

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500443

研究課題名(和文) 微小管修飾を介した神経細胞の形態機能制御

研究課題名(英文) Contribution of post-translational modifications of tubulins in neuronal morphogenesis

研究代表者

小西 慶幸 (Konishi, Yoshiyuki)

福井大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00382838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：微小管は、細胞内の構造・輸送の制御を介して細胞の形態制御において重要な役割を担っている。神経細胞の持つ複雑な形態を構築するためには、特異的な領域で微小管を介した機能が制御されることが重要である。本研究課題では微小管を構成するチューブリンの翻訳後修飾のうち、チロシン化およびグルタミン酸化について、神経細胞における形態制御の観点から機能の解明を試みた。この結果、特にグルタミン酸化の低下は頂上樹状突起におけるニューロフィラメント分布に異常をもたらすことを見出した。これらの解析に加え、神経細胞の種類に依存した形態制御機構についても解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Microtubules play central roles in the regulation of cellular morphology. It could receive region dependent regulation within the cell, which is especially important in the regulation of complicated neuronal cell shape. In this project, we investigated the role of two types of post-translational modifications of tubulins, tyrosination and polyglutamylation in the regulation of neuronal structure. Especially, we found that polyglutamylation regulate the dendritic distribution of neurofilaments. In addition to these tubulin modifications, we investigated the neuronal subtype dependent regulation of morphogenesis.

研究分野：神経化学

キーワード：微小管 翻訳後修飾 軸索 極性 樹状突起 チューブリン シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

微小管は、細胞内の構造・輸送の制御を介して細胞の形態制御において重要な役割を担っている。神経細胞の持つ複雑な形態を構築するためには、特異的な領域で微小管を介した機能が制御されることが重要である。この過程には、日本のグループを始めとする研究により、微小管結合タンパク質(MAP)や微小管モーター(キネシン、ダイニン)などが関わっていることが示唆されてきたが、特定の領域を標識することで位置情報を担う分子の実体は明らかにされていなかった。微小管は多様な修飾を受けることが以前から知られていたが、神経細胞における機能について十分な理解がなされてこなかった。最近、グルタミン酸化やアセチル化など微小管の翻訳後修飾に関わるいくつかの酵素が同定され、神経回路の形成・維持における役割について国内外で注目されている。申請者は、これまで神経回路形成を制御する細胞内在的な分子機構に着目して研究を行って来た。興味深い事に、これらの研究過程で軸索、樹状突起の伸長が、それぞれ異なった細胞内の分子ネットワークにより制御されることを見出した。これらのシグナルは何れも核内に作用することから、細胞内で特定の突起を標識する未知の機構と相互作用することにより細胞機能を調節すると考え、微小管を構成するチューブリンの翻訳後修飾の一つであるチロシン化が海馬神経細胞の極性形成時において軸索-樹状突起を識別する標識として機能することを発見し、微小管の機能制御が神経細胞の領域に依存した機能発現に関与する可能性を示した。グルタミン酸化など他の修飾や神経形態の制御シグナル因子との協調など細胞内システムの理解が今後の課題である。

2. 研究の目的

神経細胞内では多くのシグナル伝達因子と多様な微小管の制御、アクチンを介した制御など多くの因子が協調的に機能することで細胞の形態を調整すると考えられる。本研究課題では申請者の研究成果をさらに発展させ、複数の微小管修飾の機能制御と神経細胞の形態制御に関わる一連の分子ネットワークを明らかにすることを目的とする。微小管の修飾についてはチロシン化に加えてグルタミン酸化の神経細胞における形態制御の観点から解析を行い、その機能を明らかにする。これまでの研究で、グルタミン酸化酵素 TLL ファミリー因子群のノックアウトマウスを作成し、特に脳内でのチューブリン修飾に関わるサブタイプを同定しており、この神経細胞を解析することで、グルタミン酸化の機能を明らかにする。また、これまで報告されている極性確立に関与するシグナル伝達因子の活性を調節することで、微小管修飾と

の関連を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の方法

神経細胞の形態制御におけるチューブリンのグルタミン酸化の機能

これまでの解析で、チロシン化に加え微小管のグルタミン酸化も軸索と樹状突起で異なっており、両者を認識する標識として機能する可能性が明らかになってきた。グルタミン酸化酵素 TLL ファミリーのうち TLL1, TLL7 がそれぞれ脳におけるチューブリン alpha, beta グルタミン酸化に必要であることをノックアウトマウスの解析により示した。このマウスの脳組織をパラホルムアルデヒド水溶液で灌流固定後、凍結切片を作成し、免疫組織染色法により微小管修飾、微小管結合タンパク質等の神経突起を構成する因子の局在を野生型マウスのものと比較した。またゴルジ染色法により神経突起の分岐形態を観察し、野生型と遺伝子欠損型で差が検出されるか否かを検討した。さらに、パラホルムアルデヒド/グルタルアルデヒド、およびオスミウム酸で固定した脳組織から超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡により細胞内の微細構造を解析することで、神経細胞内におけるグルタミン酸化の機能を明らかにすることを試みた。

