

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07118

研究課題名（和文）軸索遠位部に特異的な膜直下細胞骨格の形成機構の解明

研究課題名（英文）Molecular Mechanisms for the formation of periodic cytoskeletal structures in axons

研究代表者

吉村 武 (YOSHIMURA, Takeshi)

大阪大学・連合小児発達学研究所・講師

研究者番号：60402567

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題は、蛋白質リン酸化酵素Cdk5と細胞骨格分子 β -spectrinに着目して、軸索に特異的な細胞骨格構造を形成する分子機構を解き明かすことを目的とした。Cdk5は β -spectrinをリン酸化することを見出し、そのリン酸化部位を同定した。Cdk5によりリン酸化された β -spectrinを特異的に認識する抗体を作製した。この抗体およびCdk5阻害剤を用いた実験から、神経細胞においてCdk5は β -spectrinのリン酸化を介して軸索特異的な細胞骨格構造の形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、神経細胞においてCdk5は β -spectrinのリン酸化を介して軸索特異的な細胞骨格構造の形成に重要な役割を果たすことが明らかとなった。本研究により軸索に特異的な細胞骨格の形成機構が分かることで、情報出力を担う軸索の基盤の理解が深まると考えられる。ウエスト症候群は既知の小児難治てんかんのなかでは最も多い、精神運動発達の退行を伴う指定難病である。この疾患に関わる β -spectrinの制御機構の解明はその病因解明の糸口になると期待される。

研究成果の概要（英文）：Axons have a specific cytoskeletal structure lining the cytoplasmic face of the axolemma. Super-resolution microscopy has revealed a remarkable periodic lattice in axons. β -spectrin is the only spectrin detected in the nervous system, and forms the periodic lattice in axons. While β -spectrin intracellular localization is fairly well understood, the molecular mechanism by which β -spectrin was regulated remains unclear. In this study, we report that Cdk5 phosphorylates β -spectrin. We identified the phosphorylation site of β -spectrin by Cdk5, and made anti-phospho-specific β -spectrin antibody. The phosphorylated β -spectrin was localized in the axon initial segment. Inhibition of Cdk5 impaired axon initial segment formation and neuronal polarity. These results suggest that Cdk5 regulates the axonal periodic cytoskeleton through the phosphorylation of β -spectrin.

研究分野：分子神経科学

キーワード：神経細胞 軸索 細胞骨格 Spectrin リン酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞骨格は細胞の構造を内部から補強する役割だけでなく、細胞の形態形成、分裂、運動、極性、小胞輸送など様々な細胞内の機能を果たす。最近、軸索の膜直下全域には規則的に並んだはしごのような格子状細胞骨格が構築されていると報告された (Xu et al., Science, 2013)。この構造は樹状突起には存在せず、軸索に特異的な構造である。この spectrin とアクチンリングで構成された骨格構造は、蛇腹ホースのように柔軟性と強度を持たせるために長い突起である軸索に必要と考えられる。研究開始当初、軸索の膜直下の格子状細胞骨格において、軸索遠位部では II-spectrin と II-spectrin および ankyrin-B によって構成されており、軸索起始部では IV-spectrin および ankyrin-G によって構築されることが知られており、軸索起始部において IV-spectrin の結合パートナーである spectrin のサブユニットは見つかっていなかった。2017年に軸索起始部において II-spectrin が IV-spectrin と結合して特異的な細胞骨格を構築していると報告された (Huang et al., J Neurosci., 2017)。つまり、II-spectrin は軸索において遠位部および軸索起始部に共通した格子状細胞骨格構造の構成分子である。

神経細胞の発達期において、最初に軸索先端から軸索起始部手前までの軸索遠位部構造が形成され、残された領域に軸索起始部の細胞骨格が形成される (Yoshimura and Rasband, Curr Opin Neurobiol., 2014)。軸索遠位部構造が崩壊すると軸索起始部構造も破綻することから、軸索遠位部構造は軸索起始部構造の形成および維持に必須である (Galiano et al., Cell, 2012)。しかしながら、軸索膜直下細胞骨格の起点である軸索遠位部構造がどのように形成されるのか、その分子機構は殆ど理解されていなかった。

