

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20800031
 研究課題名（和文）細胞外シグナルが誘導する神経細胞の極性形成機構の解析
 研究課題名（英文）Analysis of the neuronal polarity formation mechanism induced by extracellular signals

研究代表者
 鳥山 道則（TORIYAMA MICHINORI）
 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員
 研究者番号：90457151

研究成果の概要（和文）：

神経極性形成分子 Shootin1 が細胞外シグナル分子である Netrin-1 の刺激に応答し、リン酸化酵素 PAK1 により直接リン酸化修飾を受けること、さらにリン酸化 Shootin1 は神経極性形成に対して促進的に働くことを見出した。よって、細胞外シグナル分子である Netrin-1 は Shootin1 のリン酸化を促進し Shootin1 の活性を制御することで、神経細胞の極性形成を制御することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Netrin-1 stimulation elevated shootin1 phosphorylation via PAK1. And phosphorylated shootin1 promoted neuronal polarity formation. These results suggest that extracellular molecule Netrin-1 regulates neuronal polarization by promoting shootin1 phosphorylation and activating its activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：Shootin1, 神経極性, Netrin-1, 軸索, 軸索ガイダンス, リン酸化, PAK1

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は構造的/機能的に異なる 1 本の軸索と複数の樹状突起を有し極性を形成する。この神経細胞の極性は脳内において、神経回路網の形成と情報伝達に非常に重要な

働きを担う。ここ数年の間に神経細胞の極性形成に関与する知見が数多く得られている。しかし、これまでの知見は、培養条件下で細胞外シグナルに非対称性が存在しない条件における神経細胞の極性形成についての解

析が大半であった。(Nat. Rev. Neurosci. 8:194-205, 2007)

一方で、発生時期の脳皮質の神経細胞は特定方向の神経突起が軸索へと分化することが知られており、神経細胞の極性形成の方向性が脳内では厳密にコントロールされていることを意味する。このことは細胞外からのシグナルが神経細胞の極性形成に関与することを示唆するものであるが、この現象の分子機構に関する知見は乏しかった。

2. 研究の目的

本研究では、Shootin1 のリン酸化修飾とそれに伴う活性調節に焦点を絞り、細胞外シグナルによる神経極性形成の分子メカニズムの解明を目的とする。特に細胞外シグナル分子のいくつかは神経細胞の突起伸長に対して促進的に働くことが知られている。そこで、細胞外シグナル分子の働きにより Shootin1 がリン酸化修飾を受ける分子機構、それによる活性制御（細胞内局在、他の分子との相互作用、神経突起伸長）を解析することで神経極性形成に及ぼす影響を解析する。以上の研究を通じて、発生段階の脳内において神経細胞が非対称的な細胞外シグナルによる情報を受容する環境下において、どのようにして正しい極性を形成しうるのかという基本原理を明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) PAK1 による Shootin1 のリン酸の解析

大腸菌で発現/精製した Shootin1 と PAK1 を試験管内で反応させ、Shootin1 のリン酸化修飾を放射性同位体を用い解析した。さらに、PAK1 の活性型変異体や不活性型変異体を培養神経細胞内に発現させ、内在性 Shootin1 のリン酸化状態の変動を Western blot 法により解析した。

(2) 細胞外シグナル分子による Shootin1 のリン酸化修飾機構の解析

海馬神経細胞を培養し Netrin-1 の刺激を行った後、細胞抽出液を Shootin1 のリン酸化抗体を用いて Western blot を行い、Shootin1 のリン酸化状態の変動を解析した。また、Shootin1 のリン酸化抗体を用いた免疫細胞染色により、リン酸化 Shootin1 の細胞

内局在の解析も併せて行った。

(3) リン酸化型 Shootin1 による神経極性形成の分子機構の解析

PAK1 による Shootin1 のリン酸化部位である Ser101 および Ser249 を Ala に置換した非リン酸化型 Shootin1 および、Asp に置換した擬似リン酸化変異体を作製した。作製した各変異体を培養海馬神経細胞内で過剰に発現させ、免疫細胞染色法により神経細胞の形態および各変異体の細胞内局在を解析した。

(4) リン酸化型 Shootin1 と相互作用する分子の探索と同定

リン酸化型 Shootin1 による神経極性形成の詳細な分子メカニズムを明らかにするため、リン酸化型 Shootin1 と相互作用する分子の探索および同定を行なった。培養細胞に FLAG Tag を付加した Shootin1 の野生型、擬似リン酸化型、非リン酸化型を発現させ抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降を行った後、共沈降したタンパク質を SDS-PAGE で展開し質量分析法による同定を行なった。

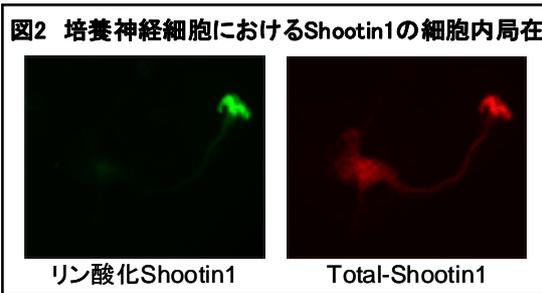
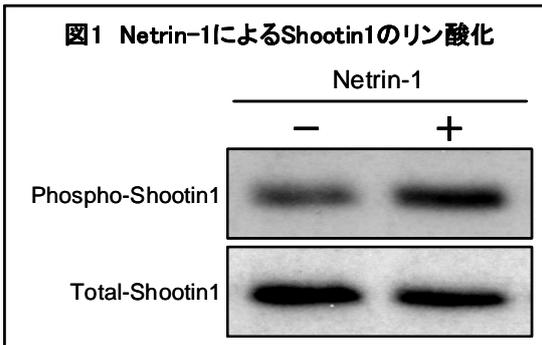
4. 研究成果

(1) PAK1 による Shootin1 のリン酸化の解析

精製タンパク質を用いた In vitro におけるリン酸化実験により、Shootin1 が PAK1 により直接リン酸化されることを確認した。さらに、培養神経細胞で PAK1 の活性型変異体や不活性型変異体を発現させ、Shootin1 のリン酸化状態の変化を Western blot 法により解析したところ、活性型 PAK1 を発現させた場合には、shootin1 のリン酸化が大幅に上昇すること、一方で不活性型 PAK1 を発現させた場合には、Shootin1 のリン酸化が減少することを確認した。

(2) 細胞外シグナル分子による Shootin1 のリン酸化修飾機構の解析

培養海馬神経細胞を Netrin-1 で刺激したところ、Shootin1 のリン酸化修飾が上昇することを確認した(図 1)。さらに、作製したリン酸化抗体を用いた免疫染色法によりリン酸化型 Shootin1 は軸索の成長円錐に強く局在することを確認した(図 2)。



(3) リン酸化型 Shootin1 による神経極性形成の分子機構の解析

Netrin-1 刺激による Shootin1 のリン酸化部位に変異を加えた擬似リン酸化 Shootin1 発現細胞では非リン酸化型 Shootin1 や野生型 Shootin1 発現細胞と比較し、過剰な軸索を有する細胞の割合が優位に増加することを確認した。よって、Shootin1 のリン酸化修飾は神経細胞の極性形成を正に制御すると考えられる。

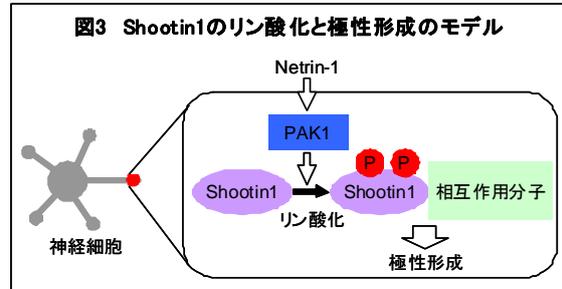
(4) リン酸化型 Shootin1 と相互作用する分子の探索と同定

リン酸化型 Shootin1 による神経極性形成の詳細な分子メカニズムを明らかにするため、リン酸化型 shootin1 と相互作用する分子の探索および同定を行なった。これまでのところ、CCAR1、KCTD15、SNX9 の候補分子を得ている。今後、これら分子と Shootin1 との相互作用を免疫沈降法や精製タンパク質を用いた in vitro での Pull down 法などの手法を用いることで証明を行なう予定である。

以上の結果から、Netrin-1 による Shootin1 のリン酸化修飾は神経細胞の極性形成に対し、促進的に働くと考えられる (図 3)。Netrin-1 はこれまで軸索ガイダンス分子として機能し、神経突起の伸長方向を制御すると考えられてきたが、神経細胞の極性形成の

方向性を制御する可能性も本研究の結果から示唆される。

今後、極性形成前の神経細胞において、単一神経突起先端に局所的な Netrin-1 の刺激を加えた場合の Shootin1 のリン酸化状態の変動と極性形成の様子を観察することで、細胞外シグナルが誘導する神経細胞の極性形成機構の解明が期待できる。



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 2 件)

① Michinori Toriyama, Yuichi Sakumura, Tadayuki Shimada, Shin Ishii and Naoyuki Inagaki. A Diffusion-based neurite length sensing mechanism involved in neuronal symmetry-breaking. *Molecular Systems Biology*, 2010, In Press. 査読あり

② 鳥山道則、稲垣直之 ニューロンには軸索は 1 本しかないのでしょうか? *Clinical Neuroscience* **28**, 113. (2009) 査読なし

[学会発表] (計 3 件)

① 鳥山道則、クラッチ分子Shootin1による神経突起伸長機構の解析, 第 32 回日本神経科学大会, 2009. 9. 16, 名古屋

② 鳥山道則、Shootin1 による神経突起長の計測と神経突起伸長の促進は神経極性形成を誘導する, 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009. 6. 2, 名古屋

③ 鳥山道則、Shootin1 による神経突起長の計測および神経突起伸長の促進は神経極性形成を促進する, 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会, 2008. 12. 10, 神戸

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0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0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

<http://bsw3.naist.jp/itoh/home/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥山 道則 (Toriyama Michinori)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・博士研究員
研究者番号：90457151

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：