神経細胞種に依存したチューブリンチロシン化の解析

チューブリンの翻訳後修飾の一つであるチロシン化の神経細胞の形態制御における機能について詳細な解析を行った。すでに海馬神経細胞において軸索が形成される時期に神経極性の維持に関与することを示しているが、発生時期や神経細胞種に依存した機能を有するか否かについて解析を進めた。本解析では海馬錐体細胞とは異なった過程により形態形成を行う小脳顆粒神経細胞について解析を行った。小脳顆粒神経細胞は低密度での培養が難しいため、海馬神経細胞で用いられるサンドイッチ法を応用して効率よく小脳顆粒神経細胞の低密度培養が可能か否かを検討を行った。安定した低密度培養系を確立した後、細胞内のチロシン化の局在を解析した。解析には、培養後3日目程度の間もない幼弱な神経細胞と培養後1週間程度のより成熟した細胞を用い、発生時期に依存した微小管修飾の分布の変化を解析することで、神経細胞の非対称性が確立されるどの時期から機能するのか、成熟した細胞でも極性の維持に関与するのかについて解析した。

また、チロシン化酵素 TLL に対する siRNA を幼弱な小脳顆粒細胞ならびに成熟した小脳顆粒細胞に導入することで軸索の伸長およびその維持におけるチロシン化の機能を解析した。この解析により軸索維持におけるチューブリンチロシン化の機能が普遍的なものか否かを明らかにすることを試みた。

微小管の制御と協調的に機能する神経細胞形態制御因子の解析

これまで報告されている極性確立に関与するシグナル因子のうち LKB1 および GSK3 のキナーゼについて阻害剤およびノックダウンにより、下流での微小管チロシン化に変化が観察される否かを調べた。これらは極性形成の初期で機能しすると考えられる。LKB1 のノックアウトマウスは大脳皮質の層構造、軸索の異常を示し、チロシン化酵素 (TTL) のノックアウトマウスの表現型と類似点が見られる。また、GSK3 はその下流で微小管の機能を制御すると考えられており、微小管修飾を調節に関わる有力な因子であると考えられた。解析の過程で、海馬錐体細胞と小脳顆粒細胞において神経極性の制御因子の働きに違いがある可能性が生じた。これまで神経極性の解析の多くは海馬神経細胞を用いて行われていたため、特に GSK3 を標的として、小脳顆粒細胞の初代培養細胞を用いて極性形成およびその他の形態形成・維持における GSK3 の機能を詳細に解析し、海馬神経細胞における機能との相違点を解析した。

4. 研究成果

神経細胞の形態制御におけるチュプリンのグルタミン酸化の機能

グルタミン酸化酵素 TTL ファミリーのうち TTL1, TTL7 およびこれら両方を欠損したノックアウトマウスの脳組織を抗グルタミン酸化チュブリン抗体を用いた免疫組織染色法により解析した結果、TTL1, TTL7 の欠損により、大脳皮質の神経細胞内において、微小管を構成するチュプリンのグルタミン酸化が顕著に減少することを見いだした。一方で、脳の重量や大まかな構造には顕著な異常は認められなかった。TTL1, TTL7 両方を欠損したマウスにおいても、脳内のチュプリングルタミン酸化は、免疫組織染色およびウェスタンブロットティングの結果からある程度残存していると考えられ、他の TTL 因子が相補的に機能している可能性が示唆された。一方、大半のグルタミン酸化は消失したことから両者が脳内の神経細胞の alpha チュブリン、beta チュプリンのグルタミン酸化を担う主要な酵素であることが確認された。TTL1, TTL7 の欠損による大脳皮質神経細胞の顕著な形態異常は、ゴルジ染色においても観察できなかったため、透過型電子顕微鏡法により神経細胞内の微細構造を解析した。大脳皮質第 2/3 層の神経細胞を解析した結果、TTL1, TTL7 の欠失によりチュプリングルタミン酸化を抑制したマウスの神経細胞では、微小管の構造は保たれているものの、ニューロフィラメントが樹状突起内において少な

