

令和 5 年 10 月 25 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06931

研究課題名(和文) 樹状突起スパインの形成・安定性を担う新たなアクチン骨格制御機構の解明

研究課題名(英文) Inka2 regulates actin dynamics in neuronal development

研究代表者

榊原 伸一 (Sakakibara, Shin-ichi)

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：70337369

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)：哺乳類の脳では学習・記憶などの刺激頻度依存的に樹状突起スパインの消長が起こり、この変化が脳可塑性に重要と考えられている。Inka2は海馬や大脳皮質ニューロンに局限して発現し、アクチン骨格再編成を促進する活性がある。Inka2の生体機能を明らかにするため、Inka2 KOマウスを作製解析した結果、大脳皮質ニューロンの樹状突起スパインの形態異常、密度の低下が出生後早期から見られた。生化学的解析結果からInka2はRho GTPaseシグナルの主要なエフェクターであるPAK4に結合してそのキナーゼ活性を抑制することによりニューロンのアクチン骨格再編成とシナプス形成を制御することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞の樹状突起スパインの適切な個数や形態は、Pakファミリーシグナルを介するアクチン細胞骨格のダイナミックな重合・脱重合制御により厳しく管理されている。この制御機構の破綻は、統合失調症や自閉スペクトラム症、アルツハイマー病などの種々の精神疾患や発達障害などの機序に深く関係する。しかしその制御機構には未解明な点が多い。本研究によりInka2が、脳内におけるPak4阻害因子であることが明らかとなった。今後Inka2が関与する疾患発症の原因解明やInka2によるPak4阻害をターゲットとする創薬開発へつなげることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Inka2 gene is a novel mammalian protein exhibiting sequence similarity to Inka1, which serves as a possible inhibitor for Pak4. We found that Inka2-iBox directly binds to Pak4 catalytic domain to suppress actin polymerization. Inka2 promoted actin depolymerization and inhibited the formation of cellular protrusion caused by Pak4 activation. We further generated the conditional knockout mice of the Inka2 gene. The beta-galactosidase reporter indicated the preferential Inka2 expression in the dorsal forebrain neurons. Cortical pyramidal neurons of Inka2<sup>-/-</sup> mice exhibited decreased density and aberrant morphology of dendritic spines with marked activation/phosphorylation of downstream molecules of Pak4 signal cascade, including LIMK and Cofilin. These results uncovered the unexpected function of endogenous Pak4 inhibitor in neurons. Unlike Inka1, Inka2 is a critical mediator for actin reorganization required for dendritic spine development.

研究分野：神経科学

キーワード：ニューロン アクチン骨格 樹状突起スパイン Pakファミリー Inka2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳のほとんどの興奮性シナプス入力はグルタミン酸によるもので、ニューロンの樹状突起上にある無数の小さな棘状の隆起である樹状突起スパイン (dendritic spine) 上に興奮性シナプスが形成される。脳発達初期のニューロンの樹状突起には、スパインになる前のフィロポディア (プロトスパイン) が形成され、その後突起の頭部が膨らみスパインになる。哺乳類の脳では樹状突起スパインは生後の発達期において急速に増加・集積し、その後脳成熟が進むにつれて刈り込みにより急速に数が減少していく。脳の成熟後は学習・記憶などの刺激頻度依存的にスパインの消長が起こり、この変化が脳の可塑性に重要と考えられている。最近の研究からスパインの数、形態は非常に多くの種類の遺伝子発現、環境要因や神経活動に依存して制御されており、精神遅滞や統合失調症等の精神疾患ではスパイン密度の変化や異常な形態変化が脳機能障害につながると考えられるが、その詳しい分子基盤は不明な点が多い。アクチン細胞骨格の重合・脱重合のバランスは、神経細胞の樹状突起スパインの形成・安定性に重要な役割を果たす。アクチンフィラメント重合する制御機構として、セリン・スレオニンキナーゼである Pak ファミリー (Pak1-3 のグループ I と Pak4-6 のグループ II) 及びその下流シグナル因子である LIMK、Cofilin が知られている。Pak ファミリーの適切な制御は、異常なスパイン形成を防ぎ、健全な脳の発達を促進する上で非常に重要と予想されるが、内在性 Pak の阻害因子はニューロンでは未だ同定されていない。Inka2 (fam212b) は、神経系前駆細胞に強く発現する新規遺伝子として我々が同定した (Iwasaki et al., 2015)。Inka2 タンパク質はアクチン細胞骨格制御に関与する inka Box (iBox) を持ち、細胞内のアクチン骨格再編成を促進し、細胞のフィロポディア形成を促進する働きがあると考えられる。生後のシナプス形成期のニューロンで inka2 mRNA 発現は急速に上昇し、成体では海馬や大脳皮質などの前脳領域のニューロンに限局して強い mRNA 発現を示す。一方、Inka2 に類似する遺伝子として、神経堤由来組織に発現する Inka1 遺伝子が報告されている。Inka2 と Inka1 タンパク質は共に inka Box (iBox) 領域を持ち、Inka1 は iBox で Pak4 と相互作用することが示唆されている。しかしながら、Inka2 の脳内における役割及び Pak4 との関係性は不明である。

