

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20692

研究課題名（和文）核を起点とした軸索起始部の制御システムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the control system of axon initial segment starting from the nucleus

研究代表者

長谷川 孝一（Hasegawa, Koichi）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・講師

研究者番号：20546783

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：軸索の細胞体近位に存在するAISは活動電位の生成や調節において極めて重要な働きをする。しかし、AIS自体が非常に可塑性の高い構造体であることがわかってきたものの、AISがどのように形成され、その可塑性がどのように制御されているのかについてはいまだに解明が進んでいなかった。本研究では、神経突起に対して機能未知である核膜LINC複合体によるAISの形成・可塑性制御の分子機構を主に初代培養ニューロンを用いて解析した。本研究で、LINC複合体はAISの形成・可塑性制御に必須であり、また、その制御にアクチンが関与することが示唆され、今後の分子メカニズムの解明に大きく寄与する成果をあげることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、AISの形成や可塑性制御に核膜LINC複合体が関与し、また、それはさまざまな神経細胞で普遍性を示していたことから、脳機能の根本的基盤となる分子機構の発見に寄与したと考えられる。今後は、てんかんや双極性障害などに関与するAIS関連遺伝子由来の神経疾患の治療法、予防法の開発に貢献することが期待される。

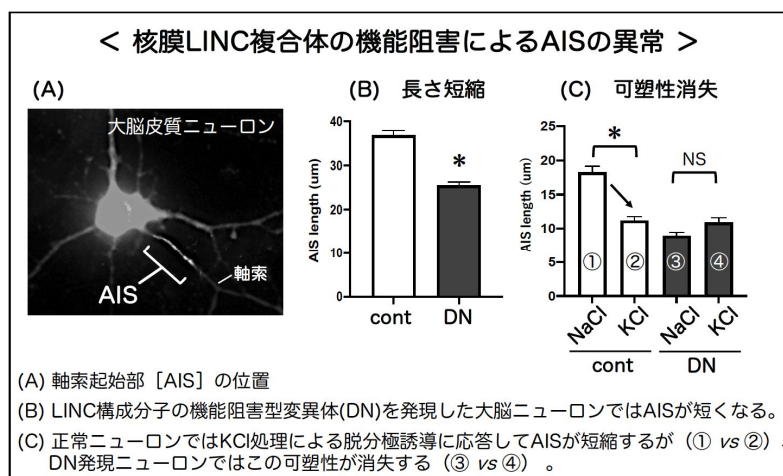
研究成果の概要（英文）：The AIS, located proximal to the cell body of axon, plays a pivotal role in the generation and regulation of action potentials. However, although the AIS itself is known to be a highly plastic structure, how it is formed and how its plasticity is regulated has not yet been understood. In this study, I analyzed the molecular mechanisms of AIS formation and plasticity regulation by the nuclear membrane LINC complex, whose function is unknown for neurites. The present study suggests that the LINC complex is essential for the regulation of AIS formation and plasticity via actin cytoskeleton.

研究分野：神経科学

キーワード：軸索起始部 核膜複合体 核 軸索 可塑性 i-GONAD

## 1. 研究開始当初の背景

AIS は多様なイオンチャネルが集積した軸索の“根もと”の構造体で、活動電位の生成や調節において極めて重要な働きをする ( 図 A; Winckler et al., *Nature* 1999 )。したがって、AIS は脳機能の根幹をなす神経可塑性の基盤であり、AIS 関連遺伝子の変異はてんかんや双極性障害など



の神経疾患を引き起こす。最近の研究から、AIS は神経活動レベルに応じて自身の構造 ( 長さや位置 ) を変化させて、局在するイオンチャネルの種類や量を調節することで、ニューロンの興奮性を制御することが明らかになってきた ( Letierrier, *J Neurosci* 2018 )。このように、AIS 自体が非常に可塑性の高い構造体であることがわかってきたが、AIS がどのように形成され、その可塑性がどのように制御されているのかについてはいまだに解明が進んでいなかった。

一方、核膜上の LINC ( Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton ) 複合体はその細胞質側で細胞骨格と結合して核の位置や細胞極性を制御することがよく知られている。これまで LINC 複合体の神経突起への関与はまったく報告されていなかったが、最近我々は LINC 複合体の阻害によって AIS の顕著な異常が起こることを発見しており ( 図 B,C )、核を起点とした AIS の制御機構の存在する可能性を見出していた。

