

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06480

研究課題名(和文) 神経軸索形成・再生における脂質ラフトを介したシグナル伝達制御の役割

研究課題名(英文) Roles of the signal transduction via lipid rafts in axon formation and regeneration

研究代表者

本多 敦子 (HONDA, ATSUKO)

新潟大学・医歯学系・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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経軸索形成シグナル制御機構の解明のため、成長円錐膜タンパク質M6aによる「脂質ラフトを介したシグナル伝達」の活性化メカニズムを解析した。質量分析により、形質膜上でM6aと相互作用する分子群や、M6aにより成長円錐の脂質ラフトに局在化する分子群を解析した結果、M6aは形質膜上でインテグリンなどの接着分子や受容体、小胞体などと相互作用し、シグナル下流の極性決定因子やキナーゼ、Gタンパク質、さらに脂質ラフトに関わる脂質合成酵素などを脂質ラフトに集めることが分かった。この結果から、M6aにより成長円錐脂質ラフトにおける細胞内外の情報変換や脂質ラフトに関わる脂質合成が増強される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経軸索形成機構の解明は、発生期の脳形成過程や、成体の神経損傷後の再生過程を理解する上で不可欠である。本研究成果は、成長過程の軸索先端部分である成長円錐において軸索形成を制御する分子群が、どのように「脂質ラフト」とよばれる膜の微小領域(マイクロドメイン)で会合して活性化されるのか、その実体を示すものであり、脂質ラフトの生理的意義を実証するとともに、M6a発現の関与する精神疾患や脳症などの病態解明とその治療法、神経損傷後の軸索再生治療への応用など、臨床医学への発展が強く期待される。

研究成果の概要(英文)：To clarify regulatory mechanisms of the signals for axon formation, we examined the activation system of the signal transduction through the lipid rafts by a membrane protein, M6a in the neuronal growth cones (GC). We analyzed the molecules interacting with M6a on plasma membrane, or the proteins localized in GC lipid rafts via M6a, using proteomic analysis. Our proteomic data showed that M6a interacts with adhesion molecules, e.g. Integrin, the receptors and endoplasmic reticulum on plasma membrane, and recruits some determinants of the neuronal polarity, some kinases, G-proteins and some lipid synthases to lipid rafts. These data indicated that the extra-intra cellular signal transductions and the lipid synthesis in the lipid rafts were intensified by M6a in the GC.

研究分野：神経科学

キーワード：脂質ラフト 神経軸索伸長 成長円錐 神経発生 神経軸索再生 M6a シグナル伝達 神経極性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成長円錐とよばれる、発生期の神経軸索突起の先端にある構造体には、多様なシグナル分子が局在し、軸索形成や再生のシグナル伝達を制御している。これら分子の多くが「脂質ラフト」とよばれる膜ミクロドメインで活性化されると考えられているが、その実体は不明である。

申請者らは、成長円錐の最も主要な膜タンパク質の一つである M6a に着目し、M6a が形質膜のコレステロールやシグナル分子を集積し、その協同的相互作用から「脂質ラフトを介したシグナル伝達」を活性化することを見出し、神経極性決定における意義を証明していた。

申請者は、軸索形成・再生の両過程の成長円錐での M6a の局在化を見出し、M6a による「脂質ラフトを介したシグナル伝達」の活性化が、軸索形成や再生のシグナル伝達を制御すると仮説をたてた。

2. 研究の目的

成長円錐のシグナル分子群は、どのように「脂質ラフト」において活性化し、軸索形成・再生のシグナル伝達を制御しているのか？

申請者は自身が見出した、M6a による「脂質ラフトを介したシグナル伝達」の活性化が、大きく寄与するのではないかと仮説を立て、これを検証するため、本研究において軸索形成・再生過程の神経細胞で、M6a により集積される脂質ラフトのシグナル分子群を網羅的に同定し、その分子間相互作用と、軸索形成・再生における意義を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では軸索形成・再生過程の神経細胞で、M6a により集積される脂質ラフトのシグナル分子群を網羅的に同定し、その分子間相互作用と、軸索形成・再生における意義を解明するため、以下の実験を実施した。本研究の研究項目を、次の(1)、(2)に示す。

- (1) 軸索形成過程の成長円錐において M6a の近傍に集積するシグナル分子群の同定。
- (2) M6a と、EMARS 法による同定分子群との脂質ラフトにおける相互作用と、軸索形成・再生における機能の解析。

(1) 軸索形成過程の成長円錐において M6a の近傍に集積するシグナル分子群の同定。

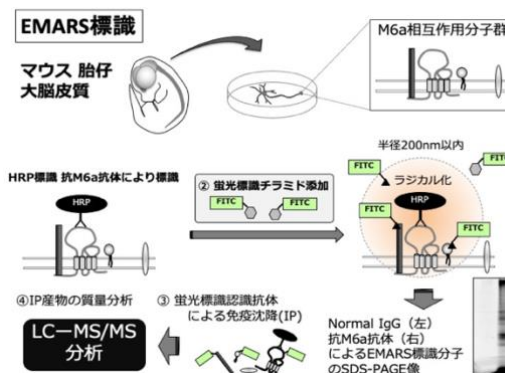
① EMARS(生細胞表面分子群の標識)法を用いて、**図1 EMARS(生細胞表面分子群の標識)法**

