

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370088

研究課題名(和文)アクチン線維の重合・脱重合による遅い軸索輸送の新しい分子機構

研究課題名(英文)Slow axonal transport driven by directional actin turnover

研究代表者

稲垣 直之 (INAGAKI, Naoyuki)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：20223216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：神経軸索内のタンパク質の輸送は軸索の形成・維持・再生に必要不可欠であり、早い輸送と遅い輸送に分類されている。早い輸送は、キネシンファミリータンパク質によってなされることが解っているが、遅い軸索輸送(Slow component b)の分子機構は不明である。最近の研究により、遅い軸索輸送がWaveと呼ばれる構造物とともに輸送されることが解ってきた。本研究では、Waveによる遅い軸索輸送の分子メカニズムの解明を目指した。その結果Slow component bが、アクチン線維の重合・脱重合とクラッチ分子Shootin1を介したアクチン線維の細胞接着分子との連結によって輸送される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although actin and associated proteins are essential for axonal extension, how they are transported along axons remains unclear. Here we show that actin filaments (F-actins) and associated proteins migrate toward the axonal growth cone by means of directional actin polymerization/depolymerization, called treadmilling. F-actins migrating along axonal shafts underwent treadmilling, with their polymerizing ends oriented toward the growth cone. F-actins were anchored to the plasma membrane through the cell adhesion molecule L1-CAM and the linker protein shootin1. Migration of F-actins depended on their polymerization and substrate anchorage, and directional counter-forces associated with F-actin migration were detected on the substrate. Actin-associated proteins co-migrated with F-actins by interacting with the filaments. Our findings reveal a new mode of intracellular transport, which supplies actin and associated proteins to the axonal leading edge, thereby promoting its protrusion.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：脳・神経 発生・分化 神経科学 軸索輸送 細胞骨格 分子クラッチ Shootin1 アクチン線維

1. 研究開始当初の背景

神経軸索内のタンパク質の輸送は軸索の形成・維持・再生に必要不可欠であり、Fast component (2-5 $\mu\text{m/s}$)、Slow component a (0.002-0.01 $\mu\text{m/s}$) および Slow component b (0.02-0.09 $\mu\text{m/s}$) に分類されている。これまでに、Fast component と Slow component a は、微小管上を動くキネシンによって運ばれることが解っている (*J Cell Biol* 160, 817-821, 2003)。一方、Slow component b は、アクチンおよびアクチン結合タンパク質を輸送するが、存在が初めて報告された後 30 年以上もの間、その分子メカニズムは不明である。最近の研究により、Slow component b が Wave と呼ばれる軸索先端の成長円錐によく似たアクチン線維に富んだ構造体とともに輸送されることが解ってきた (図 1; *Cell Motil Cytoskeleton* 40, 160-173, 1988; *Dev Neurobiol* 69, 761-779, 2009)。また、アクチン線維の重合をサイトカラシンで阻害するとこの輸送が阻害されたことから、この輸送にアクチン線維の重合が必須であると考えられた。

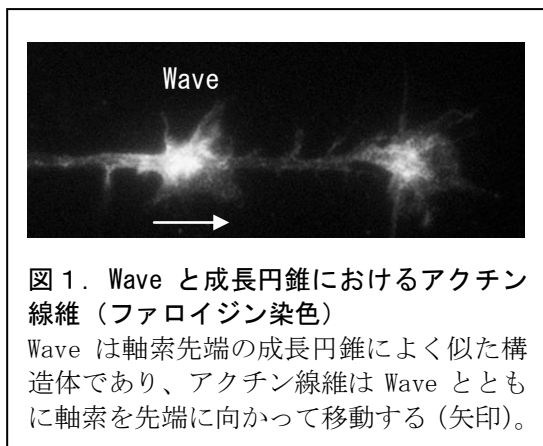


図 1. Wave と成長円錐におけるアクチン線維 (ファロイジン染色)

Wave は軸索先端の成長円錐によく似た構造体であり、アクチン線維は Wave とともに軸索を先端に向かって移動する (矢印)。

我々は研究開始当時、軸索形成分子 Shootin1 を同定し (*J Cell Biol* 175, 147-157, 2006)、Shootin1 が成長円錐で「クラッチ分子」として軸索を伸長させることを世界に先駆けて報告した (*J Cell Biol* 181, 817-829, 2008)。クラッチ分子は、動的に重合・脱重合をするアクチン線維を細胞接着タンパク質につなぎとめてアクチン線維の重合端 (+端) の前方移動を引き起こすと想定されてきたタンパク質である (*Neuron* 1, 761-772, 1988)。また興味深いことに、Shootin1 もアクチンとともにアクチン重合に依存して Wave の移動に伴って軸索を移動することが解った。

