

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500452

研究課題名(和文)新規軸索ガイダンス分子 LOTUS の生物学的機能の解析

研究課題名(英文)Biological functional analysis of novel axon guidance molecule LOTUS

研究代表者

竹居 光太郎 (Takei, Kohtaro)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：40202163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000 円、(間接経費) 1,110,000 円

研究成果の概要(和文)：マウス胎仔の嗅索において、LOTUS-KOマウスでは軸索側枝が増加したのに対し、NgR1-KOマウスでは逆に減少し、更にそれらのダブル-KOマウスではNgR1-KOマウスのレベルまで減少することが示され、Nogo-NgR1の作用によって嗅索の軸索側枝が形成が促進されると考えられた。

一方、LOTUS-KOマウスでは歯状回内部の錐体細胞のdoublecortin陽性移動細胞が有意に多く存在していることが判明し、LOTUSは当該細胞の細胞移動に関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In developing lateral olfactory tract (LOT) in mouse embryos, axonal branch was increased in LOTUS-deficient mice, whereas the axonal branch was decreased in NgR1-deficient mice. Furthermore, the axonal branch was also decreased in their double knocking-out mice, suggesting that Nogo-NgR1 interaction may induce axonal branching of LOT.

On the other hand, doublecortin-positive migrating pyramidal neurons were found in inside area of dentate gyrus of hippocampus in LOTUS-deficient mice when compared with the wild type mice, suggesting that LOTUS may be involved in neuronal migration in developing hippocampus

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：神経回路形成 神経発生 軸索伸長 神経再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 新規軸索ガイダンス分子 LOTUS の発見：申請者は、マウスの嗅球から大脳嗅覚野への神経投射路である嗅索 (Lateral olfactory tract: LOT) の形成に関わる機能分子を探索する目的で、光照射分子不活性化 (FALI) 法をマウス終脳器官培養系に適用して機能的スクリーニングを行った。特定分子を FALI 法によって機能阻害したところ、LOT の神経束がバラバラに脱束化する異常表現型を見出し、LOT 形成に重要な新規軸索ガイダンス分子として LOT usher substance (LOTUS) と命名した。

(2) LOTUS ノックアウトマウスにおける LOT 形成異常：胎生期の LOTUS-ノックアウト (LOTUS-KO) マウスの嗅球に軸索トレーサーを注入し、LOT を蛍光色素で可視化して解析したところ、著しい LOT の脱束化が認められ、LOTUS は LOT の神経束形成に重要な機能分子であることが判明した (Sato et al., 2011)。

(3) LOTUS 結合分子の同定：LOTUS は細胞内ドメインをほとんど持たない細胞膜分子であることから、生理機能を発するには細胞膜上の他の分子との相互作用が必要であると考えられた。そこで、アルカリフォスファターゼ (AP) を融合させた AP-LOTUS を作製し、胎生 14 日目のマウス終脳における結合部位 (LOTUS 結合分子の発現部位) を検討したところ、AP-LOTUS は LOT 上に強く結合し、LOT の細胞膜上に LOTUS の結合分子が存在すると考えられた。そこで、前出の嗅球の発現遺伝子ライブラリーを用いて当該分子を検索し、LOTUS の結合分子として Nogo 受容体 (NgR1) を同定した。NgR1 は、ミエリン由来の 3 種の神経再生阻害因子 (Nogo, MAG, Omgp) に共通する受容体で、それらリガンドとの結合によって神経突起伸長を阻害し、中枢神経系の再生を困難にする主要原因を担うことがよく知られている。

(4) 内在性 Nogo アンタゴニストとしての機能：LOTUS は NgR1 と結合することから、COS7 細胞に LOTUS および NgR1 を共発現させて Nogo と NgR1 の結合を検討したところ、ほぼ完全にその結合が阻害された。更に、NgR1 が発現し、LOTUS の発現が認められない鶏卵胚後根神経節 (DRG) 細胞の成長円錐は Nogo の添加によって退縮 (コラプス) するが、そこに LOTUS を強制発現させると Nogo による成長円錐退縮は完全に抑制された。次に、マウス嗅球ニューロンは LOTUS と NgR1 の双方を発現するため、培養嗅球ニューロンの成長円錐は Nogo による退縮反応を示さなかったが、LOTUS-KO マウスの培養嗅球ニューロンの成長円錐は Nogo によって退縮することが判明した。以上から、LOTUS は内在性の Nogo アンタゴニストであると結論された (Sato, et al., 2011)。