い傾向が見られ、定量的解析によりその本数が野生型に比較して有為に減少することが示された。これに対し、軸索でのニューロフィラメントの分布は正常であり、樹状突起でのみ異常が観察された。同様の観察は、抗ニューロフィラメント抗体を用いた免疫組織解析によっても確認され、TTL1, TTL7 を欠失した大脳皮質第 2/3 層の神経細胞では頂上樹状突起におけるニューロフィラメント染色の低下が観察された。また、TTL1, TTL7 単独の欠損では頂上樹状突起におけるニューロフィラメントの有意な減少は観察されなかった。これら大脳皮質第 2/3 層の神経細胞の形態学的な異常をさらに解析するため、同領域に見られるシナプス数、サイズ、シナプス小胞の数を定量的に解析したが、いずれにおいても遺伝子欠損マウスにおいて有意な差は見られなかった。一方、超薄切片における頂上樹状突起の断面の太さは TTL1, TTL7 の二重欠損マウスにおいて減少することが観察された。以上の観察から、TTL1, TTL7 は脳内の神経細胞において、alpha, beta チュプリンのグルタミン酸化を担うこと。これにより頂上樹状突起におけるニューロフィラメントの分布を維持することでその形態を調節することが示唆された。チュプリンのグルタミン酸化が如何にしてニューロフィラメント維持に寄与するかについても解析を進めたが、明確な結論には至っておらず、今後の課題である。

神経細胞種に依存したチュブリンチロシン化の解析

チュプリンのチロシン化については以前の研究により、海馬錐体細胞において軸索が形成される時期に神経極性の維持に関与することを示しているが、神経細胞の種類に依存せず、普遍的にこのような機能を有するかは不明である。このため、小脳顆粒神経細胞を用いて実験を行った。まず小脳顆粒細胞を低密度で培養するため、高密度の小脳顆粒細胞と低密度の細胞を向かい合わせに培養することで、低密度でも効率よく小脳顆粒細胞を生存させる新たな手法の確立に成功した。これにより単一細胞内において詳細に微小管の修飾や形態の解析することが可能となった。この系を用いて実験を行った結果、チロシン化は小脳顆粒細胞においても海馬錐体神経細胞と同様に細胞体や樹状突起に多く、軸索では脱チロシン化されたチュブリンが多く観察された。これは培養後 3 日に軸索を伸長し始めた細胞から既に見られ、1 週間ほどのより成熟した神経細胞でも継続して観察された。次にチロシン化酵素 TTL の siRNA を培養約 5 日の小脳顆粒細胞に導入し、軸索輸送や形態の解析を行った。キネシンのモーター領域と GFP の融合タンパク質を小脳顆粒細胞に発現させると、軸索に特異的に局在することが観察された。TTL の siRNA により、

樹状突起への再分配がおこることを予想したが、有意な軸索輸送極性の変化は観察されなかった。また、siRNA 導入 3 日後に固定し、樹状突起および軸索のマーカーである MAP2, および Tau-1 抗体で染色することで、神経細胞の形態における siRNA の影響を解析した。軸索の本数や長さについて対照群と比較して顕著な違いは見られなかった。これらの観察はチュプリンのチロシン化修飾が、アセチル化など他の微小管の制御と協調的に機能することで小脳顆粒細胞の極性維持に寄与する可能性を否定しないものの、海馬神経細胞と比較してその寄与は小さい可能性が考えられ、微小管の修飾を介した神経形態制御が発生時期や環境などの要因によって変化する可能性を示していると考えられる。

微小管の制御と協調的に機能する神経細胞形態制御因子の解析

神経極性の制御に重要な役割を担うことが報告されている GSK3 を抑制することで、下流における微小管修飾の変化を観察することを目的とし、GSK3 の阻害剤である LiCl および 6-Bromoindirubin-3'-oxime (BIO) を小脳顆粒細胞の培養直後に投与し、3 日間培養した。海馬神経細胞では阻害剤により複数の軸索が形成されるが、小脳顆粒細胞では極性への影響は観察されなかった。また、LiCl 5mM や BIO 1 μ m など阻害剤の濃度を上昇させることにより軸索の短縮が観察された。このことは神経極性制御における GSK3 の機能に細胞種特異性があることを示しており、当初の研究計画を変更し、この点を解析することにした。阻害剤の効果を確認するため、GSK3 の変異体を過剰発現した。この結果、阻害剤と同様に軸索の短縮が見られたものの、神経極性への直接的な影響は見られなかった。実際に海馬錐体細胞を用いた実験も並行して行った結果、海馬錐体細胞において複数の軸索を伸長が起こる濃度においても GSK3 阻害剤は小脳顆粒細胞において複数の軸索を生じさせることは無かった。また、海馬錐体細胞に比べ、小脳顆粒細胞の軸索の短縮はより低濃度の阻害剤によってもたらされることが明らかとなった。GSK3 と同様に神経極性形成において重要な役割を担っている LKB1 についても siRNA を用いた阻害実験を行い、小脳顆粒細胞での極性形成について顕著な影響が見られないことを観察した。しかし、抗体による内在的な LKB1 の検出に問題が残り、siRNA により実際に LKB1 の発現が十分に低下しているか否かについては課題が残る。