脆弱 X 症候群 (fragile X syndrome: FXS) は、X 染色体上の FMR1 (Fragile X Mental Retardation Protein 1) 遺伝子の 5' 端の非翻訳領域での 3 塩基反復配列伸長による FMR1 発現低下が原因で起きる遺伝性の精神発達障害スペクトラムであり、自閉症 (ASD)、学習障害、情緒不安定、多動性、特徴的な顔貌を呈する。FMR1 は脳に強く発現する RNA 結合タンパク質であり、スパイン内で PSD95 や Map1b などのシナプス関連タンパク質、細胞骨格や受容体の内在化に関係する mRNA と結合しその翻訳を抑制することによりシナプス機能を維持していると考えられ、Fmr1 欠損による樹状突起スパインにおけるこれらのタンパク質の翻訳亢進が病態の元になっていると推定されている。我々は FMR1 が認識し結合する配列、G-quadruplex (G4 と略) と呼ばれる特殊な RNA 四重鎖構造が inka2 mRNA 内に 2 か所存在することから、inka2 mRNA が FMR1 の新たな標的候補であると考えた。

### 2. 研究の目的

inka2 遺伝子のスパイン形成における役割を解明する事を目的とする。スパイン形成を動的に制御する分子的仕組みを解き明かすことは、正常な脳機能の発達、神経可塑性の成立メカニズムの理解だけでなく、その逸脱による脳機能障害の発症メカニズムを理解する上でも極めて重要である。

### 3. 研究の方法

#### (1) Inka2<sup>-/-</sup>欠損マウスの組織形態学的解析

胎児期後期から出生後～成体期の各発達時期で inka2 KO マウスの脳を採取しゴルジ染色を行い、大脳皮質および海馬を中心に樹状突起スパインの形態、密度を詳細に観察する。さらにシナプスマーカーや PAK4、CRMP 等アクチン骨格関連分子の変化を調べる。大脳皮質・海馬の錐体細胞を初代培養し、形成されるスパイン特性を検討する。

#### (2) Inka2 の下流シグナルカスケードの同定

Inka2 の iBox 領域が Pak4 と相互作用することを、Inka2 の iBox 欠失体 (Inka2<sup>-</sup> iBox) など各種変異型の Inka2 を用いて免疫沈降実験を行い検討する。さらに Inka2 の欠損により、Pak4 の下流シグナルでアクチンフィラメントの重合を制御する経路である LIMK、Cofilin のリン酸

化が変化するか、Inka2<sup>-/-</sup>大脳皮質のニューロンのシナプスから単離したシナプトニューロソーム(SN)を用いて検証する。

### (3) Inka2 mRNA への Fmr1 タンパク質結合と翻訳抑制の検討

マウス脳および培養細胞での FMR1 抗体による RIP-ChIP 解析(RNA 免疫沈降)を行う。BrdU で in vitro 標識した inka2 mRNA の各領域(G4 部位の有無)を脳抽出タンパクと反応させ、BrdU 抗体により免疫沈降し、Fmr1 抗体によるウェスタンブロットで inka2 mRNA 内の G4 配列と Fmr1 タンパク質の結合を検討する。ホタルルシフェラーゼ cDNA の下流に inka2 mRNA G4 RNA 部位を連結したコンストラクトを作成し、fmr1 発現ベクターと共に培養細胞に導入する。fmr1 発現量に比例し翻訳抑制が起こるか検討する。