2. 研究の目的

そこで我々は、以上の研究成果を基盤として、Shootin1 が Wave においてクラッチ分子として働き、動的に重合・脱重合をするアクチン線維を前方に移動させるという以下の分子機構を想定した (図 2)。細胞内で動的に重合・脱重合するアクチン線維は、プラス

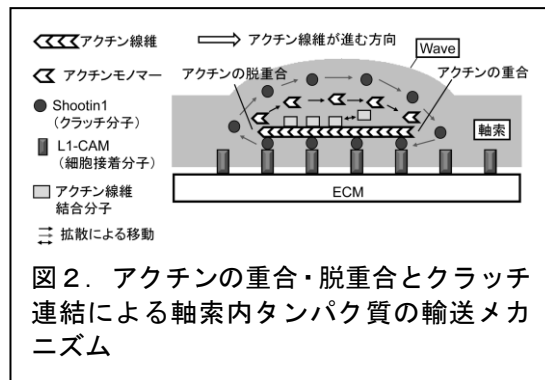


図 2. アクチンの重合・脱重合とクラッチ連結による軸索内タンパク質の輸送メカニズム

端で重合しマイナス端で脱重合する。軸索先端の成長円錐におけるアクチン線維は、前方にプラス端が後方にマイナス端が存在している。我々はこれまでに、Shootin1 がクラッチ分子として成長円錐のアクチン線維を細胞接着タンパク質 L1-CAM を介して細胞外基質につなぎとめ、アクチン線維のプラス端を前方に移動させて軸索伸長に必要な力を生み出すことを証明している (*J Cell Biol* 181, 817-829, 2008)。また、Wave にも豊富に Shootin1 と L1-CAM が存在する。そこで、Wave におけるアクチン線維 (図 2) もプラス端が進行方向に向いていてそこに存在する Shootin1 と細胞接着タンパク質 L1-CAM を介して細胞外基質につなぎとめられる仮定すると、Wave 内のアクチン線維は、重合するアクチン分子の大きさの分だけ軸索先端に向かって移動することになる (白い矢印、図 2)。また、アクチン線維の進行速度は十分に遅く (0.02-0.09 $\mu\text{m/s}$)、予想されるアクチン分子と Shootin1 分子の拡散係数から、マイナス端で放出されたアクチン分子と Shootin1 分子は拡散によって前方に移動してプラス端で再利用されると考えられる (細い矢印、図 2)。さらに、この様に前方移動するアクチン線維は、アクチン線維結合タンパク質群を輸送するための足場としても機能すると考えられる (四角、図 2)。

本研究はこのモデルを検証して、長年の謎だった Slow component b の分子メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

実験では、ラット海馬神経細胞を培養して材料に使った。また、高感度顕微鏡カメラを用いた細胞内 1 分子計測法 (*J Cell Biol* 181, 817-829, 2008; *Curr Biol* 23, 529-534, 2013) により、クラッチの役目をする Shootin1 と重合・脱重合を繰り返すアクチン線維との連結をライブ計測した。また、Wave で発生する微細な駆動力の測定のために、神経細胞を複数の蛍光ナノビーズ (ゲルの変形をモニターする粒子) を包埋したゲルの上に培養し、力の発生に伴うゲルの歪みをビーズの動きから計測した (*Curr Biol* 23, 529-534, 2013)。発生した駆動力の大きさと方向は、計測したビーズの動きをコンピュータで解析して求

4. 研究成果

(1) Wave 内のアクチン線維の重合端は進行方向を向いている：

まず始めに、Wave におけるアクチンの局在を調べたところ、Wave にはモノマー・ポリマーを合わせたトータルのアクチンとアクチン線維は濃縮しているが、アクチンモノマーは細胞内に均一に存在していた。このことから、Wave は細胞内に均一に拡散しているアクチンモノマーを利用し、動的に重合・脱重合しながらアクチン線維としてアクチンを輸送すると考えられた(図2)。