軸索形成の生きた神経細胞における M6a 近傍(200nm 以内)の分子群を網羅的に標識した。マウス胎仔大脳皮質の、組織片もしくは神経細胞を使用し、培養下にて HRP 標識 M6a 抗体による EMARS 標識を行なった。

② EMARS 法による標識分子群の同定。EMARS 法により FITC 標識した分子群を、可溶化した後、抗 FITC 抗体による免疫沈降により精製・濃縮。トリプシン消化後、ペプチド断片を LC-MS/MS 質量分析により同定した(図 1)。

③ M6a により脂質ラフトに局在化する分子群の同定。

野生型及び、M6aKO マウス胎仔脳の前角細胞における脂質ラフト画分のプロテオーム解析から、M6a 欠失により脂質ラフトから排除される分子群を同定した。



(2) M6a と、EMARS 法による同定分子群との脂質ラフトにおける相互作用と、軸索形成・再生における機能の解析。

① EMARS 同定分子の蛍光融合タンパク質を作製し、軸索形成・再生過程の神経細胞(正常 vs M6a 欠損)に発現させ、成長円錐での分子動態を、共焦点・超解像顕微鏡により解析。脂質ラフトは、コレステロールやスフィンゴミエリンに特異的に結合する毒素の部分配列を持つ蛍光プローブにより可視化した。

② EMARS 同定分子の発現や機能の抑制(siRNA や変異体の発現)により、分子間相互作用を阻害した際の、細胞形態や他の分子動態への影響などを解析、その関係性から分子間相互作用の生理機能を明らかにした。

4. 研究成果

(1) ①② HRP 標識した、M6a 細胞外領域認識抗体と、ノーマル Rat IgG (コントロール)を用いて、生きた神経細胞の EMARS 標識を行い、免疫沈降により回収した標識分子群をプロテオーム解析したところ、502 個のタンパク質群が M6a 抗体により EMARS 標識分子として同定され、そのうち 287 分子がノーマル IgG と重複したため、M6a 抗体特異的 EMARS 精製産物として残りの 215 分子に着目した。

この 215 分子には、以前に申請者が M6a と複合体を形成することにより、ラミニンによる神経極性決定を制御することを報告した Rufy3, Rap2 タンパク質、さらにその下流の極性決定因子である CRMP1、ラミニンシグナルの受容体である β 1 インテグリンも含まれていた。

このことは、EMARS 法を用いた本解析法によって、我々がこれまでに報告した M6a による神経極性決定制御機構が検証可能であることを示していた。

215 分子の内訳として、細胞表面タンパク質の主要なものに、 β 1 インテグリンやカドヘリンなどの接着分子や、G タンパク質共役型受容体やチャネルがあり、細胞内では Ras/Ras 関連タンパク質、セリン・スレオニンキナーゼ、チロシンキナーゼが検出された。また興味深いことに、小胞体膜と形質膜の結合に関わるジャンクトフィリンや、小胞体膜に分布するコレステロールや極長鎖脂肪酸などの脂質合成酵素が同定された。

③ 野生型及び、M6aKO マウス胎仔脳の成長円錐における脂質ラフト画分[界面活性剤耐性膜(DRM)画分]のプロテオミクスの結果、野生型マウス胎仔脳の DRM 画分として 1042 個のタンパク質を同定し、そのうち 776 個が M6aKO マウス胎仔脳の DRM 画分でも検出された。

そこで、M6a 欠失により脂質ラフト画分から排除された 266 分子に注目したところ、細胞表面の主要なタンパク質ではテトラスパニンが同定され、細胞内では申請者が以前報告した Rufy3 や CRMP1 などの極性決定因子に加えて、キナーゼや G タンパク質、小胞体上のコレステロールや極長鎖脂肪酸などの脂質合成酵素が同定された。

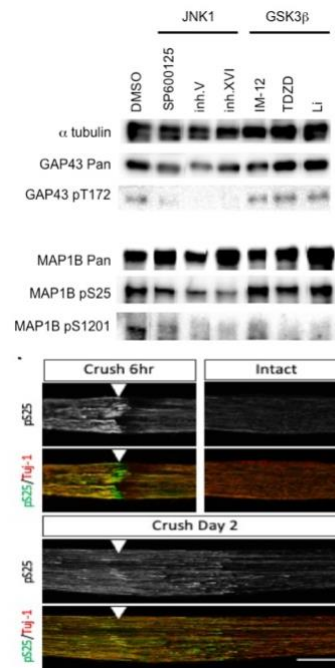


図 2) 再生過程における MAP1B のリン酸

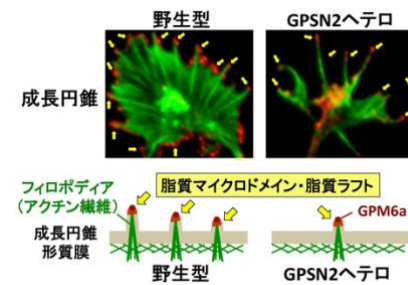


図 3) 成長円錐での極長鎖脂肪酸合成酵素による、脂質ラフトの制御

これらの結果より、軸索形成過程の神経細胞において、M6a は細胞表面で接着分子や G タンパク質共役受容体、テトラスパニンなどと、細胞内では極性決定因子や、キナーゼ、G タンパク質、小胞体上の脂質合成酵素と相互作用しており、M6a を介してテトラスパニンや極性決定因子、キナーゼや G タンパク質、脂質ラフトに関連する脂質合成酵素が脂質ラフトに集積することが明らかになった。

