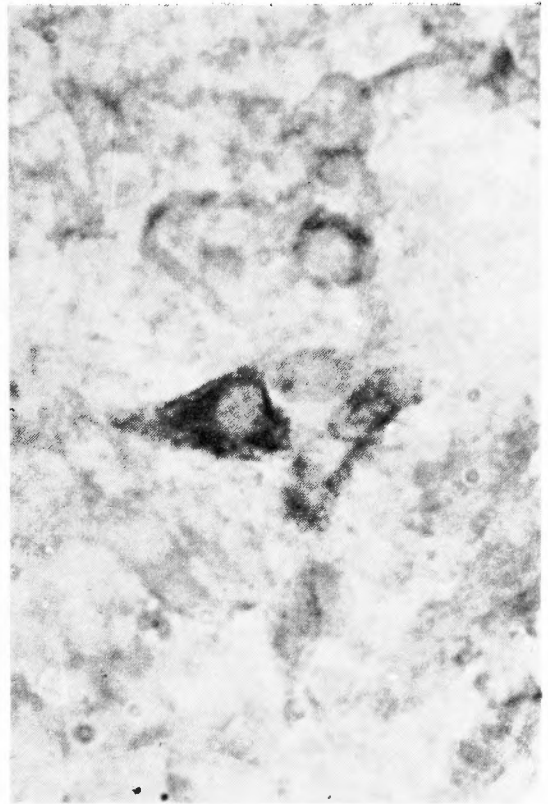


Fig. 2 cultured nerve cell (12 DIV); Nissle stain $\times 600$

のみ認められた。蛍光は細胞質内に均一性にみられ、ややその中央部において強いように感じられた。この所見と *in vitro* での所見の軽度の差は、前者には軽度の熱操作が加わること、また組織固有蛍光が強いことによるものと思われた。更に細胞質から神経線維に続く蛍光も認められた。(図8,9) 尚対照として、まず S-100 抗体を作用させた後、FITC 標識 S-100 抗体を作用させた頸髄、小脳細胞では特異的蛍光を認めることができなかった。(図10,11)

考 按

1965年, B. W. Moore によって脳および神経組織

にのみ特異的に存在する、きわめて酸性の蛋白質が発見され S-100 蛋白と命名された。この S-100 蛋白が免疫学的に広い種族にわたって共通性がみられることから脳および神経系の機能にかなり共通かつ重要な役割をもつものと思像されたが、その機能についてはまだいずれも推定の域にとどまっている。

一方, Hydén らは、ウサギの脳幹の側前庭核 (lateral vestibular nucleus) の神経細胞と、その周辺のグリア細胞を microscopic free hand technique で取り出し、間接蛍光抗体法による組織化学的、形態学的検査から S-100 蛋白がグリア細胞では細胞質に存在し、核内には存在しないこと、また神経細胞では核小体を除く核内に存在し、細胞質内には存在しないことを報告した。そして核内の酸性蛋白の役割りとして histone と結合して DNA の遺伝的活性を制御する可能性を述べた。しかし、この Hydén の説に対して Dravid らは全脳組織の核を集めて分析したところ、強酸性の蛋白は証明したが、この蛋

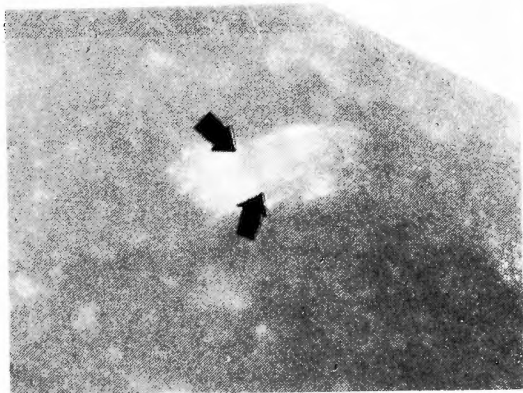


Fig. 3 (a) cultured nerve cell (14DIV) ;
The uneven fluorescent spots are
observed in the cytoplasm except
the nucleus (arrows).. FITC
labelled fluorescent antibody stain
1000