LOT 上には LOTUS や NgR1 に加え、NgR1 のリガンド Nogo も発現する。従って、LOTUS-KO マウスの LOT の脱束化は、Nogo と NgR1 が結合することによって軸索同士が反発し合って起こるものと推察され、野生型マウスの LOT は LOTUS の発現によって Nogo による脱束化を防いで形成されるという今迄にない新しい機構を提唱するに至った。

2. 研究の目的

胎生期マウスの LOT 上には LOTUS と NgR1、および NgR1 のリガンド Nogo が発現している。前述のように、LOTUS は Nogo に対して拮抗作用を示し、LOTUS-KO マウスでは LOT の著しい脱束化が見られた。本研究では、ノックアウトマウスを用い、生体における LOTUS の Nogo 拮抗作用と神経突起伸長作用の生物学的意義を明らかにする。

(1) 嗅索形成における LOTUS による NgR1 に対する拮抗作用：以下の作業仮説を証明する実験研究を行う。① NgR1-KO マウスでは、

Nogoの作用が入らないためLOTの脱束化は認められず、LOTはほぼ正常な軸索走行を示す。②LOUTS-NgR1-ダブルKOマウスでは、Nogoの作用が入らないためLOTUS-KOマウスで見られたLOTの脱束化がレスキューされる。これら双方が示されれば、LOTUSはNgR1・Nogo結合を阻害してLOT束化に寄与することが証明される。

(2) 神経突起伸長作用: 前述のように、NgR1はNogo, MAG, Omgpといった3種の神経再生阻害因子の共通の受容体として知られていたが、近年、それらの受容体として新たにpaired immunoglobulin-like receptor-B (PirB)が同定された(Atwal, et al., 2008)。そこで、COS7細胞においてLOTUSとPirBの結合性を調べたところ、LOTUSはPirBとも相互作用を示し、NgR1以外のLOTUS結合分子としてPirBを同定した。胎生期マウスの網膜神経節細胞(RGC)はPirBを発現している。NgR1-KOマウスの培養RGCは培養液に添加した外来性のLOTUSと結合を示す。このことは、RGCには少なくともPirBを含むNgR1以外のLOTUS結合分子が発現していることを示す。本研究では、LOTUS-PirB結合による神経突起伸長作用の有無を明らかにする。

(3) 神経再生能: 上記の発生期にみられるLOTUSのNogo拮抗作用と神経突起伸長作用は、双方とも神経再生を促進する効果を持つと期待される。野生型の脊髄損傷モデルマウスでは、損傷後約1ヶ月で或る程度の機能再建を示すようになる。LOTUS-KOマウスにおいて脊髄損傷モデルを作製し、野生型に比して機能回復が遅延するか否かを解析し、LOTUSの神経再生における適用意義を検討する。

3. 研究の方法

(1) 嗅索形成におけるLOTUSによるNgR1に対する拮抗作用: 胎生期のNgR1-KOマウス、およびLOTUS・NgR1のダブルKOマウスを用い、嗅球に脂溶性蛍光色素DiIを注入してLOTを可視化し、LOTの軸索走行における表現型を詳しく解析する。これによって、LOTUSとNgR1の相互作用(NgR1に対する拮抗作用)のLOT形成における生物学的意義を明らかにする。

(2) 神経突起伸長作用: LOTUSの神経突起伸長作用においては、LOTUSを培養基質としてマウスの網膜神経節細胞を培養し、LOTUSとPirBの結合を完全に阻害するPirB機能阻害抗体を添加し、PirBがLOTUS結合分子として神経突起伸長作用を媒介するか否かについて検討する。