細胞骨格の制御には多くのリン酸化シグナルが関与していることが知られている。近年、蛋白質リン酸化酵素 Cdk5 がショウジョウバエ脳のキノコ体の軸索起始部様区画の形成に重要な役割を果たしていることが報告された (Trunova et al., J Neurosci., 2011)。軸索形成期において、Cdk5 は軸索先端で活性化されている (Nikolic et al., Genes Dev., 1996)。故に、Cdk5 は軸索遠位部構造の形成を介して軸索起始部構造の形成に関わっていると考えられる。そして、研究代表者は Cdk5 のコンセンサス配列を有する II-spectrin に着目した。

2. 研究の目的

本研究課題は、“Cdk5 が II-spectrin をリン酸化する”ことを足がかりにして、軸索に特異的な細胞骨格構造を形成する分子機構を解き明かすことを目的とした。II-spectrin の Cdk5 によるリン酸化部位を同定し、Cdk5 によりリン酸化された II-spectrin を特異的に認識する抗体 (抗リン酸化 II-spectrin 抗体) を作製することで神経細胞における II-spectrin のリン酸化レベルを調べた。また、Cdk5 のリン酸化酵素活性が軸索特異的な細胞骨格構造の形成に必須であるか検討した。

3. 研究の方法

(1) Cdk5 による II-spectrin のリン酸化を検討するための in vitro キナーゼアッセイ

GST タグを付けた II-spectrin 変異体 (GST-II-spectrin) を COS7 細胞に発現させた後、Pu11-down アッセイによって GST-II-spectrin を単離した。GST-II-spectrin に精製された Cdk5 および RI 標識 [^{32}P]ATP を加えて反応させた。試料を SDS-PAGE で分離後、オートラジオグラフィーを用いて放射能標識されたバンドを検出した。また、銀染色により基質蛋白質を検出した。

(2) Cdk5 によってリン酸化された II-spectrin を特異的に認識する抗体 (抗リン酸化 II-spectrin 抗体) の作製

リン酸化合成ペプチドを用いてリン酸化された II-spectrin を特異的に認識するラットモノクローナル抗体を作製した。ELISA 法を用いて 1 次スクリーニングを行った。

(3) 抗リン酸化 II-spectrin 抗体の評価

COS7 細胞に GST-II-spectrin および Cdk5 を発現させた後に細胞ライゼートを可溶化した。サンプルを SDS-PAGE で分離後、ウエスタンブロット法を用いて抗リン酸化 II-spectrin 抗体を評価した。また、COS7 細胞に GST-II-spectrin および Cdk5 を発現させた後に細胞を固定し、免疫染色法を用いて抗リン酸化 II-spectrin 抗体を評価した。

(4) 培養海馬神経細胞において Cdk5 によってリン酸化される II-spectrin の局在の検討

胎生 18 日目のラット胎仔脳から初代培養海馬神経細胞を得た。培養 11 日目の培養海馬神経細胞をパラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定した。抗リン酸化 II-spectrin 抗体を用い

て固定した神経細胞を免疫染色した後に、顕微鏡を用いて神経細胞を観察した。

(5) Cdk5 のリン酸化酵素活性の抑制が軸索特異的な細胞骨格構造の形成へ与える影響の観察

ラット培養海馬神経細胞において軸索に特異的な格子状細胞骨格構造は培養 7 日目までに形成される (Galiano et al., Cell, 2012)。軸索特異的な細胞骨格構造が形成される前の培養海馬神経細胞に Cdk5 阻害剤を処理し、培養 7 日目において軸索特異的な細胞骨格構造の形成が阻害されているか観察した。また、既に軸索特異的な細胞骨格構造が形成されている培養 7 日目の培養海馬神経細胞に Cdk5 阻害剤を処理し、軸索特異的な細胞骨格構造が崩壊するか観察した。