このことから、脂質ラフトタンパク質である M6a は接着分子や受容体と相互作用することで、その下流にあるキナーゼや G タンパク質を集積させてシグナルのトランスデューサーとしてシグナル伝達を活性化させるだけでなく、テトラスパニンや脂質合成酵素を動員することで脂質ラフトを介したシグナルネットワークを増幅することが示唆された。

(2) M6a によって脂質ラフトに動員・増幅されるキナーゼの活性が、神経軸索形成・再生過程にどのように作用するのか？

申請者らはプロテオミクスにより、軸索形成過程の成長円錐 MAP1B のチロシンキナーゼによるリン酸化や、軸索再生過程におけるセリン・スレオニンキナーゼのリン酸化が関与することを示した。

さらに本研究において、M6a により成長円錐脂質ラフトに集積する極長鎖脂肪酸酵素が、成長円錐の脂質ラフトにおける M6a 分布様式にどのように作用するのか調べたところ、極長鎖脂肪酸酵素 GPSN2 のヘテロマウス神経成長円錐では、M6a の局在する脂質ラフトドメインが減少することが分かった(図 3)

以上の結果から、神経軸索形成・再生過程において、脂質ラフトタンパク質 M6a は細胞表面の接着分子や受容体と相互作用し、その下流シグナル分子を脂質ラフトに集積させることで、細胞内外のシグナル伝達を活性化するとともに、テトラスパニンや脂質合成酵素を動員して、脂質ラフトによるシグナル伝達のネットワークをポジティブに増幅している可能性が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Igarashi M, Kawasaki A, Ishikawa Y, Honda A, Okada M, Okuda S.	4. 巻 339
2. 論文標題 Phosphoproteomic and Bioinformatic Methods for Analyzing Signaling in Vertebrate Axon Growth and Regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Methods	6. 最初と最後の頁 108723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneumeth.2020.108723.	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 Ishikawa Y, Okada M, Honda A, Ito Y, Tamada A, Endo N, Igarashi M	4. 巻 12
2. 論文標題 Phosphorylation sites of microtubule-associated protein 1B (MAP1B) involved in axon growth and regeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 31711525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-019-0510-z.	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 M Igarashi, A Honda, A Kawasaki, M Nozumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Neuronal signaling involved in neuronal polarization and growth: Lipid rafts and phosphorylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontier of Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2020.00150	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 A Honda*, Y Ito*, M Igarashi *equal contribution	4. 巻 128
2. 論文標題 Glycoprotein M6a as a signaling transducer in neuronal lipid raft	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 19024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2017.11.002	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 本多敦子、石川裕也、五十嵐道弘
2. 発表標題 神経軸索成長・再生過程に特異的なMAP1Bのリン酸化
3. 学会等名 第92回 日本生化学大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michihiro Igarashi, Atsuko Honda, Motohiro Nozumi
2. 発表標題 Lipoquality and development of the GPSN2 knockout mice
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川裕也、本多敦子、伊藤泰行、河峯麻実、玉田篤史、遠藤直人、五十嵐道弘
2. 発表標題 発生脳におけるMAP1Bの高頻度リン酸化部位
3. 学会等名 第42回日本神経科学・第62回日本神経化学合同大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川裕也、岡田正康、本多敦子、伊藤泰行、玉田篤史、遠藤直人、五十嵐道弘
2. 発表標題 The MAP1B phosphorylation sites specifically localized in the developing brain and in the regenerating peripheral nerves
3. 学会等名 SFN annual Meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤泰行、本多敦子、五十嵐道弘
2. 発表標題 脳発生過程で高頻度にリン酸化されるMAP1Bチロシン残基の同定と機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤泰行、本多敦子、五十嵐道弘
2. 発表標題 高頻度チロシンリン酸化MAP1Bの神経発生過程における機能解析
3. 学会等名 第42回日本神経科学・第62回日本神経化学合同大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本多 敦子, 野住 素広, 内野 春樹, 有田誠, 五十嵐 道弘
2. 発表標題 神経発生過程における極長鎖脂肪酸産生酵素GPSN2の生理的役割
3. 学会等名 第93回 日本生化学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本多 敦子, 野住 素広, 内野 春樹, 有田誠, 五十嵐 道弘
2. 発表標題 Physiological function of GPSN2, an enzyme synthesizing VLCFA in the neuronal development
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	伊藤 泰行 (ITO YASUYUKI) (70710573)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	

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
---------	---------