(3) 神経再生能: LOTUSのNogo拮抗作用と神経突起伸長作用が神経再生に奏効するかを検討する目的で、LOTUS-KOマウスにおける脊髄損傷モデルを作製し、野生型の機能回復度と組織学的・行動学的に比較する。

4. 研究成果

4. 研究成果

(1) 嗅索形成におけるLOTUSによるNgR1に対する拮抗作用: LOTUS-KOマウスでは嗅索の脱束化を示した(図1)。これは、LOTUSの欠損によって嗅索の軸索上に発現するNogoによる反発性シグナルがNgR1に受容されるようになり、嗅索の軸索は周囲の軸索を避ける方向(本来の軸索の東の外側)に伸長したために結果的に神経束がバラバ

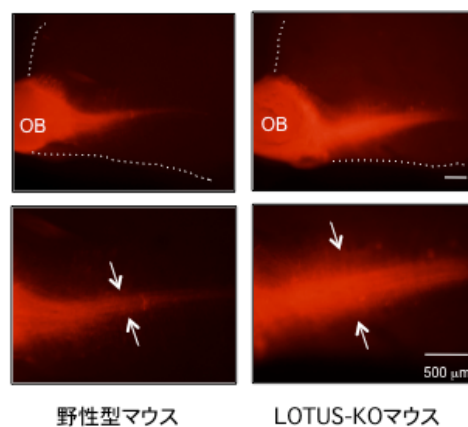


図1 LOTUS-KOマウスにおける嗅索形成異常

ラになったと考えられた。その傍証の一つとして、マウス嗅球の細胞塊を培養すると、野性型では嗅球ニューロンの軸索は束化しながら伸長する様子が観察されるのに対し、**LOTUS-KO** マウスの嗅球ニューロンの軸索は脱束化していた。これらのことから、**Nogo** のような軸索伸長阻害因子が周囲に多く存在すると成長円錐崩壊が起きて軸索はどの方向にも伸長できないが、阻害因子が局在しているような場合はそれを避けるように伸長すると考えられた。ところが、**NgR1-KO** マウスでは **LOT** 形成はほぼ正常であった。そして、**LOTUS** と **NgR1** の二重欠損マウス (**ダブル-KO** マウス) を作製して同様に解析したところ、**LOTUS-KO** で見られた **LOT** の脱束化はほぼ正常に近いレベルまでレスキューされていた (図 2)。これらの結果は、**LOTUS** は嗅索上で **NgR1** と結合することで **NgR1** と **Nogo** との結合を抑制して **LOT** 形成

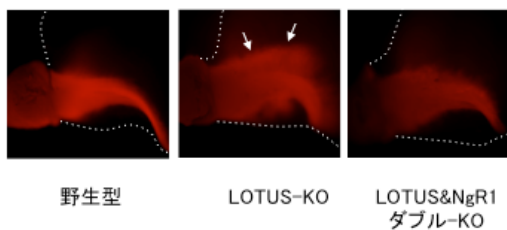


図2 LOTUS&NgR1-ダブルKOマウスにおける嗅索形成

に寄与していることを明確に示す。

(2) 神経突起伸長作用 : **LOTUS** と **PirB** は相互作用を示す(図 3)。この **LOTUS** と **PirB** の結合を完全に阻害するモノクローナル抗体を得た。培養網膜神経節細胞は精製 **LOTUS** タンパク質をコートした基質上で顕著な突起伸長活性を示すが、その培養液中に

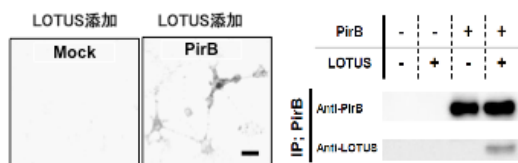


図3 LOTUSとPirBの結合

(A) COS7細胞に強制発現させたPirBに対する精製LOTUSの結合試験。 Scale bar, 50 μm.