## 4. 研究成果

### (1) Inka2 は前脳ニューロンのスパインの形成を制御する

Inka2 遺伝子プロモーター下流に b-galactosidase レポーターを挿入したコンディショナルノックアウトマウスを作製し、Inka2 の脳内における空間的な発現局在を Lac Z 染色により解析した。Inka2 mRNA は前脳背側の大脳皮質や海馬などのニューロン特異的に発現することが示された(図1)。その一方、In situ hybridization 実験から、Inka1 の脳での発現は認められなかった。Inka2 の生理機能を明らかにするため、全身性の Inka2 ノックアウトマウス(Inka2<sup>-/-</sup>)を樹立した。Inka2<sup>-/-</sup>マウスは脳における肉眼的な異常は見られなかったが、ニューロンの詳細な形態変化を Golgi 染色により検証したところ、生後1ヶ月齢以降の Inka2<sup>-/-</sup>マウスでは、大脳皮質の錐体神経細胞の樹状突起の異常な屈曲及び変化樹状突起スパイン形成不全が起きることが明らかになった(図2)。また、Inka2<sup>-/-</sup>マウスのスパイン形成不全は、Inka2<sup>-/-</sup>マウス由来の初代培養神経細胞でも同様に見られた。

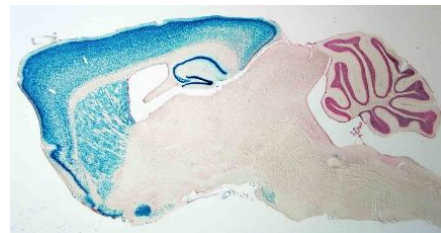


図1:前脳領域に特異的な Inka2 mRNA 発現

### (2) Inka2 は iBox を介して Pak4 と結合し、Pak4 キナーゼ活性を抑制してスパインのアクチン骨格を制御する

培養細胞に Inka2 の過剰発現または Pak4 の発現抑制、免疫沈降実験から Inka2 は iBox 依存的に Pak4 と相互作用して細胞内のアクチンフィラメントの脱重合を調節し、細胞形態が球形に変化させることが明らかになった。Inka2 の iBox 領域が直接的に Pak4 のリン酸化能を阻害するかを検証するため、大腸菌由来の精製タンパク質を用い無細胞系の in vitro リン酸化アッセイを行った。その結果 Inka1-iBox と Inka2-iBox 共に、濃度依存的に Pak4 の酵素活性を強く抑制することが明らかとなった(図3)。その一方で、グループ I の Pak ファミリーへの抑制効果は見られなかった。以上より、Inka1 と Inka2 が持つ iBox は、グループ II の Pak ファミリー(特に Pak4)のリン酸化能を直接的に阻害することでアクチンフィラメントの脱重合に関与することが明らかになった。次に Inka2 欠損が Pak4 シグナルに影響を与えるかを大脳皮質のシナプスから単離したシナプトニューロソーム(SN)を用いて検証した。Inka2<sup>-/-</sup>群の SN では LIMK、Cofilin のリン酸化が顕著に亢進することが示された(図4)。以上から Inka2 欠損により、Pak4 のキナーゼ活性が過剰亢進し、その結果として Pak4-LIMK-Cofilin シグナルのリン酸化も亢進することで、アクチン重合が促進されスパイン形成の異常が起きることが明らかになった(図5)。

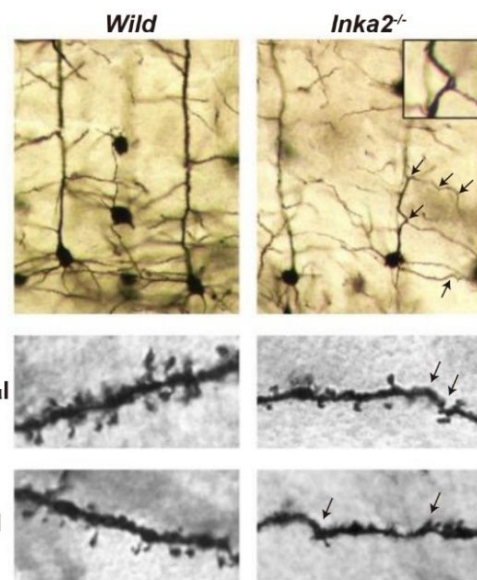


図2: Inka2<sup>-/-</sup>マウスの大脳皮質の錐体神経細胞の樹状突起の形態異常(矢印)とスパインの形成不全(2・3段目)