これまで哺乳類の神経細胞における極性制御の解析は主に海馬錐体細胞を用いた培養実験により進められ、これに関与する多くの因子が明らかになってきた。しかし、これらの因子が他の神経細胞においても同様の機能を示すかは明らかにされていない。本研

究課題において微小管の翻訳後修飾のチロシン化や GSK3 キナーゼの極性制御における機能が細胞により異なる可能性が示された。今後複数の因子について解析を進めることにより神経細胞の種類に依存した形態形成の機序が明らかになると期待される。

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 3 件)

Konishi Y. Cellular mechanisms for the axonal pattern formation: Initiation and branch morphogenesis. 査読有り, *Forma* 29:51-54 (2014)

Kubota K, Seno T, Konishi Y. A low-density culture method of cerebellar granule neurons with paracrine support applicable for the study of neuronal morphogenesis. 査読有り, *Brain Res.* 1539:15-23 (2013)

Yang HJ, Sugiura Y, Ikegami K, Konishi Y., Setou M. Axonal gradient of arachidonic acid containing phosphatidylcholine and its dependence on actin dynamics. 査読有り, *J Biol Chem.* 287:5290-5300 (2012)

[学会発表](計 9 件)

小西慶幸, 久保田健太, 衛藤拓也 神経細胞の形態形成における細胞種依存的な GSK-3 の機能. 第 36 回日本生物学的精神医学会/第 57 回日本神経化学学会大会. 9/29 奈良県文化会館(奈良県・奈良市) (2014)

久保田健太, 瀬野岳史, 小西慶幸 新しい低密度培養法を用いた小脳顆粒細胞における GSK3beta の機能解; Functional analysis of GSK3beta in cerebellar granule neurons by using new method of low-density culture. Neuro2013. 6/20-23 国立京都国際会館(京都府・京都市)(2013)

瀬野岳史, 久保田健太, 栄成美, 小西慶幸 小脳顆粒細胞の極性形成における分子ネットワークの解析. Molecular network analysis of neuronal polarity in cerebellar granule neurons. Neuro2013. 6/20-23 国立京都国際会館(京都府・京都市)(2013)

Konishi Y. Spatial cell signaling mediated by microtubule regulations

contributes to the maintenance of neuronal morphology. the 11th biennial meeting of APSN and the 55th annual meeting of JSN. 9/30-10/2 Kobe International house (Kobe, Kobe, Japan)(2012)

小西慶幸 神経細胞の形づくりの機構 - 分子細胞生物学的視点から. 形の科学会招待講演 6/15-17 福井大学 福井県・福井市)(2012)

瀬野岳史、久保田健太、小西慶幸 小脳顆粒細胞の極性形成・維持における分子ネットワークの解析. 第5回神経発生討論会 3/17-18 福井県県民ホール 福井県・福井市)(2012)

Ohata K, Konishi Y, Tsuchiya R, Ikegami K, Setou M. Tubulin polyglutamylation regulates cytoskeletal distribution in brain. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会 03/26-28 山梨大学 山梨県・甲府市)(2012)

Ohata K, Konishi Y, Tsuchiya R, Ikegami K, Setou M The Role of Polyglutamylation on the Regulation of Neuronal Cytoskeleton. 51st ASCB 12/3-7 (Denver, USA) (2011)

小西慶幸 軸索形態制御に関わる翻訳後修飾を介した細胞内分子機構: 軸索伸長および軸索識別についての研究. 第54回日本神経化学会大会シンポジウム 9/26-28 山代温泉瑠璃光(石川県・加賀市)(2011)

〔その他〕

ホームページ等

https://sites.google.com/site/konishila_bneuron

<http://kou25hp.eng.u-fukui.ac.jp/his/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小西 慶幸 (KONISHI Yoshiyuki)

福井大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 00382838