4. 研究成果

(1) Cdk5 による II-spectrin のリン酸化部位の同定

Cdk5 が Ankyrin-G をリン酸化するか調べるために、GST-Ankyrin-G 切断変異体と Cdk5 を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行った。複数の Ankyrin-G 切断変異体のリン酸化が検出されたことから、Cdk5 により Ankyrin-G は数カ所リン酸化されると考えられる。特に、Ankyrin-G の IV-spectrin との結合領域が強くリン酸化されていることから、Cdk5 による Ankyrin-G のリン酸化が IV-spectrin との結合に影響を与えると考えられる。この領域にあるリン酸化予想部位をアラニンに置換した Ankyrin-G 変異体を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行った。このアラニンに置換した Ankyrin-G 変異体においてリン酸化レベルが顕著に低下した。故に、Cdk5 によりリン酸化される Ankyrin-G の主なリン酸化部位を同定した。

(2) Cdk5 によってリン酸化された II-spectrin を特異的に認識する抗体

リン酸化された II-spectrin を特異的に認識する抗体 (抗リン酸化 II-spectrin 抗体) を作製した。ELISA 法を用いて 1 次スクリーニングを行った結果、80 を超える抗体候補を得た。この抗体を評価するためにリン酸化 II-spectrin と非リン酸化 II-spectrin を発現する培養細胞を可溶化した。ウエスタンブロット法により、リン酸化 II-spectrin を強く認識する抗体を選別した。また、リン酸化 II-spectrin と非リン酸化 II-spectrin を発現する培養細胞を免疫染色して、リン酸化 II-spectrin を強く認識する抗体を選別した。その結果、ウエスタンブロット法および免疫染色法に使用可能な非常に良い抗リン酸化 II-spectrin 抗体を得た。

(3) 神経細胞における Cdk5 によってリン酸化された II-spectrin の局在

上述の抗リン酸化 II-spectrin 抗体を用いて培養海馬神経細胞の免疫染色を行った。軸索起始部において強い染色が観察された。この染色は Cdk 阻害剤を神経細胞に処理することで消失した。故に、軸索起始部に特異的な細胞骨格において II-spectrin のリン酸化が重要な役割を果たすのではないかと考えられる。

(4) Cdk5 のリン酸化酵素活性の抑制が軸索特異的な細胞骨格構造の形成へ与える影響

Cdk 阻害剤を処理した神経細胞において軸索起始部の細胞骨格の破綻および軸索には輸送されない蛋白質の軸索への流入が観察された。軸索起始部に特異的な細胞骨格構造が門番としての機能を果たせなくなったと考えられる。

以上の結果から、神経細胞において Cdk5 は II-spectrin のリン酸化を介して軸索特異的な細胞骨格構造の形成に重要な役割を果たすことが明らかとなった。研究代表者はこれらの結果を学会で発表した。現在、本研究内容を論文として投稿準備中である。また、本研究に関する総説を発表した (Iijima and Yoshimura, Front Mol Neurosci., 2019; 吉村と片山, 生産と技術, 2019; 吉村, 生化学, In press)。

< 引用文献 >

Galiano MR, Jha S, Ho TS, Zhang C, Ogawa Y, Chang KJ, Stankewich MC, Mohler PJ, Rasband MN. A distal axonal cytoskeleton forms an intra-axonal boundary that controls axon initial segment assembly. Cell, 149, 1125-1139, 2012.

Huang CY, Zhang C, Ho TS, Osés-Prieto J, Burlingame AL, Lalonde J, Noebels JL, Leterrier C, Rasband MN. II Spectrin Forms a Periodic Cytoskeleton at the Axon Initial Segment and Is Required for Nervous System Function. J Neurosci, 37, 11311-11322, 2017.

Iijima T, Yoshimura T. A Perspective on the Role of Dynamic Alternative RNA Splicing in the Development, Specification, and Function of Axon Initial Segment. Front Mol Neurosci., 12, 295, 2019.

Nikolic M, Dudek H, Kwon YT, Ramos YF, Tsai LH. The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev*, 10, 816-825, 1996.

Trunova S, Baek B, Giniger E. Cdk5 regulates the size of an axon initial segment-like compartment in mushroom body neurons of the *Drosophila* central brain. *J Neurosci*, 31, 10451-10462, 2011.

Xu K, Zhong G, Zhuang X. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science*, 339, 452-456, 2013.