(3) Fmr1などのRNA結合タンパク質による Inka2 mRNAの翻訳抑制

RNA-免疫沈降 (RIP) 解析 (図 6A, B) の結果、N2a 細胞 (A) および成体マウス大脳皮質 (B) において Inka2 mRNA と FMR1 および TDP-43 タンパク質の結合が確認された。さらに RNA プルダウンアッセイの結果、FMR1 および TDP-43 タンパク質は Inka2 mRNA 中の G4 または GU-repeat 部位と結合することが示された (図 6C)。ルシフェラーゼアッセイの結果、inka2 mRNA は G4 RNA 部位依存的に翻訳抑制されることが明らかとなった。

以上の結果から、Inka2 が脳内のニューロン特異的に Pak4 の酵素活性を阻害すること、そして、Inka2 が脳内で欠損すると Pak4-LIMK-Cofilin シグナル経路が亢進し、スパイン形成の異常を引き起こすことが明らかになった。本研究で明らかにされた Inka2 によるスパイン形成機構が、様々な疾患発症原因の解明に寄与できると期待される。

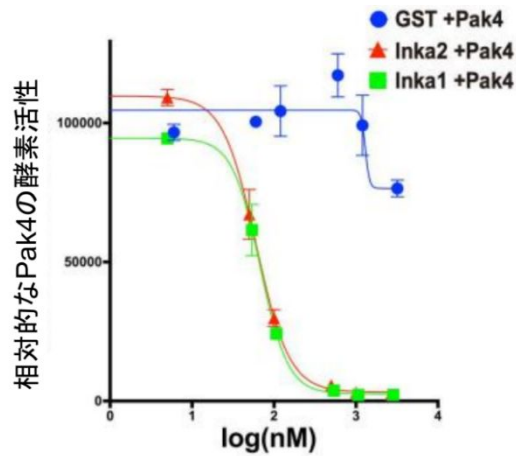


図3: Inka1とInka2によるPak4の酵素活性の抑制

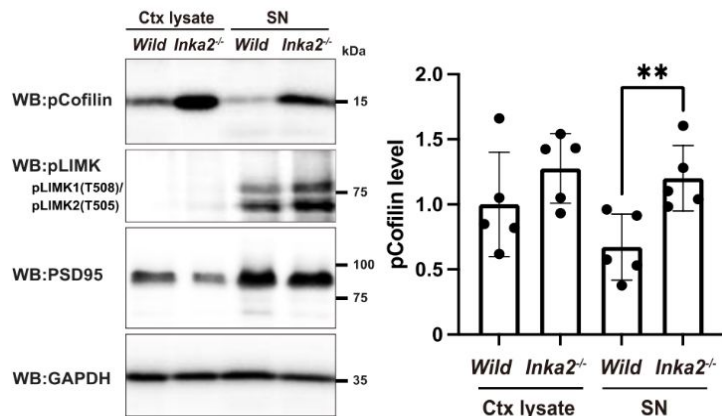


図4: Inka2<sup>-/-</sup>マウス大脳皮質(Ctx)から単離したシナプトニューロソーム(SN)における Pak4-LIMK-Cofilinシグナル経路の亢進