## 2. 研究の目的

本研究では、LINC 複合体による AIS の形成・可塑性制御の分子機構を解明し、核を起点としたニューロンの活動調節の重要性を理解する。

## 3. 研究の方法

### ( 1 ) 初代培養神経細胞の AIS における LINC 複合体の機能解析

LINC 複合体構成分子 Nesprin-1 の強力な機能阻害型変異体 ( Nesprin-1 DN ) を初代培養大脳ニューロンに発現させると上図の通り、AIS の短縮と神経活動変動による構造的可塑性が消失するが ( 上図 C )、その普遍性を検討するために小脳、海馬由来のニューロンにおいても同様の解析を行なった。

### ( 2 ) 生体脳の AIS における LINC 複合体の機能解析

上記 ( 1 ) の初代培養ニューロンに代わり、子宮内電子穿孔法によって大脳皮質、および、小脳における LINC 複合体の機能を阻害し、AIS の構造にどのような影響が出るか検討した。

### ( 3 ) LINC 複合体の神経突起に対する機能解析

軸索に存在する AIS とは別に、軸索それ自身や樹状突起に対する LINC 複合体の機能をみるために、上記 Nesprin-1 DN を初代培養大脳ニューロンに発現させ、軸索長や Sholl 解析によってその影響を検討した。

### ( 4 ) 分子メカニズム解明を目指した LINC 複合体と AIS をつなぐ細胞骨格の同定

LINC 複合体構成因子 Nesprin-2 は、アクチンや微小管上を動くキネシン、ダイニンといったモータータンパク質との相互作用について詳細に解析が進められているため、これら分子との結合能を保持、または、欠損した Nesprin-2 変異体を用いて AIS の構造変化を観察し、LINC 複合体による AIS の制御に細胞骨格であるアクチン、または、微小管が関与するか否かについて検討した。

#### 4 . 研究成果

はじめに、上記「研究の方法(1)」により初代培養神経細胞の AIS における LINC 複合体の機能解析を検討したところ、既に明らかとなっていた大脳皮質由来のニューロンのみならず、海馬、小脳由来のニューロンにおいても LINC 複合体構成因子 Nesprin-1 の機能阻害型変異体 (Nesprin-1 DN) をこれらニューロンに発現させた場合、AIS の長さの短縮と可塑性が消失した。これらの解析結果によりその普遍性が示され、AIS の構造および可塑性制御における LINC 複合体の重要性が明らかとなった。

また、「研究の方法(2)」により生体脳の AIS における LINC 複合体の機能解析を検討したところ、大脳皮質神経細胞や小脳プルキンエ細胞において LINC 複合体の機能阻害により AIS が短縮することが確認された。この事は実際に LINC 複合体による AIS の制御機構が脳内で存在することが示唆された。

一方、LINC 複合体による神経突起への影響については、Nesprin-1 DN を初代培養大脳皮質ニューロンに発現させて検討した結果、軸索長や樹状突起の複雑性に対する影響は見られなかった。このことから、LINC 複合体は軸索に存在する AIS 特異的に構造や機能を制御していることが示唆された。

さいごに、LINC 複合体の AIS の制御に細胞骨格であるアクチン、または、微小管、または、その両方が関与するかについて検証した。その結果、LINC 複合体はアクチンを介して AIS を制御していることが示唆される結論が得られた。つまり、AIS の構造制御には Nesprin-2 のアクチン結合ドメインが必須であり、微小管に結合するモータータンパク質であるキネシンやダイニンの結合ドメインは必要としなかった。このことは、本研究課題で検討予定であった AIS の構造解析を検討する上で非常に重要なヒントを得たこととなる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takeshi K. Matsui, Yuichiro Tsuru, Koichi Hasegawa, Ken-Ichiro Kuwako	4. 巻 39
2. 論文標題 Vascularization of human brain organoids.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 1017-1024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.3368.	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 Koichi Hasegawa, Ken-Ichiro Kuwako	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular mechanisms regulating the spatial configuration of neurites.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seminars in Cell and Developmental Biology	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） 10.1016/j.semcd.2022.02.015.	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 Koichi Hasegawa, Takeshi K. Matsui, Junpei Kondo, Ken-Ichiro Kuwako	4. 巻 149
2. 論文標題 N-WASP-Arp2/3 signaling controls multiple steps of dendrite maturation in Purkinje cells <i>in vivo</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	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） 10.1242/dev.201214	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川孝一、松井健、近藤純平、石原朋郎、桑子賢一郎
2. 発表標題 神経の極性と可塑性に関連する軸索起始部における核-細胞骨格結合タンパク質Nesprin-1の解析
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 長谷川孝一、松井健、近藤純平、荘司静香、濱徳行、桑子賢一郎
2. 発表標題 核膜複合体LINCは軸索起始部の可塑性を制御する
3. 学会等名 第99回日本生理学大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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