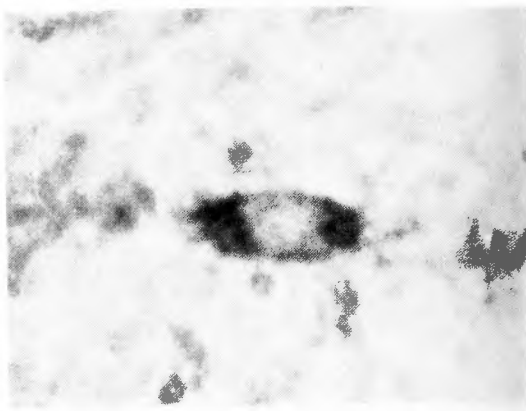
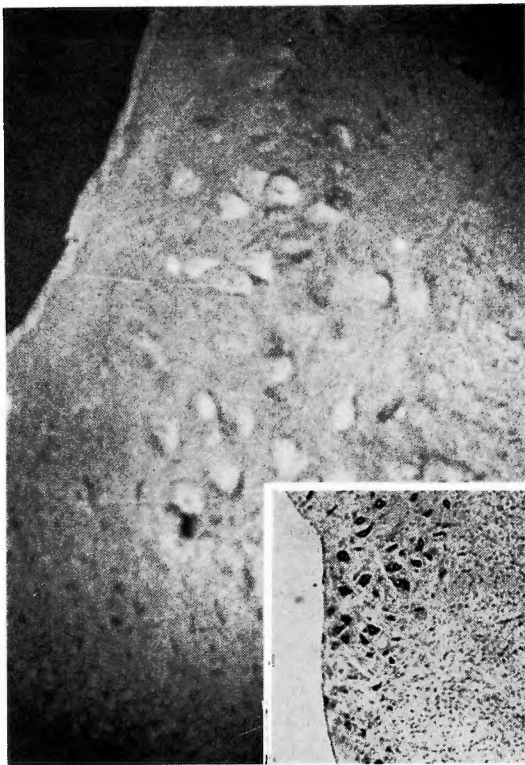


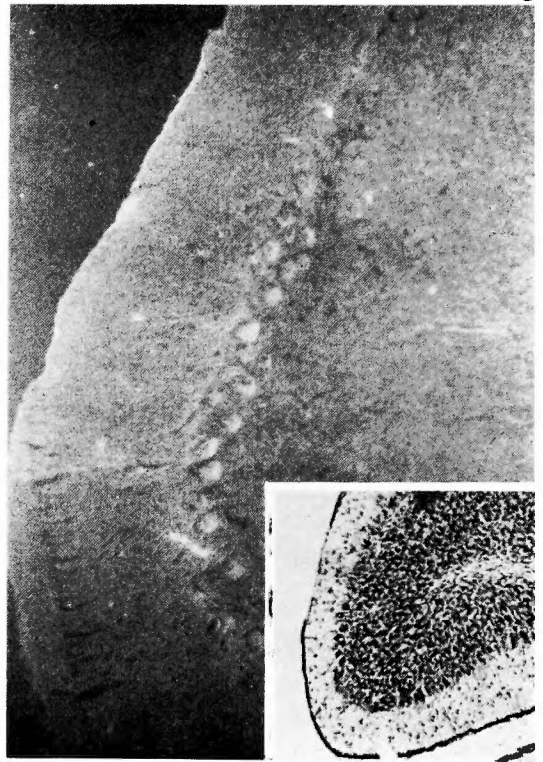
Fig. 3 (b) same as Fig. 3(a); Nissle stain
×1000



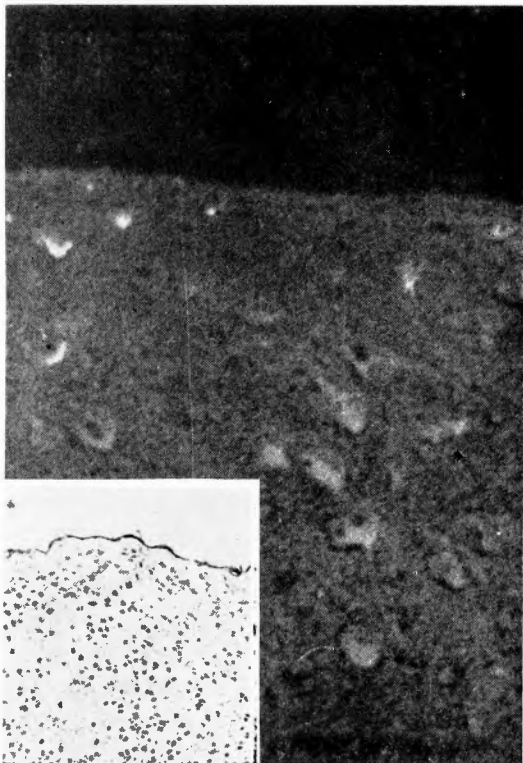
Fig. 4 cultured glial cell (7DIV) ; Note the strong and thick fluorescence
in the glial cell around the nonfluorescent nuclei (arrows).. FITC
labelled fluorescent antibody stain ×1000