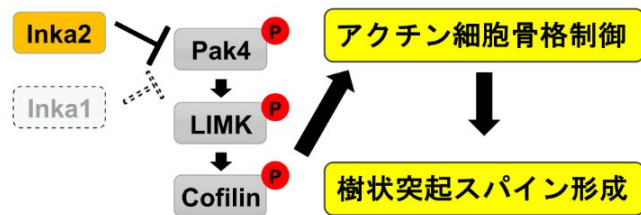
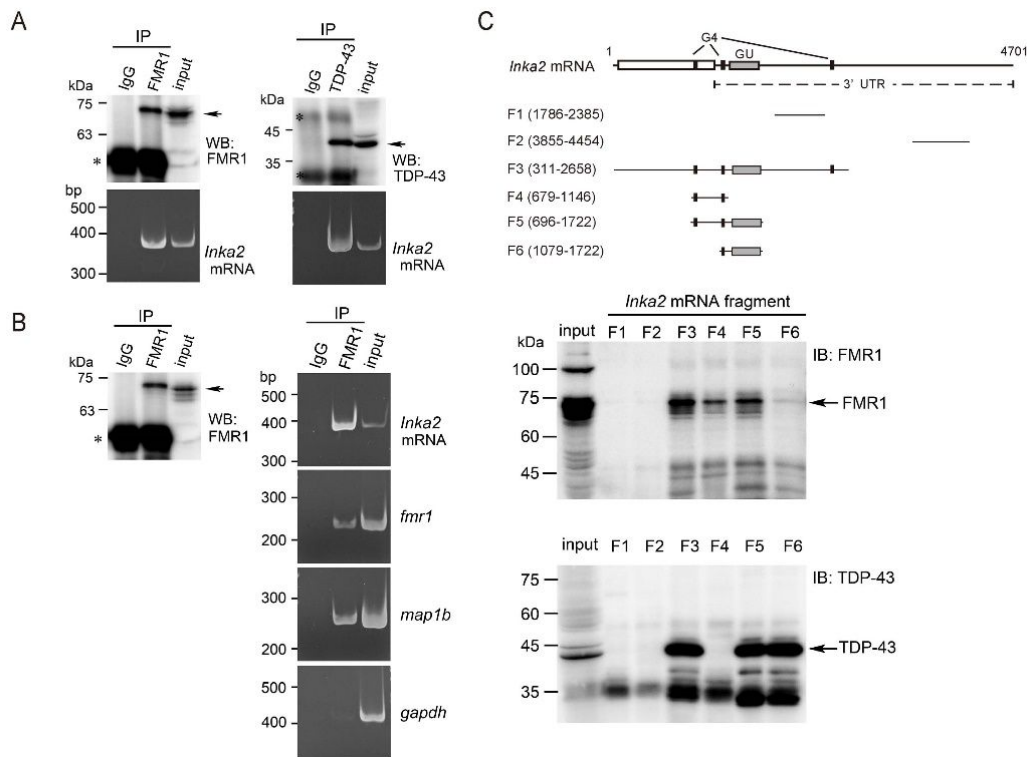


