

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500386

研究課題名(和文) 神経細胞内ミオシン機能の新規制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on new regulatory mechanism for the function of myosin in neurons

研究代表者

八木 秀司 (Yagi, Hideshi)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10303372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン結合タンパクの一つfilamin Aと結合するFILIP分子の新たな機能について本研究を行った。FILIP分子は細胞の形態に関わるアクチン線維とともに働くミオシン分子の一つと結合し、その細胞内分布に影響を与えることを明らかにした。また、FILIP分子は、このミオシン分子との結合により神経細胞の形態調節に関わる可能性を明らかとした。本研究は、分子生物学的実験を用いて、中枢神経系で神経細胞の形態に及ぼすFILIPを通じた新たなミオシン制御機構を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：FILIP has a role in the development of central nervous system through the binding of filamin A that is one of the actin-binding proteins. We investigated the additional function of FILIP on the neuronal morphology in this study. We observed that the expression of FILIP was observed in the limited region of the adult brain. We found that FILIP bound to one of the non-muscle type myosin and altered the subcellular distribution of it. We disclosed that FILIP influenced on the morphology of the excitatory neurons. Our findings suggested that FILIP altered the morphology of neurons through the binding of the myosin. These results indicate that FILIP regulated actomyosin dynamics that have a role on the neuronal morphology.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経細胞 細胞骨格 アクチン線維 ミオシン

### 1. 研究開始当初の背景

近年の遺伝子改変動物、分子生物学的な手法を用いた解析を通じ、ミオシンの一つである非筋肉型ミオシンは中枢神経系の発生や心臓の発生に中心的な役割を担う分子の一つであることが明らかにされた (Tullio *et al.*, *J. Comp. Neurol.* 433, 62, 2001, Ma *et al.*, *Mol. Biol. Cell* 18, 2305, 2007)。また、細胞生物学的にも、このミオシンは細胞の移動における細胞骨格の制御に重要であることが明らかにされてきた (Vincente-Manzanares *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 778, 2009)。神経細胞においても細胞移動にミオシンの機能が重要であること (Solecki *et al.*, *Neuron* 63, 63, 2009) が明らかにされている。この細胞移動でミオシンの細胞内分布に極性が認められるが、その機構は不明な点が残されている (Solecki *et al.*, *Neuron* 63, 63, 2009)。さらに、シナプスの可塑性にミオシンが関わっていることが明らかとされてきた (Rex *et al.*, *Neuron* 67, 603, 2010)。今までに非筋肉型ミオシンの機能調節としてミオシンと結合するミオシン軽鎖のリン酸化による調節機構が報告されている。さらに、ミオシンのリン酸化による修飾がミオシンの重合・脱重合の調節を行い、ミオシンの機能が調節されている (Vincente-Manzanares *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 778, 2009)。これらは、ミオシンに対しての時間的な活性調節として働くと考えられる。先に述べた神経細胞の移動では、移動の方向に応じてミオシンの機能が発揮されている。また、神経細胞のシナプスの可塑性では、細胞の一部である樹状突起の棘突起という限局した部位でミオシンは機能を発揮している。これらは神経細胞内でのミオシンの空間的な制御機構が細胞の機能に重要であることを示している。

我々は、以前にアクチン線維結合蛋白 filamin A に結合する FILIP を同定し、FILIP が胎生期の神経発生時に filamin A の分解を促進し、神経細胞の機能に関わる分子であることを報告した (Nagano *et al.*, *Nat. Cell Biol.* 4, 495, 2002)。さらに、FILIP 遺伝子欠損マウスを作成し、そのマウスの解析を行っている。この FILIP 遺伝子欠損マウスの解析中に、FILIP 分子の発現は、発達期の脳だけでなく、生体の脳の一部に発現していることがわかってきた。さらに FILIP 遺伝子欠損マウスでは、その FILIP 分子を発現している部位の神経細胞の形態が正常とは異なっている可能性を見いだした。この神経細胞の形態変化は、ミオシンの作用の有無による形態変化と類似していた (Ryu *et al.*, *Neuron* 49, 175, 2006)。また、培養細胞を用いたパイロット研究では FILIP 分子がミオシンの細胞内局在に変化を及ぼす可能性を見いだした。つまり、FILIP 分子の発現がミオシンの分布に影響を与える可能性が高いことが判明した。