⑤



⑦



⑥

Fig. 5, 6, 7 spinal anterior horn cells, cerebral nerve cells, and Purkinje cells on the first day after hatching; They all demonstrate the diffuse cytoplasmic fluorescence but the nuclei are not reacted.: FITC labelled fluorescent antibody stain $\times 1000$ (in a bracket-Nissle stain $\times 150$)

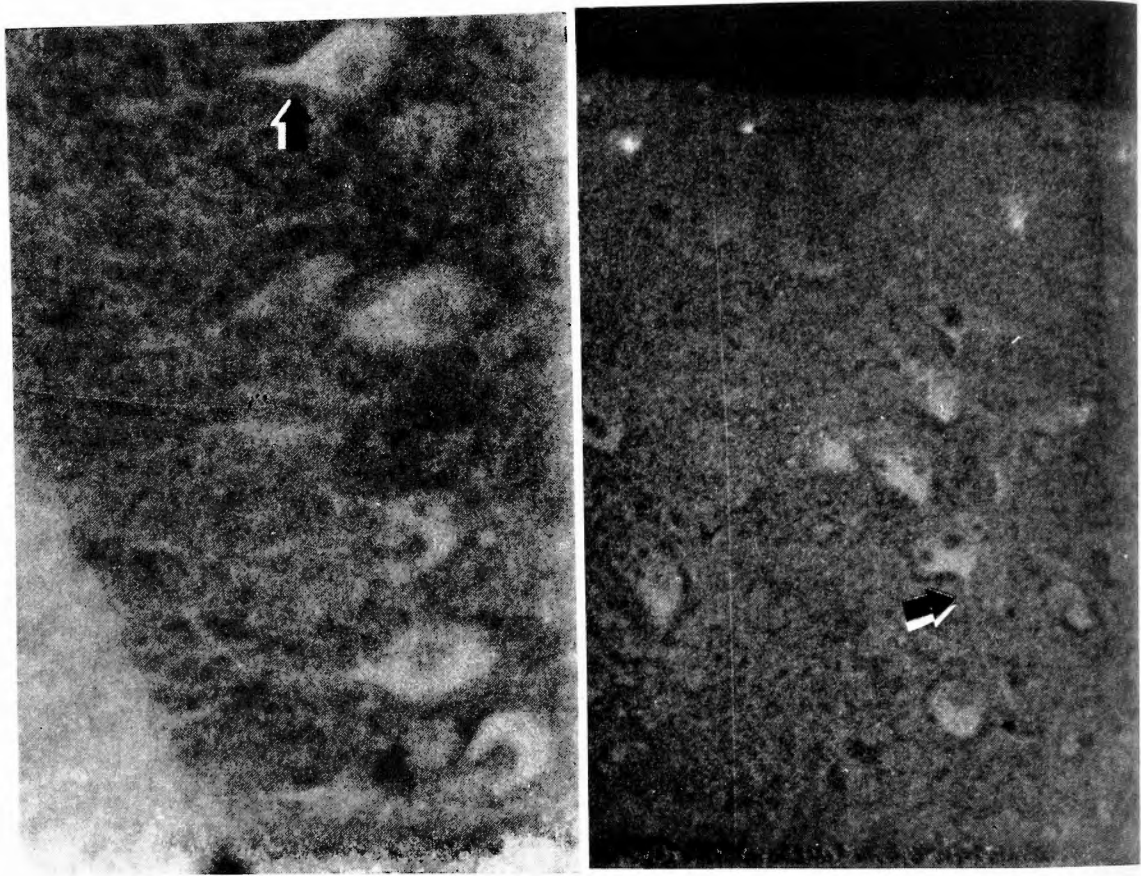


Fig. 8,9 Purkinje cells and cerebral nerve cells; From the cytoplasm the fluorescence extends to the nerve fiber (arrow).. FITC labelled fluorescent antibody stain $\times 1000$

白は S-100 抗血清とは反応しなかった⁶⁾と述べ、Moore らは家兎の網膜の ganglion cell layer や nerve fiber layer にも S-100 蛋白が存在するとい⁷⁾、また Perez らは家兎の脛骨神経内における S-100 蛋白量が Wallerian 変性による axon の変化に一致することから、末梢神経における S-100 蛋白の局在を神経線維に求めた⁸⁾ 更に De Robertis は抗 S-100 抗体が in vitro で神経終末を破壊し、また

in vivo で神経細胞の電気生理学的性質を失わせるという報告¹⁹⁾をし、いずれも神経細胞の細胞質に S-100 蛋白は存在しないとされた Hydén 説に疑問をなげかけている。