Wave がアクチン線維の重合・脱重合によって移動するのであれば、Wave 内のアクチン線維は重合端を進行方向に向けて重合・脱重合をする必要がある。そこで、Wave 内のアクチン線維の方向を細胞内1分子計測法で解析したところ、重合端が進行方向を向いていることがわかった。

(2) Wave 内のアクチン線維の移動はアクチン線維の重合に依存する：

我々のモデルから、アクチン線維の移動はアクチン線維の重合に依存することが予想される。そこで、アクチン線維の重合をアクチン重合阻害剤サイトカラシンの添加によって阻害すると、Wave の移動速度が遅くなった。一方、Cofilin はアクチンの脱重合と重合を促進することが知られている。そこで、Cofilin の恒常活性型変異体を神経細胞に発現させたところ、Wave 内のアクチン線維の重合速度が増加し、Wave 自体の移動速度も速くなった。以上の結果から、Wave 内のアクチン線維の移動はアクチン線維の重合に依存することがわかった。

(3) Wave 内のアクチン線維の移動はアクチン線維のクラッチ連結に依存する：

我々のモデルでは、動的に重合・脱重合するアクチン線維をクラッチ分子 Shootin1 と細胞接着分子 LI-CAM が仲介して細胞外基質に連結させることで、アクチン線維の移動が起こると考えられる。そこで、この連結を弱めるために、クラッチ分子 Shootin1 の RNAi を行った。その結果、Wave 内のアクチン線維の逆行性移動速度は速くなり(クラッチ連結は弱まり)、Wave 自体の移動速度は遅くなった。反対に、Shootin1 を過剰発現させると、Wave の移動速度は速くなった。

成長円錐において、Shootin1 は軸索ガイダンス分子 Netrin1 の下流シグナルである Pak1 によりリン酸化され、リン酸化 Shootin1 はクラッチを増強する。リン酸化 Shootin1 は Wave にも局在しており、Netrin1 刺激をすると、アクチン線維の逆行性移動速度は遅くなり、Wave 自体の移動速度は速くなった。

以上の結果から、Wave 内のアクチン線維の

移動がアクチン線維のクラッチ連結に依存することが示唆された。

(4) アクチン線維の輸送に伴う駆動力の検出：

Wave がクラッチシステムによって前進するのであれば、細胞外基質には前進するアクチン線維を支えるために進行方向とは反対向きの力がかかるはずである。そこで、この基質にかかる力の検出を試みた。具体的には、多くの蛍光ナノビーズを埋め込んだアクリルアミドゲルを作成し、この上に神経細胞を培養した。ゲルは力がかかると歪みが生じるので、その歪みの大きさと方向をビーズの動きから検出した。実際にビーズの動きを解析した結果、Wave の移動時に Wave の下に存在するビーズは進行方向とは反対向きに動いていることがわかった。

以上、我々の軸索輸送モデルから予想されるように、前進するアクチン線維を支えるための進行方向とは反対向きの力を細胞外基質上で検出することができた。

(5) アクチン結合タンパク質は Wave 内のアクチン線維と相互作用をしながら輸送される：

また、Wave はアクチン結合タンパク質を輸送する足場として機能すると考えられる。そこで、Slow component b に分類されるアクチン結合タンパク質である Cortactin や Cofilin に蛍光タンパク質を融合させ培養神経細胞に発現させたところ、Wave に濃縮して移動する様子が観察された。また、Shootin1 を RNAi してアクチン線維の輸送速度を遅らせると Wave に濃縮した Cofilin の輸送も遅くなった。

以上の結果から、アクチン結合タンパク質は Wave 内のアクチン線維と相互作用をしながら輸送されると考えられた。

本研究の成果から、そのメカニズムが長らく不明だった軸索輸送 Slow component b が、アクチン線維の重合・脱重合(トレッドミリング)とクラッチ分子 Shootin1 を介したアクチン線維の細胞接着分子とのクラッチ連結によって引き起こされる可能性が示唆された(図2)。

アクチン線維の重合・脱重合を介する細胞内タンパク質の輸送システムは、キネシンによるものとは全く異なる新しいタイプの輸送機構であり、本研究成果が、細胞生物学および神経科学の分野において大きな学術的な波及効果を及ぼすことが期待できる。また、軸索輸送は軸索の形成・維持・再生に必要な不可欠であり、軸索伸長・再生機構の理解につながる可能性があるため、当該分野のみならず社会的にも大きなインパクトをもたらすことが期待できる。

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 Tahara, K., Moriuchi, T., Tsukui, M., Hirota, A., Maeno, T., Toriyama, M., Inagaki, N. and Kikuchi, J., Ceramic coating of liposomal gene carrier for minimizing toxicity to primary hippocampal neurons, Chemistry Letters. 査読有、42、1265-1267(2013).
- ② 吉田互、鳥山道則、稲垣直之、プロテオミクスを基礎にした神経細胞が非対称性を獲得する機構の解析、生物物理化学、査読有、56 : 31、1-4(2012).