以上より、本研究対象である FILIP 分子が関わる細胞形態の調節機構、特にミオシンを通じた調節機構があると考えた。

### 2. 研究の目的

神経細胞の形態の維持、回路形成に関わる軸索、樹状突起の伸展、さらにはシナプスの形成には、細胞骨格の制御が重要である。我々は、アクチン線維と結合し、その動態に関わる非筋肉型ミオシンの機能を制御する新たな機構を示唆するデータを得た。このミオシンは神経発生のみならずシナプスの可塑性や神経突起の伸展に関わり、神経細胞の機能発揮に重要な分子である。その調節機構は、明らかにされつつあるが、未だに不明な点が残っている。本研究を通じ、FILIP 分子が関わるミオシンの制御を明らかにし、神経細胞の機能・形態に関する新たな制御機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) FILIP 遺伝子欠損マウスの Western blot 法で認められたミオシンの変化の検討  
FILIP 遺伝子欠損マウスおよび正常コントロールマウスの臓器より得られた蛋白を用いて Western blot 法を行い、ミオシンについて正常マウスと FILIP 遺伝子欠損マウスとで比較検討する。また、ミオシンの変化に関して、FILIP 遺伝子欠損マウスを用い原因について検討を行う。
- (2) FILIP の強制発現細胞で認めたミオシンの細胞内の分布の変化とミオシンの機能との関連性を検討する  
FILIP を培養細胞内で発現させ、その細胞骨格に与える影響を検討する。さらに、FILIP 存在下でのミオシンの細胞内分布に関して、細胞骨格との関係を Western blot 法を用いて検討する。また、細胞内でのミオシンの分布変化を形態的に検討する。この検討には、FILIP の様々な部位を欠損した変異分子を用い、その変異分子が細胞骨格などに与える影響も検討する。
- (3) FILIP とミオシンとの相互作用に関しての検討  
FILIP およびミオシンの各種変異分子を用い、免疫沈降法もしくは pull-down assay 法により FILIP、ミオシンのそれぞれの結合ドメインを同定する。  
また、filamin A とミオシンは結合することから、FILIP が、ミオシン以外の他分子とも結合し、複数の蛋白からなる複合体を形成している可能性を考え、免疫沈降法、質量分析法を用いて、結合する候補分子の検索を行う。
- (4) 梨状葉皮質由来神経細胞を用いた FILIP とミオシンによる神経細胞の形態変化の検討

FILIP が発現している梨状葉皮質神経細胞の培養法を確立する。この培養細胞を用いて、FILIP が神経細胞の形態に及ぼす影響を評価する。また、ミオシンの活性に影響を及ぼす化合物を、培養神経細胞に投与し、FILIP とミオシンの活性との関係を神経細胞の形態変化を観察することにより検討する。

(5) ミオシンの調節機構を生体内の脳で再現する

時期特異的、また、空間的に特定の分子の発現を制御できるベクターシステム(Iguchi et al, *PLoS ONE* 7, e33380, 2012)を用いて、FILIP の生体内での役割を検討する。このベクターを子宮内電気穿孔法により胎仔脳内に導入し、時期特異的に FILIP の発現を調節し、その神経細胞の形態に与える影響を評価する。

#### 4. 研究成果

(1) FILIP 遺伝子欠損マウスの Western blot 法で認められたミオシンの変化の検討

FILIP 遺伝子欠損マウスと正常マウスの心臓から得られたサンプルに対して、Western blot 法のゲル濃度を調節し、ミオシンの各種分子に対する解析を行った。その結果、当初、認められていたミオシンの変化は、FILIP とは結合しない心筋細胞内の他のミオシン分子の発現による影響が大きいことが判明した。また、この過程で、FILIP が生体内ではミオシンの量に影響を及ぼす可能性を見出した。

(2) FILIP の強制発現細胞で認めたミオシンの細胞内の分布の変化とミオシンの機能との関連性の検討

今までの培養細胞を用いた解析により、FILIP が発現することにより、ミオシンとアクチン線維との結合状態が変化する可能性が考えられた。そこで、ミオシンとアクチンの細胞内分布を培養細胞内で検討した。FILIP の発現により、ミオシンとアクチン線維の相互作用に変化が及んでいることを明らかにした。様々な領域を欠損した FILIP 変異分子を用いて細胞内でのミオシンの細胞内分布に与える影響を検討したところ、FILIP がミオシンに与える影響に関してはミオシンと結合が重要であることが判明した。また、FILIP に結合する新たな分子が同定でき、FILIP の与えるミオシンへの作用は、この結合分子の機能が重要であることがわかった。この結合分子の機能において、神経細胞の形態に関わることは、今までに報告されておらず、非常に新しい発見であると考えている。

(3) FILIP とミオシンとの相互作用に関する検討

FILIP とミオシンの結合について、詳細に検討するため、FILIP とミオシンの結合部位

の同定を、FILIP の変異分子およびミオシンの変異分子を作成し、免疫沈降法を用いて試みた。その結果、FILIP は FILIP の今までドメインとしての報告の無い部位でミオシンと結合することを見出した。また、ミオシン上の FILIP との結合部位も判明した。

(4) 梨状葉皮質由来神経細胞を用いた FILIP とミオシンによる神経細胞の形態変化の検討

まず、梨状葉皮質の神経細胞の培養法を確立した。その培養神経細胞を用いて、ミオシンの神経細胞内での分布の変化を検討した。FILIP により、そのミオシンの細胞内分布に変化が生じる可能性を見いだした。さらにミオシンの機能を修飾する化合物が神経細胞の形態に与える影響を検討した。FILIP が存在する神経細胞と FILIP が存在しない神経細胞では、その化合物の作用による形態の変化に違いが生じていることが判明した。