図5: Inka2によるPak4シグナル制御を介した樹状突起スパイン形成機構



**図 6:** (A, B) RNA-免疫沈降 (RIP) 解析。N2a 細胞 (A) および成体マウス大脳皮質 (B) を、抗 FMR1 抗体または抗 TDP-43 抗体で免疫沈降し、*Inka2* mRNA を検出。*map1b* mRNA と *gapdh* mRNA はそれぞれポジティブコントロールとネガティブコントロール。(C) G4 または GU-repeat 要素を含む *Inka2* mRNA 断片を用いた RNA プルダウンアッセイ。In vitro 転写した各 BrU 標識 *Inka2* RNA を N2a 細胞溶解液とインキュベートした後、抗 BrdU 抗体で IP し、抗 FMR1 抗体または抗 TDP-43 抗体によるイムノプロットングで解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamada Seiya, Sato Ayaka, Ishihara Naotada, Akiyama Hiroki, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Drp1 SUMO/deSUMOylation by Senp5 isoforms influences ER tubulation and mitochondrial dynamics to regulate brain development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103484 ~ 103484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103484	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 Yamada Seiya, Mizukoshi Tomoya, Tokunaga Akinori, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Inka2, a novel Pak4 inhibitor, regulates actin dynamics in neuronal development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1010438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010438	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 Yamada Seiya, Furukawa Ryutaro, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 46
2. 論文標題 Identification and expression profile of novel STAND gene Nwd2 in the mouse central nervous system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gene Expression Patterns	6. 最初と最後の頁 119284 ~ 119284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gep.2022.119284	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Yamada Seiya, Tokunaga Akinori, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 643
2. 論文標題 Inka2 expression in smooth muscle cells and its involvement in cell migration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 55 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.12.068	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yamada Seiya, Tokunaga Akinori, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 643
2. 論文標題 Inka2 expression in smooth muscle cells and its involvement in cell migration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 55 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.12.068	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yamada Seiya, Furukawa Ryutarō, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 46
2. 論文標題 Identification and expression profile of novel STAND gene Nwd2 in the mouse central nervous system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gene Expression Patterns	6. 最初と最後の頁 119284 ~ 119284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gep.2022.119284	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yamada Seiya, Mizukoshi Tomoya, Tokunaga Akinori, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Inka2, a novel Pak4 inhibitor, regulates actin dynamics in neuronal development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1010438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010438	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yamada Seiya, Sato Ayaka, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Nwd1 Regulates Neuronal Differentiation and Migration through Purinosome Formation in the Developing Cerebral Cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101058 ~ 101058
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101058	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 Akiyama Hiroki, Iwasaki Yumi, Yamada Seiya, Kamiguchi Hiroyuki, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 380
2. 論文標題 Control of cell migration by the novel protein phosphatase-2A interacting protein Inka2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 527 ~ 537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03169-x	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Taguchi Daisuke, Ehara Ayuka, Kadowaki Taro, Sakakibara Shin-ichi, Nakadate Kazuhiko, Hirata Koichi, Ueda Shuichi	4. 巻 53
2. 論文標題 Minocycline Alleviates Cluster Formation of Activated Microglia and Age-dependent Dopaminergic Cell Death in the Substantia Nigra of Zitter Mutant Rat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 139 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.20-00022	査読の有無 有
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14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 水越智也、山田晴也、榊原伸一
2. 発表標題 神経発達過程における二つのプリン合成経路の発現・機能解析
3. 学会等名 第46回分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田晴也、水越智也、徳永暁憲、榊原伸一
2. 発表標題 新規Pak4抑制因子Inka2はスパイン形成時のアクチンを制御する
3. 学会等名 第46回分子生物学会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 水越智也、山田晴也、榊原伸一
2. 発表標題 プリン合成系タンパク質群の神経発達過程における発現・機能解析
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 (Neuro2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田晴也、佐藤彩佳、石原直忠、秋山博紀、榊原伸一
2. 発表標題 Drp1のSUMO化によるミトコンドリア形態制御を介した大脳皮質発生機構
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 (Neuro2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤彩佳 山田晴也 秋山博紀 榊原伸一
2. 発表標題 脱SUMO化酵素SENP5によるミトコンドリア形態制御
3. 学会等名 第45回分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤彩佳, 山田晴也, 秋山博紀, 榊原伸一
2. 発表標題 脱SUMO化酵素SENP5による神経突起制御
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Seiya Yamada, Ayaka Sato, and Shin-ichi Sakakibara
2. 発表標題 Nwd1 adjusts purinosome formation during cortical development
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Seiya Yamada, Ayaka Sato, and Shin-ichi Sakakibara
2. 発表標題 Nwd1 and Purinosome regulates neural differentiation
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田晴也、佐藤彩佳、榊原伸一
2. 発表標題 Nwd1遺伝子によるプリノソーム形成は大脳皮質発生を制御する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤彩佳、山田晴也、秋山博紀、榊原伸一
2. 発表標題 発生段階および成体マウス中枢神経系における脱SUMO化酵素SENP5の局在解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田晴也, 榊原伸一
2. 発表標題 Inka2はアクチン骨格再編成を通して樹状突起スパイン形成を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 晴也, 秋山 博紀, 榊原 伸一
2. 発表標題 The novel gene Nwd1 regulate cerebral cortex development
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤彩佳, 山田晴也, 秋山博紀, 榊原伸一
2. 発表標題 SUMO de-conjugating enzyme SENP5 regulates neuronal differentiation
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiya Yamada, Hiroki Akiyama, and Shin-ichi Sakakibara
2. 発表標題 The novel gene Nwd1 regulate brain development, The 10th IBRO World Congress of Neuroscience
3. 学会等名 The 10th IBRO World Congress of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

プレスリリース：神経細胞のアクチン細胞骨格を担う因子を発見 ささまざまな疾患発症原因の解明に寄与することを期待（早稲田大学）  
<https://www.waseda.jp/top/news/84905>

プレスリリース：脳発生に重要な新しい因子発見（早稲田大学）  
<https://www.waseda.jp/top/news/77238>

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

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