(B) PirBのLOTUSとの免疫共沈降実験。

上記相互作用を阻害する濃度で抗 **PirB** 抗体を添加したところ、顕著な突起伸長活性は抑制されなかった。このことは、**LOTUS** と **PirB** の相互作用によって網膜神経節細胞の突起伸長が誘起されるわけではないことを示し、**PirB** 以外の **LOTUS** 結合分子が存在することを示唆する。現在、当該分子を免疫沈降法によって解析中である。

(3) 神経再生能 : 胸椎 7-8 位の背側半切断による脊髄損傷モデル動物を作製し、経時的に運動機能の回復を **BBB** スコアリングによって解析したところ、**LOTUS-KO** マウスにおいては齧歯類が有する自然神経再生能が野性型に比して著しく減弱していた (図 4)。これは、齧歯類が示す自然神経再生能に内在

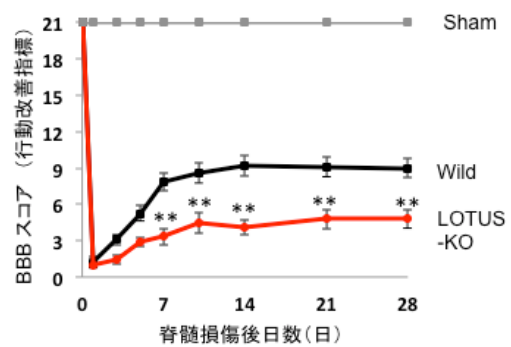


図4 LOTUS-KOにおける脊髄損傷後の運動機能評価

野性型では損傷後5日後頃から徐々に運動機能(BBBスコア)の回復が見られるのに対し、**LOTUS-KO**では、野性型に比して顕著に運動機能の回復が遅滞した(n>8)。

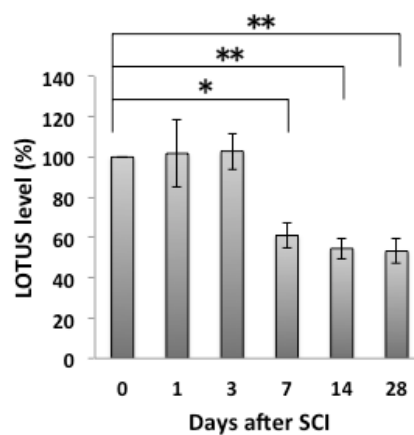


図5 脊髄損傷後のLOTUS発現変動

性 **LOTUS** が深く関わることを強く示唆する。

脊髄損傷時から経時的に患部周辺の LOTUS の発現量についてウエスタンブロッティング法で調べたところ、損傷 7 日目以降に LOTUS が減少していた (図 5)。歩行運動の行動指標 (BBB スコア) では、野生型マウスは損傷後 7 日目以降に自然回復能が減少した (図 4)。これと LOTUS の発現減少との間に相関性が見られることから、LOTUS の発現維持が神経再生能と関連すると考えられた。組織学的解析では、LOTUS-KO マウスの損傷部より尾側の神経線維は、野生型に比べて減少することが明らかになった (図 6)。以上のことから、LOTUS が神経再生能を有すると考えられた。

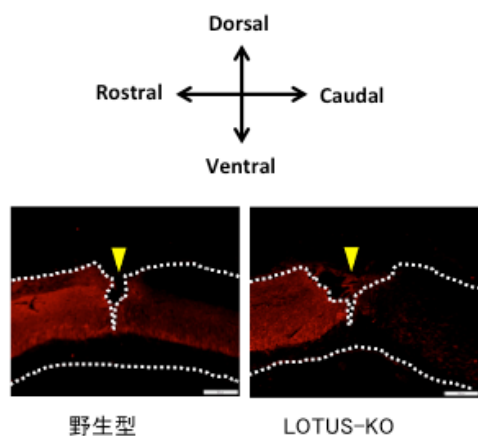


図6 脊髄損傷後のセロトニン陽性神経線維

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Yamashita, N., Usui, H., Nakamura, F., Chen, S., Sasaki, Y., Hida, T., Suto, F., Taniguchi, M., Takei, K., Goshima, Y. PlexinA4-dependent retrograde Semaphorin3A signaling regulates the dendritic localization of GluA2-containing AMPA receptors. *Nature Communications*, 5: 3424 DOI: 10.1038/ncomms4424 (2014) 査読有.
- ② Iketani, M., Iizuka, A., Sengoku, K.,

Kurihara, Y., Nakamura, F., Sasaki, Y., Sato, Y., Yamane, M., Matsuhita, M., Nairn, A.C., Takamatsu, K., Goshima, Y., Takei, K. Regulation of neurite outgrowth mediated by localized phosphorylation of protein translational factor eEF2 in growth cones. *Developmental Neurobiology*, 73(3): 230-246 (DOI 10.1002/dneu.22058) (2012) 査読有.