[学会発表] (計 15 件)

- ① 勝野弘子、鳥山道則、作村諭一、池田和司、水野健作、稲垣直之、Axonal transport toward growth cones driven by directional actin turnover、生命分子システムにおける動的秩序形成と高次機能発現第2回公開シンポジウム、2014年1月11日-12日、京都市。
- ② 稲垣直之、軸索伸長のためのシグナル-力変換機構、第51回日本生物物理学会年会、2013年10月29日、京都市。
- ③ 勝野弘子、鳥山道則、作村諭一、池田和司、水野健作、稲垣直之、アクチンのトレッドミルによって引き起こされる遅い軸索輸送、Neuro2013、2013年6月20日-23日、京都市。
- ④ 吉田互、島田忠之、鳥山道則、河野憲二、稲垣直之、脳発生における Shootin1 および Shootin2 の機能解析、第65回日本細胞生物学会大会、2013年6月19日-21日、愛知県名古屋市。
- ⑤ 作村諭一、前野貴則、稲垣直之、分子輸送の不規則性が神経形態を極性化する、第65回日本細胞生物学会大会、2013年6月19日-21日、愛知県名古屋市。
- ⑥ 久保祐亮、鳥山道則、小沢哲、池田和司、杉浦忠男、稲垣直之、Cortactin functions as a clutch molecule to promote axon outgrowth、International Symposium on “Sensory Systems and Neural Circuits”、2013年2月11日、東京大学。
- ⑦ 久保祐亮、鳥山道則、小沢哲、池田和司、杉浦忠男、稲垣直之、Cortactin functions as a clutch molecule to promote axon outgrowth、2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology、2012年12月16日、San Francisco, USA。
- ⑧ 勝野弘子、鳥山道則、作村諭一、池田和司、水野健作、稲垣直之、Slow axonal transport driven by directional actin treadmilling、2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology、2012年12月18日、San Francisco, USA。
- ⑨ 稲垣直之、Mecano-systems biological analysis of neuronal polarity formation、

ドイツ生化学分子生物学会 (GBM) Perspectives in Molecular Neurobiology、2012年9月14日、Bochum, Germany。

- ⑩ 勝野弘子、鳥山道則、作村諭一、池田和司、水野健作、稲垣直之、Slow axonal transport driven by directional actin treadmilling of anchored actin filaments、第35回日本神経科学大会、2012年9月19日、愛知県名古屋市。
- ⑪ 久保祐亮、鳥山道則、小沢哲、池田和司、杉浦忠男、稲垣直之、Cortactin functions as a clutch molecule to promote axon outgrowth、第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会、2012年5月29日、兵庫県神戸市。
- ⑫ 勝野弘子、鳥山道則、稲垣直之、Analysis of the mechanism of axonal transport slow component、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月15日、横浜市。
- ⑬ 前野貴則、鳥山道則、稲垣直之、Mechanisms for the axon-specific accumulation of an axonal protein JIP1、第34回日本分子生物学会、2011年12月16日、横浜市。
- ⑭ 久保祐亮、鳥山道則、稲垣直之、Cortactin functions as a clutch molecule to promote axon outgrowth、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、横浜市。
- ⑮ 稲垣直之、プロテオミクスを基礎にした神経細胞が非対称性を獲得する機構の解析、第62回日本電気泳動学会シンポジウム「電気泳動を基礎にした臨床プロテオミクス最近の話題」、2011年11月13日、横浜市。

[図書] (計 1 件)

- ① 久保祐亮、稲垣直之、CRMP2、脳科学辞典 (田中啓治、御子柴克彦編)、2012、<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/CRMP>。

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://nippon.naist.jp/inagaki_g/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 直之 (INAGAKI Naoyuki)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：20223216

(2) 連携研究者

杉浦 忠男 (SUGIURA Tadao)

奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：60304010

作村 諭一(SAKUMURA Yuichi)
愛知県立大学・情報科学部・准教授
研究者番号：50324968

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