

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06770

研究課題名(和文)脂質ラフトにおける神経極性決定シグナル伝達制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation mechanism of the signal transduction for neuronal polarity determination in lipid rafts

研究代表者

本多 敦子 (HONDA, ATSUKO)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：40467072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経極性決定のためのシグナル伝達制御機構を解明するため、我々は神経軸索先端にある成長円錐の主要な膜タンパク質M6aに着目した。発生期のマウス脳でのM6aの発現抑制は、神経極性決定や軸索伸長を遅延させた。M6aは情報伝達の場とされる脂質ラフトに分布、ラミニン基質のシグナルにより形質膜上で局在化することで、形質膜上の脂質ラフトや、M6aに相互作用する細胞内シグナル分子、及びその下流の神経極性決定因子を脂質ラフト近傍に集積させることを見出し、M6aが細胞外のラミニンのシグナルを細胞内の神経極性決定のためのシグナル伝達へと情報変換するトランスデューサーとしての役割を持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To clarify the signal transduction mechanism for neuronal polarity determination, we focused M6a, a major plasma membrane protein in growth cones. We showed that suppression of the M6a expression in mouse brain at developmental stage caused delay of neuronal polarity determination and the axonal elongation. M6a was localized in lipid raft known as a micro membrane domain for signal transductions. M6a was accumulated on plasma membrane by an extracellular matrix, laminin, and which induced clustering of lipid rafts on the cell-surface. Subsequently, intercellular signal transduction molecules associated with M6a and their downstream molecules for neuronal polarity were assembled in vicinity of the lipid rafts. Thus our data suggest that M6a acts as a signal transducer for neuronal polarity determination that responds to extracellular signals.

研究分野：神経科学

キーワード：神経極性 脂質ラフト シグナル伝達 神経成長円錐 細胞外基質 M6a ラミニン 神経軸索

1. 研究開始当初の背景

神経極性決定機構の解明は、脳の発生や、神経再生を理解する上で非常に重要な意味を持つ。申請者らはこれまでに『神経極性が、細胞外基質ラミニンのシグナルにより短時間で決定される』ことを明らかにした。生体内における神経極性形成決定は、細胞外シグナルに応じて制御されると考えられるが、形質膜上で細胞外シグナルに応答する分子機構の詳細は明らかでない。

M6a は、以前申請者らがおこなった神経成長円錐のプロテオミクス解析[Nozumi, Honda *et al.*, PNAS. USA. (2009)]で、最も主要な形質膜上のタンパク質の一つである。M6a は、シグナル伝達の場合とされる「脂質ラフト」に深く関係するパルミトイル化修飾部位を多数持つ。

申請者は既に、① M6a の発現抑制が、ラミニン基質依存的な神経細胞極性を阻害する、② M6a は、細胞内シグナル分子(Rufy3, Rap2, STEF)と複合体を形成し、その複合体形成が、既知の極性決定因子の非対称性局在に必要である、③ M6a はラミニン基質上にて既知の神経極性決定因子に先行して形質膜上に非対称性に集積、その集積にN末領域のパルミトイル化が必須である、④ M6a のパルミトイル化の欠失は、ラミニン基質依存的な神経細胞極性決定を阻害する、⑤ ラミニン基質上にて M6a 複合体タンパク質は、コレステロールに依存した脂質ラフトに共局在する、等を明らかにしてきた。

これらの結果から、M6a がパルミトイル化により脂質ラフトに局在、神経極性決定に関与したシグナル分子と相互作用し、ラミニン依存的極性決定に関与することを明らかにしてきたが、その分子機構の詳細は未だ分かっていない。

2. 研究の目的

本研究は、『M6a が形質膜上に形成するタンパク質複合体』の神経極性決定における役割

と発生期の脳における重要性を明らかにし、さらに脂質ラフトにおける M6a タンパク質複合体の局在化の分子機構とその生理的意義を解明することを目的とする。本研究により、発生脳での M6a を介した脂質ラフトシグナル伝達の重要性を示すだけでなく、神経再生研究や、M6a が関与する疾患の発病過程の解明等につながることを目指している。