- ③ Higurashi, M., Iketani, M., Takei, K., Yamashita, N., Aoki, R., Kawahara, N., Goshima, Y. Localized role of CRMP1 and CRMP2 in neurite outgrowth and growth cone steering. *Developmental Neurobiology*, 72: 1528-1540 (DOI 10.1002/dneu.22017) (2012) 査読有.

- ④ Kurihara, Y., Arie, Y., Iketani, M., Ito, H., Nishiyama, K., Sato, Y., Nakamura, F., Mizuki, N., Goshima, Y., Takei, K. The carboxyl-terminal region of Crtac1b/LOTUS acts as a functional domain in endogenous antagonism to Nogo receptor-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418 : 390-395 (2012) (URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X12000563>) 査読有.

- ⑤ Sato, Y., Iketani, M., Kurihara, Y., Yamaguchi, M., Yamashita, N., Nakamura, F., Arie, Y., Kawasaki, T., Hirata, T., Abe, T., Kiyonari, H., Strittmatter, S.M., Goshima, Y., and Takei, K. Cartilage acidic protein-1B (LOTUS), an endogenous Nogo receptor antagonist for axon tract formation. *Science*, 333 : 769-773 (DOI:10.1126/science.1204144) (2011) 査読有.

〔学会発表〕（計 5 件）

① 竹居光太郎（2013）神経系の発生と再生における内在性 Nogo 受容体アンタゴニスト LOTUS の機能，第 36 回日本神経科学学会・第 56 回日本神経化学学会・第 23 回日本神経回路学会合同大会 (Neuro2013)，招待講演，平成 25 年 6 月 20 日，国立京都国際会館（京都府京都市）。

② 竹居光太郎（2012）内在性 Nogo 受容体アンタゴニスト LOTUS による神経突起伸長制御，第 35 回日本神経科学学会，招待講演，平成 24 年 9 月 18 日，名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）。

③ 竹居光太郎（2012）新規の神経回路形成分子 LOTUS の発見：Nogo 受容体拮抗作用による神経束形成，第 189 回つくばブレインサイエンスセミナー，招待講演，平成 24 年 1 月 17 日，筑波大学（茨城県つくば市）。

④ Takei, K. (2011) Identification of an endogenous Nogo receptor antagonist by light-mediated functional screening method. The 11th Japan-China Histochemistry and Cytochemistry Joint Meeting. invited talk, 平成 23 年 10 月 22 日，首都医科大学, Beijing (北京市), China (中華人民共和国)。

⑤ 竹居光太郎（2011）光分子不活性化技術の適用，第 67 回日本顕微鏡学会，企画シンポジウム「分子細胞化学的方法論の” The state of the art”」，招待講演，平成 23 年 5 月 16 日，福岡講師会議場（福岡県福岡市）。

〔図書〕（計 0 件）

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：中枢神経障害の診断マーカー

発明者：竹居光太郎，高橋慶太，五嶋良郎，鈴木ゆめ

権利者：公立大学法人 横浜市立大学

種類：特許

番号：特願 2012-256701

出願年月日：平成 24 年 11 月 22 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：神経突起伸長制御タンパク質

発明者：竹居光太郎，佐藤泰史，五嶋良郎，中村史雄

権利者：公立大学法人 横浜市立大学

種類：特許

番号：特許第 5019206 号

取得年月日：平成 24 年 6 月 22 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹居 光太郎 (Takei, Kohtarō)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：40202163

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

五嶋 良郎 (Goshima, Yoshio)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：00153750