これらの矛盾は、Perez らは S-100 蛋白の分子量が小さく、酸性度がきわめて高いために (1) 細胞の dissection や固定の間に失われたり、分布が異なってくるか、(2) dissection によって神経細胞やグリア

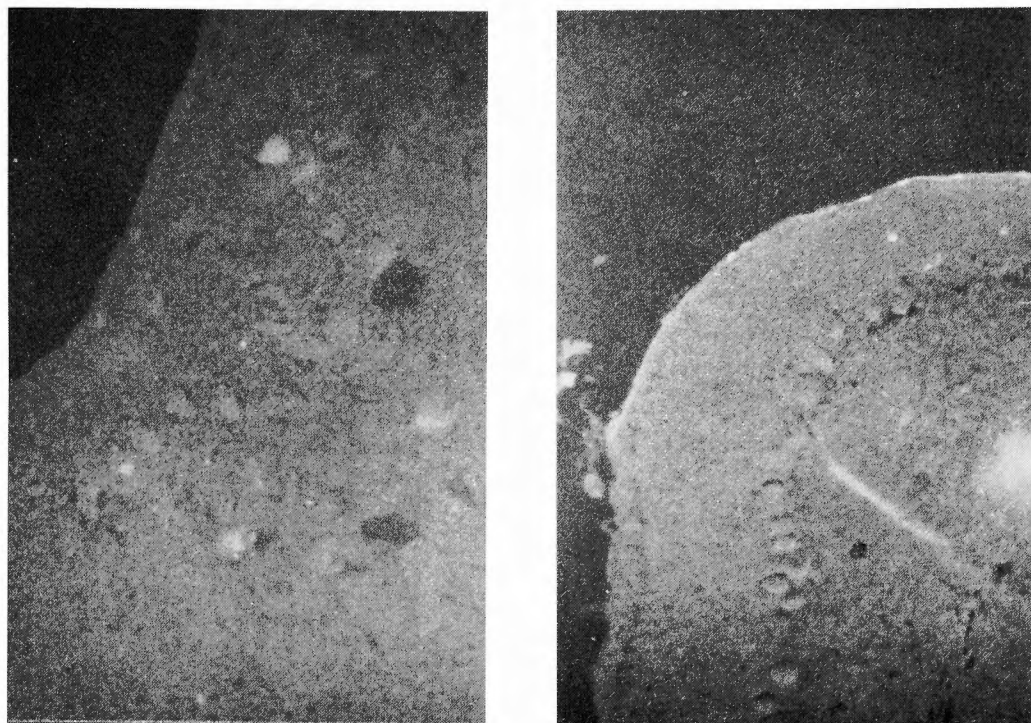


Fig. 10, 11 spinal anterior horn cells and Purkinje cells; There is no specific reaction in the nerve cells on blocking samples. cf. Fig. 5, 7.: FITC labelled fluorescent antibody stain $\times 400$

細胞の突起が失われ本来の分布と異なってくるためではないかと述べている⁸⁾。

我々はこの dissection や固定操作による欠点を補うため in vitro で培養された神経細胞を intact のまま瞬時にアルコール処理し、直接蛍光抗体法を応用した。そしてその結果、神経細胞内においてもグリア細胞と同様に細胞質内に S-100 蛋白の存在する所見を得た。

S-100 蛋白の機能については、神経系細胞の増殖の際ではなく、その細胞の機能的分化の時点で S-100 蛋白が著増するという Cicero²⁰⁾ の報告があり、この蛋白が可溶性であることから構造蛋白とは思われない²¹⁾、酵素作用も今までのところ見いだされてない。そこで神経における伝達機構における S-100 蛋白の役割について考えてみると次の 4 つの可能性が考えられる²²⁾。

- 1) 化学伝達物質として働く、
 - 2) 代謝活性の高いところから axonal flow とし
- て神経線維内を定常的に流れる axonal protein として働く、

3) 神経細胞膜の興奮性もしくは能動輸送に関連して作用する。

4) 抗原抗体反応のようにシナプスにおける高分子化学的伝達物質の確認の site として働く。

このいずれであるかは結論を述べ得ないが我々は S-100 蛋白が細胞質に存在することより 3) の可能性は証明し得たものとする。

以上の如く S-100 蛋白は神経細胞では細胞質に分布し核内には存在しない。培養神経細胞内においては核膜周辺に密度が高く、神経線維の中ではおそらく neurofibril に沿って高濃度に分布するものと思われる、グリア細胞の細胞質内に存在することも考えあわせると胎生期の neural tube より生ずる細胞に共通した蛋白であって、神経機能の基本的役割をになっている可能性が強い。