3. 研究の方法

本研究の研究項目を、次の 1]-3]に示す。

- [1] M6a を介した分子間相互作用と、そのシグナル伝達による神経極性決定機構の解明
- [2] M6a タンパク質複合体が制御するシグナル伝達制御の脳発生過程における役割解明
- [3] 形質膜上における M6a 複合体の局在化の分子機構と脂質ラフトとの関係性の解明

[1] M6a を介した分子間相互作用と、そのシグナル伝達による神経極性決定機構の解明

ラミニン～M6a～細胞シグナル分子に至るまでの分子間相互作用を生化学的、形態学的に解析した。既に M6a 相互作用分子として同定している Rufy3, Rap2, STEF の全長もしくは断片配列を有したタグ付タンパク質を遺伝子導入により株細胞に共発現させて、各分子の細胞内局在の関係性を免疫染色により解析した。さらにタグの認識抗体による免疫沈降を行い、分子間の結合様式を解析した。

この他に M6a および、Rufy3 のノックアウト神経細胞と野生型の神経細胞における神経極性決定の相違や、M6a 相互作用分子、極性決定因子の局在の相違を免疫染色により解析した。

[2] M6a 複合体が制御するシグナル伝達制御の脳発生過程における役割の解明

発生過程の脳における M6a の重要性を明らかにするため、子宮内エレクトロポレーションによりマウス胎仔大脳皮質へ M6a shRNA 導入を行ない、M6a のノックダウン実験を行なった。

shRNA 導入から数日後、胎仔脳を摘出し、遺伝子導入された神経細胞を shRNA と共発現させた GFP 蛍光で確認した。固定した脳の切片において、ノックダウン神経細胞の極性決定異常の有無や、その領域の特異性等を共焦点顕微鏡下で解析した。

又、神経発生過程における M6a ノックダウンの継時的作用を解析するため、shRNA を導入した胎仔脳の生のスライス切片において、ノックダウン神経細胞である GFP 陽性神経細胞をライブイメージングにより観察した。

[3] 形質膜上における M6a 複合体の局在化の分子機構と脂質ラフトとの関係性の解明

生きた細胞の膜表面のコレステロールを可視化し、形質膜上の脂質ラフトの局在変化を調べるため、コレステロールに結合する Perfringolysin 0 毒素のドメイン 4 の GFP 融合タンパク質 (GFP-D4) をプローブとして用いた。

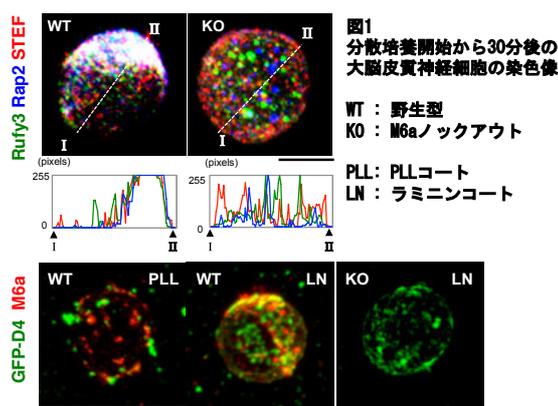
脂質ラフトの分布と M6a の局在性の関係を明らかにするため、M6a を過剰発現させた株細胞と、発現していない細胞の細胞表面における GFP-D4 の分布を比較した。又、M6a ノックアウトと野生型の神経細胞における GFP-D4 の分布を比較し、M6a 相互作用分子の局在関係免疫染色により解析した。

さらに、脂質ラフトと M6a タンパク質複合体の分布の関係性を生化学的に解析するため、脂質ラフトの生化学的定義『界面活性剤耐性膜 (DRM) 画分』における M6a タンパク質複合体の分布様式を、M6a ノックアウトと野生型のマウス胎仔脳の DRM を用いてウエスタンブロットにより解析した。

4. 研究成果

[1] タグ付タンパク質を用いた結合実験から、M6a の C 末細胞質領域に Rufy3 の RUN domain が結合し、更に Rufy3 が活性型 (GTP 結合型) Rap2 とともに結合することにより、M6a と活性型 Rap2 を介在するアダプタータンパ