Yoshimura T, Rasband MN. Axon initial segments: diverse and dynamic neuronal compartments. *Curr Opin Neurobiol*, 27, 96-102, 2014.

吉村 武, 片山 泰一. 神経細胞の軸索の根元にある構造の機能と破綻. *生産と技術*, 71(2), 84-87, 2019.

吉村 武. 神経細胞の軸索起始部に特有な細胞骨格構造とその破綻. *生化学*, In press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iijima Takatoshi, Yoshimura Takeshi	4. 巻 12
2. 論文標題 A perspective on the role of dynamic alternative RNA splicing in the development, specification, and function of axon initial segment.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2019.00295	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 吉村 武, 片山 泰一	4. 巻 71
2. 論文標題 神経細胞の軸索の根元にある構造の機能と破綻	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生産と技術	6. 最初と最後の頁 84-87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 吉村 武	4. 巻 In press
2. 論文標題 神経細胞の軸索起始部に特有な細胞骨格構造とその破綻	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 吉村 武, ラズバンド マシュー, 片山 泰一
2. 発表標題 Cdk5は 11-spectrinのリン酸化を介して軸索に特異的な細胞骨格構造を制御する
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会（Web開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村 武, Rasband Matthew, 片山 泰一
2. 発表標題 Cdk5は 11-spectrinのリン酸化を介して軸索の周期的細胞骨格構造を制御する
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会 (Web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Yoshimura, Matthew N. Rasband, Taiichi Katayama
2. 発表標題 Cdk5 regulates phosphorylation of ankyrin-G and axon initial segment formation.
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回 日本神経科学大会・第62回 日本神経化学学会大会) (新潟県新潟市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Yoshimura, Matthew Rasband, Taiichi Katayama
2. 発表標題 Phosphorylation of cytoskeletal proteins in axon initial segments
3. 学会等名 the 2019 ISN-ASN Meeting (国際神経化学学会大会) (Montreal, Canada) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村 武, Matthew N Rasband, 片山 泰一
2. 発表標題 精神・神経疾患を惹起する軸索起始部の構造破綻の分子機構
3. 学会等名 第46回日本脳科学学会 (滋賀県大津市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村 武, Matthew N Rasband, 片山 泰一
2. 発表標題 精神・神経疾患に関わる軸索起始部の構造形成の分子機構
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会（山口県宇部市）（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉村 武, Matthew Rasband, 片山 泰一
2. 発表標題 Cdk5はAnkyrin Gのリン酸化を介して軸索起始部の形成を制御する
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村武
2. 発表標題 精神・神経疾患に関わる神経軸索の膜裏打ち構造の形成機構の解明
3. 学会等名 第4回 包括的神経グリア研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Yoshimura, Sharon R. Stevens, Cristophe Leterrier, Michael C. Stankewich, Genki Amano, Sarina Han, Sho Shikada, Hironori Takamura, Ko Miyoshi, Matthew N. Rasband, Taiichi Katayama
2. 発表標題 Axon initial segment cytoskeleton shows a more complicated pattern during brain development.
3. 学会等名 第60回 日本神経化学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉村武, 片山泰一
2. 発表標題 神経軸索に特異的な膜直下細胞骨格の形成機構
3. 学会等名 第18回 ORIGIN 神経科学研究会 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeshi Yoshimura, Sharon R. Stevens, Cristophe Leterrier, Michael C. Stankewich, Genki Amano, Sarina Han, Sho Shikada, Hironori Takamura, Ko Miyoshi, Matthew N. Rasband, Taiichi Katayama
2. 発表標題 Axon initial segment cytoskeleton shows a more complicated pattern during brain development.
3. 学会等名 ISN-ESN 2007 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉村武
2. 発表標題 軸索基始部とランピエ絞輪の細胞骨格は脳発達に伴い複雑になる
3. 学会等名 平成29年度研究会「神経科学の新しい解析法とその応用」「グリア細胞機能から迫る脳機能解明」
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ http://www.ugscd.osaka-u.ac.jp/mbs/index.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	天野 睦紀 (AMANO Mutsuki) (90304170)	名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ペイラー医科大学			