結 論

我々は、鶏胎の小脳を組織培養して得た神経細胞および鶏雛の大脳、小脳、脊髄の低パラフィン切片より得た神経細胞に FITC 標識 S-100 抗体を作用させ、

直接蛍光抗体法でS-100蛋白が神経細胞の細胞質にのみ存在して、核内には存在しないことを証明した。そして、この分布がグリア細胞における分布と一致することから、S-100蛋白がneural tubeから生ずる細胞に共通した蛋白であって、神経系細胞膜の興奮性もしくは能動輸送等と関連して、神経機能の基本的役割をになっているものと推定している。

稿を終るにあたり、神経組織培養について御指導下さった。大阪成人病センター西野幸典先生、および技術補助に貢献いただいた石井富栄氏に深謝いたします。また本研究は京都大学解剖学第1講座および放射線基礎医学教室の協力をうけたものであり、附記して謝意を表します。

研究費の一部は昭和46.47年度厚生省研究助成金によります。

文 献

- 1) Moore, B.W. and Mc Gregor, D.: Chromatographic and electrophoretic fraction of soluble proteins of brain and liver. *J. Biol. Chem.*, **240**; 1647, 1965.
- 2) Moore, B.W.: A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **19**; 739, 1965.
- 3) Lajtha, A.: *Handbook of Neurochemistry*, Plenum, N. Y., 1971, p. 93
- 4) Zuckerman, J. E., Herschman, H. R. and Levine, L.: Appearance of a brain specific antigen (the S-100 protein) during human foetal development. *J. Neurochem.*, **17**: 247, 1970.
- 5) Hydén, H. and Mc Ewen, B.: A glial protein specific for the nervous system. *Proc. N. A. S.*, **55**: 354, 1966.
- 6) Dravid, A.R. and Burdman, J. A.: Acidic proteins in rat brain nuclei: Disc electrophoresis. *J. Neurochem.*, **15**: 25, 1968.
- 7) Moore, B. W., Perez, V. J. and Gehring, M.: Assay and regional distribution of a soluble protein characteristic of the nervous system. *J. Neurochem.*, **15**: 265, 1968.
- 8) Perez, V.J. and Moore, B.W.: Wallerian-degeneration in rabbit tibial nerve: Changes in amounts of the S-100 protein. *J. Neurochem.*, **15**; 971, 1968.
- 9) Takeuchi, J.: Conditions for the establishment of dispersed cell culture of intranial tumors. *Arch. Jap. Chir.*, **40**: 123, 1971.
- 10) Bornstein, M. B.: Reconstituted rat-tail collagen used as substrate for tissue cultures on coverslips in Maximow slides and roller tubes. *Lab. Invest.*, **7**: 134, 1958.
- 11) 佐野 豊: 組織学研究法; 東京, 南山堂. 1968.
- 12) Levine, L. and Moore, B. W.: Structural relatedness of a vertebrate brain acid protein as measured immunochemically. *Neurosci. Res. Progr. Bull.*, **3**: 18, 1965.
- 13) Kekwick, P. A.: The serum proteins in multiple myelomatosis. *Biochem. J.*, **34**; 1248, 1940.
- 14) Goldstein, G., Slizes, I. S. and Chase, M. W.: Studies on fluorescent antibody staining. 1, Non-specific fluorescence with fluorescein-coupled sheep antirabbit globulin. *J. Exptl. Med.*, **114**: 89, 1961.
- 15) 浜島義博, 京極方久: 免疫組織学; 東京, 医学書院, 1968.
- 16) 安田健次郎, 豊島 滋, 秋山武久; 蛍光抗体法手技(三), *Modern Med.*, **9**: 332, 1963.
- 17) 山本豊城: 細切法による中枢神経組織の培養. *日本組織学記録*, **20**: 355, 1960.
- 18) Hydén, H.: Quantitative assay of compounds in isolated, fresh nerve cells and glial cells from control and stimulated animals. *Nature*, **154**; 433, 1959.
- 19) De Robertis, E.: Ultrastructure and cytochemistry of the synaptic region. *Science*, **156**; 907, 1967.
- 20) Cicero, T. J., Cowan, W. M. and Moore, B.W.: Changes in the concentrations of the two brain specific proteins, S-100 and 14-3-2, during the development of the avian optic tectum. *Brain Res.*, **24**; 1, 1970.
- 21) 植村慶一: 神経組織の酸性蛋白質, S-100 分画について. 蛋白質, 核酸, 酵素. **14**: 264, 1970.
- 22) 高橋健治: 脳の特異酸性蛋白. 代謝 **8**; 325, 1971.