ク質として作用し、M6a-Rufy3-Rap2 の 3 者複合体が形成されることが分かった。更に、活性型 Rap2 は、Rac1GEF である STEF に結合し、STEF の GEF 活性を増強、Rac1 を活性化することを見だした。免疫細胞染色の結果から、M6a、Rufy3、Rap2、STEF は、野生型では軸索成長円錐の先端、もしくは分散培養直後には非対称的に共局在するが (図 1 上)、M6a ノックアウト神経細胞ではここに散在する事が分かった。



[2] 子宮内エレクトロポレーションによる shRNA の導入により M6a の発現を急性にノックダウンしたマウス脳の神経細胞を解析したところ、ノックダウン神経細胞における軸索伸長の遅延が見られた。更に発生過程初期で解析したところ、大脳皮質の中間帯において、神経細胞の多極から単極細胞への極性変化が遅延している事が明らかになった (図 2)。免疫組織染色の結果、M6a は発生過程の大脳皮質において中間帯に多く発現しており、M6a の発現が大脳皮質中間帯における極性決定過程に重要な役割を持つ事が示唆された。

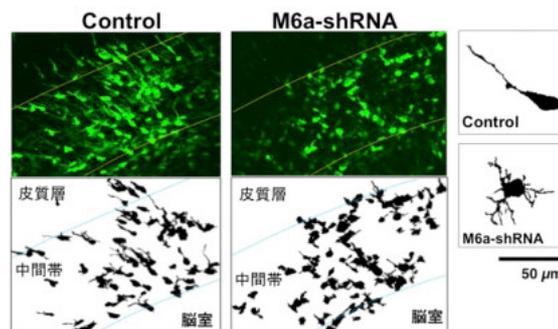


図2) 発生過程のマウス胎仔大脳皮質における GFP発現遺伝子導入神経細胞。コントロール細胞 (control) と M6aノックダウン細胞 (M6a-shRNA)。コントロール細胞では、中間帯から皮質層に遊走する際、多極性から、単・双極性の形態 (像: 右上) に変化するが、ノックダウン細胞では、多極性の形態 (像: 右下) をするものが多く、皮質層への遊走、および中間帯での軸索形成が遅延する。

[3] イムノブロットによる生化学的解析から M6a は界面活性剤耐性膜 (DRM) 画分に分布、コレステロール阻害薬や M6a のパルミトイル修飾部位の変異によりその分布が阻害されることから、M6a パルミトイル修飾とコレステロールの相互作用により、M6a が脂質ラフトに局在することが分かった。又、M6a の下流シグナル分子 Rufy3, Rap2, STEF も DRM 画分に分布した。同 DRM 画分には、ラミニン受容体である Integrin $\beta 1$ の分布も確認された。一方、M6a ノックアウトマウスの脳において、それらの分子は非 DRM 画分に分布していた。

次に GFP-D4 プローブにより、形質膜上での M6a と脂質ラフト分布の関係を調べたところ、株細胞において、野生型 M6a の過剰発現は、自身が局在化する filopodia に脂質ラフトを集積させるが、パルミトイル修飾部位変異型 M6a では filopodia での脂質ラフトの集積が起きないことから、パルミトイル修飾による M6a の脂質ラフトへの局在が細胞表面の脂質ラフト集積を誘導することが分かった。

細胞外基質ラミニン上で培養したマウス大脳皮質神経細胞において、GFP-D4 は、M6a や下流分子 Rufy3, Rap2, STEF が局在化する領域に集積・共局在していたが、M6a ノックアウト神経細胞において GFP-D4 は、M6a 下流分子同様に散在していた (図 1 下)。

したがって、M6a 下流分子だけでなく脂質ラフトもまた M6a を介して形質膜上に集積することが、M6a ノックアウト神経細胞との比較実験から明らかになった。

我々は既に、細胞外基質ラミニンのシグナルが、神経細胞における M6a の局在化を引き起こし、これにより神経極性決定の時間過程を加速する事を M6a ノックアウト神経細胞との比較実験から見出していることから、M6a による脂質ラフトと M6a 下流の神経極性関連シグナル伝達分子の集積が、脂質ラフト