(5) ミオシンの調節機構を生体内の脳で再現する

FILIP 遺伝子欠損マウスでは発達初期より FILIP を欠損している。発達初期の FILIP 欠損の影響を避けるため、FILIP の発現を時期特異的に抑える分子を発現するベクターを作製し検討を行った。このベクターを用い FILIP 発現抑制の分子を生体のマウス脳内に発現させ、その神経細胞の与える影響を検討した。その結果、FILIP の機能抑制により、神経細胞の形態に影響を与えることが判明した。

以上より、本研究により神経細胞の形態調節に関わる新しい機構の一端を明らかに出来たと考えている。

#### 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 1 件)

Iguchi, T., Yagi, H., Wang, C. C. and Sato, M. A tightly controlled conditional knockdown system using the tol2 transposon-mediated technique. *PLoS One* 7, e33380 (2012). 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0033380

[学会発表](計 11 件)

八木 秀司、神田 浩里、野口 光一、佐藤 真、脊髄神経節における FILIP の発現 第 119 回 日本解剖学会総会 2014 年 3 月 27 日、栃木県下野市(自治医科大学)  
黒田 一樹、謝 敏カク、尾身 実、八木 秀司、佐藤 真 神経細胞のスパンにおける FILIP 関連分子の生体における機能解析 第 119 回 日本解剖学会総会 2014 年 3 月 28 日、栃木県下野市(自治医科大学)

黒田 一樹, 八木 秀司, 謝 敏かく, 岡 雄一郎, 猪口 徳一, 佐藤 真 FILIP 関連分子による Myosin-IIb を介した神経細胞のスパイン形成の制御とシナプス可塑性における機能解析, Neuro2013, 2013 年 6 月 21 日, 京都市 (国立京都国際会館)

八木 秀司, 野口 光一, 佐藤 真, 非筋肉型ミオシン分子の細胞内局在を調節する新たな機構 第 118 回日本解剖学会全国学術集会, 2013 年 3 月 28 日, 高松市

黒田 一樹, 謝 敏かく, 猪口 徳一, 岡 雄一郎, 尾身 実, 王 振吉, 八木 秀司, 佐藤 真, 神経細胞の棘突起 (スパイン) 形成における FILIP 関連分子の機能解析 第 118 回日本解剖学会全国学術集会, 2013 年 3 月 30 日, 高松市

Hideshi Yagi, Kazuki Kuroda, Min-Jue Xie, Hiroshi Ikeda, Tokuchi Iguchi, Takashi Nagano, Munekazu Komada, Kazuyuki Murase, Masaru Okabe, Koichi Noguchi, Makoto Sato. FILIP is involved in the morphological control of dendritic spine through actomyosin Regulation. Neuroscience 2012 (SOCIETY for NEUROSCIENCE), 2012 年 10 月 16 日, New Orleans, USA.

Kuroda, K., Yagi, H., Xie, M.-J., Oka, Y., Iguchi, T., and Sato, M. FILIP-related molecule controls spine maturation in the hippocampal neuron via non-muscle myosin IIb. The 11<sup>th</sup> Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry / 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 2012 年 9 月 29 日, 神戸市

Hideshi Yagi, Kazuki Kuroda, Min-Jue Xie, Takashi Nagano, Hiroshi Ikeda, Tokuchi Iguchi, Kazuyuki Murase, Masaru Okabe, and Makoto Sato. FILIP によるアクチンミオシン調節の棘突起動態変化への関与 第 35 回 日本神経科学大会 2012 年 9 月 19 日名古屋市 (名古屋国際会議場)

黒田 一樹, 謝 敏かく, 猪口 徳一, 駒田 致和, 岡 雄一郎, 王 振吉, 八木 秀司, 佐藤 真: 神経細胞の棘状突起 (スパイン) 形成における FILIP 関連分子の機能解析 第 117 回日本解剖学会全国学術集会, 2012 年 3 月 27 日, 甲府市

八木 秀司, 謝 敏かく, 池田 弘, 駒田 致和, 猪口 徳一, 黒田 一樹, 岡部 学, 佐藤 真: Filip play a role in cortical development and spine morphology. 第 54 回日本神経化学学会大会 2011 年 9 月 26 日, 石川県

八木 秀司, 謝 敏かく, 池田 弘, 駒田 致和, 猪口 徳一, 黒田 一樹, 岡部 勝, 佐藤 真: 神経棘突起の形態調節における FILIP の役割 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 17 日, 横浜市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

八木 秀司 (YAGI, Hideshi)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 10303372

### (2) 研究分担者

佐藤 真 (SATO, Makoto)  
大阪大学・大学院連合小児発達研究科・教授  
研究者番号: 10222019

黒田 一樹 (KURODA, Kazuki)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 60557966

駒田 致和 (KOMADA, Munekazu)  
愛知学院大学・歯学部・助教  
研究者番号: 90523994