

令和 5 年 4 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06855

研究課題名（和文）軸索起始部に着目した神経可塑性に関わる新規分子機構

研究課題名（英文）Molecular Mechanisms for axon initial segment plasticity in neurons

研究代表者

吉村 武 (Yoshimura, Takeshi)

大阪大学・大学院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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：軸索起始部は可塑性を有しており、その骨格構造は変化する。本研究課題は軸索起始部に特有な細胞骨格を制御する分子機構を解き明かすことを目的とした。Cdk5が軸索起始部の細胞骨格分子ankyrin-G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。また、注意欠如・多動症や自閉スペクトラム症様の行動を示すモデル動物の脳において軸索起始部の構造に変化が起きていることも見出した。Cdk5はankyrin-Gのリン酸化を介して軸索起始部特異的な細胞骨格構造の形成に重要な役割を果たしており、神経発達症様モデル動物においてそのリン酸化制御が破綻していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、Cdk5はankyrin-Gのリン酸化を介して軸索起始部に特異的な細胞骨格構造の形成に重要な役割を果たしており、注意欠如・多動症や自閉スペクトラム症様モデル動物においてそのリン酸化制御が破綻していると考えられる。Ankyrin-G (ANK3)のヒト遺伝子変異により注意欠如・多動症や自閉スペクトラム症などが引き起こされることが報告されており、本研究は注意欠如・多動症や自閉スペクトラム症の病態解明の手がかりになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The axon initial segment (AIS) is plastic and may change in response to activity and disease. The molecular mechanism by which the AIS forms remains unclear. In this study, we report that Cdk5 phosphorylates ankyrin-G, a master organizer of AIS. We identified the phosphorylation site of ankyrin-G by Cdk5. We observed abnormalities in AIS length in rodent models of attention-deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. These results suggest that Cdk5 regulates the AIS formation through the phosphorylation of ankyrin-G. Abnormal neuronal output due to abnormalities in the AIS may contribute to the pathophysiology of neurodevelopmental disorders such as attention-deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder.

研究分野：分子神経科学

キーワード：神経細胞 軸索起始部 細胞骨格 Ankyrin-G リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

可塑性とは、物質が外力を受けるとそれに反応して変形し、力を取り去ってもその形状が保持される性質である。神経系の構造や機能は遺伝情報によって全てが決定されているわけではなく、様々な内的・外的環境によって常に変化し、それを保持する。この現象は神経可塑性と呼ばれ、脳の学習や記憶、発達に大きな役割を果たしている。1969年に Ralsman 博士が神経可塑性という概念を確立した (Ralsman, Brain Res, 1969)。この報告以降、約半世紀にわたってシナプスにおける可塑性の研究は多くの研究者達によって進められ、現在もその勢いは衰えるどころか増している。

神経軸索の根元は軸索起始部と呼ばれ、軸索と細胞体/樹状突起の架け橋である高度に特殊化された区画である。軸索起始部は活動電位発生と神経極性維持という主に2つの機能を担う。2010年に新規の神経可塑性として軸索起始部の構造が可塑的であると報告された (Grubb et al., Nature, 2010; Kuba et al., Nature, 2010)。この新しい神経可塑性の発表後、指定難病に認定されている重度精神遅滞やてんかんを特徴とするアンジェルマン症候群のモデルマウスや脳卒中モデルマウスなどでも軸索起始部の長さが変化していると報告された (Yoshimura and Rasband, Curr Opin Neurobiol, 2014)。しかし、どのような分子機構で軸索起始部の長さが増減するのかは未だ理解されていない。そもそも、どのような分子機構で軸索起始部が形成されるのかすら未だ明らかではない。

細胞骨格は細胞の形態形成に必須である。軸索起始部では ankyrin-G と II-spectrin、IV-spectrin という軸索起始部に特有な細胞骨格がナトリウムチャンネルなどの分子と結合し、それらを軸索起始部に集積させている (Liu and Rasband, Front Cell Neurosci, 2019)。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。故に、研究代表者は軸索起始部に特有な細胞骨格のリン酸化制御に着目すれば、軸索起始部の可塑性の分子機構が解明できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、蛋白質リン酸化酵素に着目し、軸索起始部に特有な細胞骨格を制御する分子機構を解き明かすことを目的とした。軸索起始部の細胞骨格分子の中でも ankyrin-G は軸索起始部のマスターオーガナイザーとして知られており、蛋白質リン酸化酵素 Cdk5 のコンセンサス配列を有することから研究代表者は ankyrin-G に着目した。また、ankyrin-G (*ANK3*) のヒト遺伝子変異により注意欠如・多動症 (ADHD) や自閉スペクトラム症などが引き起こされることが報告されていることから、注意欠如・多動症 (ADHD) や自閉スペクトラム症様の行動を示すモデル動物の脳において軸索起始部の構造に変化が起きているか調査した。

## 3. 研究の方法

### (1) Cdk5 による ankyrin-G 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 ankyrin-G 変異体 (GST-ankyrin-G) を COS7 細胞に発現させた後、Pull-down アッセイによって GST-ankyrin-G を単離した。GST-ankyrin-G に精製された Cdk5 および RI 標識 [<sup>32</sup>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) ADHD 様および ADS 様の行動を示すモデル動物の作製と評価

マウスの脳発達期に神経毒 6-OHDA と選択的ノルアドレナリン再取り込み阻害剤 (デシプラミン) を用いて ADHD 様モデルマウス作製した (Avale et al., Mol Psychiatry, 2004; Bouchatta et al., Sci Rep, 2018)。作製した動物は行動解析 (オープンフィールド試験) を用いて評価した。ADHD 様モデルラットとして Lister hooded (LH) ラットを用いた (Jogamoto et al., Neurochem Int, 2020)。ASD 様モデルマウスとして Zbtb16 ノックアウト (KO) マウスを用いた (Usui et al., Transl Psychiatry, 2021)。

### (3) ADHD 様および ADS 様の行動を示すモデル動物の軸索起始部の長さの測定

ADHD 様モデルマウスおよび ADHD 様モデルラットと ASD 様モデルマウスの還流固定を行い、クリオスタットを用いて脳切片を作製後、抗 ankyrin-G 抗体を用いた免疫染色法により軸索起始部を染色して長さを測定した。

## 4. 研究成果

### (1) Cdk5 による ankyrin-G 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) ADHD 様および ADS 様の行動を示すモデル動物における軸索起始部の長さの変化

過去に報告されている方法で薬剤誘導 ADHD 様モデル動物を作製し、その動物の行動解析を行った。オープンフィールド試験により、コントロールマウスと比較して薬剤を用いて作製したマウスは総移動距離や総移動時間、平均速度が上昇していた。過去の報告通り、薬剤を用いて作製したマウスは ADHD 様の行動を示した。

ADHD 様モデルマウスの内側前頭前野 (mPFC) および一次体性感覚野バレルフィールド領域 (S1BF) の軸索起始部の長さを測定した。コントロールマウスと比較して、ADHD 様モデルマウスの mPFC 2/3 層および S1BF 2/3 層と 5 層において短い軸索起始部が観察された。次に動物種を変えて、ADHD 様モデルラットの軸索起始部の長さを測定した。ADHD 様モデルラットの mPFC 2/3 層および S1BF 2/3 層において短い軸索起始部が観察された。ASD 様モデルマウスにおいても同様に軸索起始部の長さを測定した。ASD 様モデルマウスの S1BF 2/3 層と 5 層において短い軸索起始部が観察された。

以上の結果より、ADHD 様モデルマウスおよび ADHD 様モデルラットの脳の特定領域において、軸索起始部の骨格構造が正しく作ることが出来ていないことが明らかとなった。ADHD 様モデルマウスおよび ADHD 様モデルラットで同様の結果が得られたことから、動物種を超えて ADHD 様の行動を示す動物で軸索起始部の骨格構造が変化していることが考えられる。また、ASD 様モデルラットでも同様に軸索起始部の骨格構造が正しく作ることが出来ていないことから、神経発達症に共通して見られる変化であると考えられる。本研究により、Cdk5 は ankyrin-G をリン酸化することが明らかとなった。神経細胞において Cdk5 は ankyrin-G のリン酸化を介して軸索起始部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考えられる。ADHD 様や ASD 様の行動を示すモデル動物において Cdk5 による ankyrin-G のリン酸化制御が破綻していることが考えられる。研究代表者はこれらの結果を学会で発表し、ADHD 様および ADS 様の行動を示すモデル動物における軸索起始部の長さの変化に関して論文として報告した (Usui et al., *Neurochem Int*, 2022)。Ankyrin-G のリン酸化に関しては論文投稿準備中である。また、本研究に関する総説を発表した (吉村, 生化学, 2021; 吉村ら, 子どものこころと脳の発達, 2021)。

## < 引用文献 >

Avale ME, Falzone TL, Gelman DM, Low MJ, Grandy DK, Rubinstein M. The dopamine D4 receptor is essential for hyperactivity and impaired behavioral inhibition in a mouse model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, 9, 718-726, 2004.

Bouchatta O, Manouze H, Bouali-Benazzouz R, Kerekes N, Ba-M'hamed S, Fossat P, Landry M, Bennis M. Neonatal 6-OHDA lesion model in mouse induces Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD)-like behaviour. *Sci Rep*, 8, 15349, 2018.

Grubb MS, Burrone J. Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature*, 465, 1070-1074, 2010.

Jogamoto T, Utsunomiya R, Sato A, Kihara N, Choudhury ME, Miyanishi K, Kubo M, Nagai M, Nomoto M, Yano H, Shimizu YI, Fukuda M, Ishii E, Eguchi M, Tanaka J. Lister hooded rats as a novel animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neurochem Int*, 141, 104857, 2020.

Kuba H, Oichi Y, Ohmori H. Presynaptic activity regulates Na(+) channel distribution at the axon initial segment. *Nature*, 465, 1075-1078, 2010.

Liu CH, Rasband MN. Axonal Spectrins: Nanoscale Organization, Functional Domains and Spectrinopathies. *Front Cell Neurosci*, 13, 234, 2019.

Raisman G. Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. *Brain Res*, 14, 25-48, 1969.

Usui N, Berto S, Konishi A, Kondo M, Konopka G, Matsuzaki H, Shimada S. Zbtb16 regulates social cognitive behaviors and neocortical development. *Transl Psychiatry*, 11, 242, 2021.

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

Usui N, Tian X, Harigai W, Togawa S, Utsunomiya R, Doi T, Miyoshi K, Shinoda K, Tanaka J, Shimada S, Katayama T, Yoshimura T. Length impairments of the axon initial segment in rodent models of attention-deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. *Neurochem Int*, 153, 105273-105273, 2022.

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*, 93(4), 517-520, 2021.

吉村 武, 三好 耕, 天野 元揮, 片山 泰一. 神経細胞の発達や機能に関わる分子メカニズム. *子ども的心灵と脳の発達*, 12(1), 10-16, 2021.

## 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 0件）

1. 著者名 Usui Noriyoshi, Tian Xiaoye, Harigai Wakana, Togawa Shogo, Utsunomiya Ryo, Doi Tomomi, Miyoshi Ko, Shinoda Koh, Tanaka Junya, Shimada Shoichi, Katayama Taiichi, Yoshimura Takeshi	4. 巻 153
2. 論文標題 Length impairments of the axon initial segment in rodent models of attention-deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 105273 ~ 105273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2021.105273	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 吉村 武	4. 巻 93
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 517 ~ 520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930517	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 -

1. 著者名 吉村 武、三好 耕、天野 元揮、片山 泰一	4. 巻 12
2. 論文標題 神経細胞の発達や機能に関わる分子メカニズム	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 子どものこころと脳の発達	6. 最初と最後の頁 10 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34572/jcbd.12.1_10	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉村 武
2. 発表標題 細胞骨格のリン酸化を介した軸索起始部の形成機構
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Xiaoye Tian, Noriyoshi Usui, Wakana Harigai, Ko Miyoshi, Takeshi Yoshimura, Taiichi Katayama
2. 発表標題 Length impairments of the axon initial segments in rodent models of attention deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder
3. 学会等名 第48回日本脳科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村 武
2. 発表標題 Length impairments of the axon initial segment in rodent models of attention-deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder
3. 学会等名 第6回包括的神経グリア研究会 (UNG2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xiaoye Tian, Noriyoshi Usui, Wakana Harigai, Ko Miyoshi, Koh Shinoda, Junya Tanaka, Shoichi Shimada, Taiichi Katayama, Takeshi Yoshimura
2. 発表標題 Length impairments of the axon initial segments in rodent models of attention deficit hyperactivity disorder
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

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
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
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田 小叶, 白井 紀好, 張替 若菜, 三好 耕, 篠田 晃, 田中 潤也, 島田 昌一, 片山 泰一, 吉村 武
2. 発表標題 神経発達症様の行動を示す齧歯類において軸索起始部の長さが変化する
3. 学会等名 NEURO2022 (第45回日本神経科学大会・第65回日本神経化学学会大会・第32回日本神経回路学会大会 合同大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Yoshimura, Noriyoshi Usui, Xiaoye Tian, Wakana Harigai, Ko Miyoshi, Koh Shinoda, Junya Tanaka, Shoichi Shimada, Taiichi Katayama
2. 発表標題 Length impairments of the axon initial segment in rodent models of attention-deficit hyperactivity disorder
3. 学会等名 The 2022 ISN-APSN Biennial Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xiaoye Tian, Noriyoshi Usui, Wakana Harigai, Ko Miyoshi, Koh Shinoda, Junya Tanaka, Shoichi Shimada, Taiichi Katayama, Takeshi Yoshimura
2. 発表標題 Length impairments of the axon initial segments in rodent models of attention deficit hyperactivity disorder
3. 学会等名 第32回神経行動薬理若手の集い
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Yoshimura, Noriyoshi Usui, Xiaoye Tian, Wakana Harigai, Ko Miyoshi, Koh Shinoda, Junya Tanaka, Shoichi Shimada, Taiichi Katayama
2. 発表標題 神経発達症モデル動物における軸索起始部の構造破綻
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉村 武
2. 発表標題 神経発達症モデル動物における軸索起始部の構造破綻
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ <a href="http://www.ugscd.osaka-u.ac.jp/mbs/index.html">http://www.ugscd.osaka-u.ac.jp/mbs/index.html</a>
--

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	臼井 紀好  (Usui Noriyoshi)  (00784076)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授    (14401)	

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			