における神経極性決定シグナルを増強する事が示唆された。

[1]-[3]の結果より、M6a は細胞外のラミニンのシグナルを受け、自身が局在化することにより、形質膜上の脂質ラフトと細胞内シグナル伝達分子を集積し、細胞内の神経極性決定のためのシグナル伝達へと情報変換するトランスデューサーとしての役割を持つことを明らかにした (図 3)。

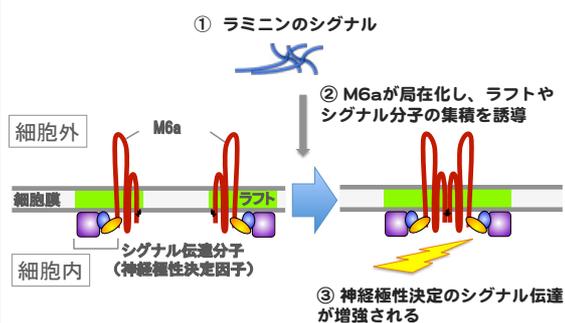


図3 M6aは細胞外のラミニンのシグナルを脂質ラフトと細胞内シグナル伝達分子の集積に変換する

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Ito Y*, Honda A*, Igarashi M. (* equal contribution) Glycoprotein M6a as a signaling transducer in neuronal lipid rafts. *Neurosci Res.* Vol.128, p19-24 (2018)
- ② Honda A, Usui H, Sakimura K, Igarashi M. Rufy3 is an adapter protein for small GTPases that activates a Rac guanine nucleotide exchange factor to control neuronal polarity. *J. Biol. Chem.* Vol. 292, p 20936-20946 (2017)
- ③ Honda A, Ito Y, Takahashi-Niki K, Matsushita N, Nozumi M, Tabata H, Takeuchi K, Igarashi M. Extracellular Signals Induce Glycoprotein M6a

Clustering of Lipid Rafts and Associated Signaling Molecules
J. Neurosci. Vol. 37, p 4046-4064
(2017)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 五十嵐 道弘、本多 敦子、伊藤 泰行、野住 素広 Glycoprotein M6a and its associated signaling proteins are clustered in the lipid-rafts for determination of neuronal polarity
第40回日本神経科学大会 (2017)
- ② 本多 敦子、伊藤 泰行、五十嵐 道弘 M6a regulates the signals for neuronal polarity determination on lipid raft.
第40回 日本分子生物学会年会 (2017)
- ③ 本多 敦子、伊藤 泰行、五十嵐 道弘 脂質ラフトにおけるM6aタンパク室による神経極性決定シグナルの制御
第39回 日本分子生物学会年会 (2016)
- ④ 伊藤泰行、本多敦子、松下夏樹、田畑秀典、武内恒成、五十嵐道弘 神経極性形成における4回膜貫通タンパク質Glycoprotein M6aのin vivo機能解析
第39回 日本分子生物学会年会 (2016)
- ⑤ ATSUKO HONDA, YASUYUKI ITO, MICHIHIRO IGARASHI Glycoprotein M6a is an Extracellular Signal-Responding Transducer Facilitating Neuronal Polarity Determination
American Society for Cell Biology Annual Meeting (2015)
- ⑥ ATSUKO HONDA, YASUYUKI ITO, MICHIHIRO IGARASHI Glycoprotein M6a regulates laminin-inducing rapid determination of polarity in cortical neuron
American Society For Neuroscience 45th Annual Meeting (2015)
- ⑦ YASUYUKI ITO, ATSUKO HONDA, KOSEI TAKEUCHI, NATSUKI MATSUSHITA, MICHIHIRO IGARASHI Knockdown of

glycoprotein M6a in utero delayed the determination of neuronal polarity
第 58 回 日本神経化学会大会 (2015)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 敦子 (HONDA, Atsuko)
新潟大学大学院・医歯学総合研究科・
特任助教
研究者番号：40467072

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし ()