

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650168

研究課題名（和文） 神経極性の安定化および維持の分子メカニズムの解析

研究課題名（英文） Analysis of the molecular mechanisms to ensure the robustness of neuronal polarity

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

研究成果の概要（和文）：本研究では、神経極性の安定化・維持の分子メカニズムを解析するために、神経極性安定化に関与する Singar1 と相互作用する Rab33a の機能解析を行った。その結果、Rab33a が、細胞体で合成された細胞膜成分の軸索先端への輸送と供給を担うことによって、軸索の伸長と形成に関わることを証明した。今回の発見は、これまでに知られていなかった軸索を伸ばすために細胞膜を広げる仕組みに光を当てることとなった。Singar1 と Rab33a の機能的関係は今後の研究課題である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analysed the functions of Rab33a which directly interact with Singar1; singar1 is involved in the robustness of neuronal polarity. Our data suggest that Rab33a mediates the anterograde axonal transport of post-Golgi synaptophysin-positive vesicles, thereby contributing to membrane insertion at the growth cones and to axon outgrowth. The functional relationship between Singar1 and Rab33a is an important issue for future studies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：脳・神経、発生・分化、神経科学、軸索輸送、細胞骨格、バレル構造

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は1本の軸索と複数の樹状突起を形成して極性を獲得する。神経極性は、神経細胞のシグナルの入出力や統合、ひいては脳の活動に必須である。最近の研究から、Shootin1 や PI 3-kinase、PAR3/6、GSK-3 β 、CRMP-2 といった分子群の細胞内におけるシグナルの非対称性が神経細胞の極性形成に寄与することが明らかとなりつつある。しかしながら、脳内神経細胞が極性形成の過程でいかにして1本だけの軸索を形成しそれを維持することができるのか、その分子機構は

不明であった。

これまでの研究で、我々は、新規の脳特異タンパク質 Singar1 を見出した (Mori et al *J Biol Chem* 282, 19884, 2007)。興味深いことに、培養海馬神経細胞の Singar1 を RNAi で発現抑制すると過剰な軸索が形成された。一方、我々は Shootin1 を神経細胞に過剰発現すると過剰軸索が形成されることを見出しているが (Toriyama et al *J Cell Biol* 175, 147, 2006)、Singar1 は Shootin1 過剰発現による過剰軸索の形成を抑制した。さらに我々は、Singar1 が Rab33a と直接相互作用をすることを明らかにした。活性型 Rab33a を過剰発現させると

過剰軸索が形成されたことから、Rab33a が Singar1 による過剰軸索の形成の抑制に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、以上のこれまでの研究成果を発展させて、Singar1 の脳内における過剰軸索の形成抑制作用とその分子メカニズムの解明を行った。具体的には、Singar1 の機能の分子機構の解明のために、Singar1 の Rab33a に対する作用と Rab33a の機能解析を解析した。また、Singar1 の KO マウスの脳内における神経細胞の形態異常を解析した。

3. 研究の方法

実験材料として、胎生 18 日のラット海馬より調製した培養神経細胞を用いた。ラット培養海馬神経細胞は軸索と樹状突起がよく発達しており、また比較的均一な細胞が得られるため、軸索形成の研究に適している。海馬神経細胞への遺伝子導入は Nucleofector (Lonza) を用いて行った。神経細胞の抗体染色は、以前に報告した手法(Mori et al *J Biol Chem* 282, 19884, 2007)に基づいておこなった。染色した細胞の顕微鏡観察は Carl Zeiss および Olympus の蛍光顕微鏡を用いて行った。また、神経細胞内における EGFP- Rab33a や RFP-synaptophysin といった蛍光タンパク質を融合させた分子のライブイメージングは、全反射顕微鏡と、共焦点顕微鏡を用いて行った。

マウス脳の構造解析は、クリオスタットを用いて凍結脳切片を作成し、その後、ニッスル染色あるいは CO 染色をして行った。

4. 研究成果

(1) Singar1 結合タンパク質 Rab33a の機能解析

i) Rab33a は軸索形成時期に発現が上昇する。まず初めに、ラット脳の発達に伴う Rab33a の発現量の推移をイムノプロットにより解析した。その結果、Rab33a は胎生期から発現が認められ、神経突起伸長が盛んな胎生 18 日目で最も高い発現量を示した。同様に、培養海馬神経細胞の軸索形成に伴う Rab33a の発現量の変化を調べた結果、軸索形成に伴って Rab33a の発現量の上昇が認められた。以上の結果より、Rab33a は神経細胞が軸索の伸長が盛んな時期に発現が上昇することが解った。

ii) Rab33a はゴルジ装置から軸索先端に至る

膜成分の輸送経路に沿って分布する

次に、培養海馬神経細胞内における内在性 Rab33a の局在を解析するために、抗 Rab33a 抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、Rab33a はゴルジ装置のマーカータンパク質である Giantin、GM130、adaptin、TGN38 と共局在することが解った。また、Rab33a は Golgi 装置由来の小胞上の膜タンパク質である synaptophysin と共局在した。一方、Rab4、Rab5、Rab7、Rab8、Rab9、Rab10、Rab11 といったエンドソーム上に局在するタンパク質と Rab33a との共局在は認められなかった。また、軸索先端の成長円錐に存在する数多くの小胞にも局在していた (図 1)。

また、EGFP-Rab33a と RFP-synaptophysin を発現させた神経細胞のライブイメージングを行ったところ、Rab33a が synaptophysin 陽性小胞とともに軸索を順行輸送される像が観察された。以上の結果から、Rab33a が synaptophysin 陽性の小胞のうち、エンドサイトーシス後の小胞ではなく、小胞体・ゴルジ装置で合成されて軸索先端の細胞膜へ輸送される小胞に局在することが明らかとなった。

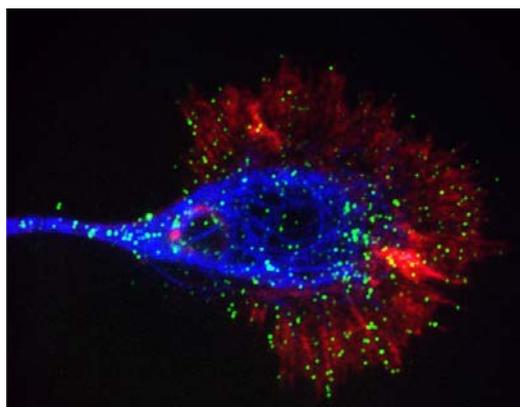


図 1 軸索先端の成長円錐に局在する Rab33a 陽性の小胞 (緑)。アクチン線維を赤で微小管を青でそれぞれ示す。

iii) Rab33a は順行性輸送に関与する

次に、Rab33a が小胞輸送へ関与するかを調べるために、Rab33a を発現抑制させた神経細胞内に RFP-synaptophysin を発現させ、synaptophysin 陽性小胞の動きを解析した。その結果、Rab33a を発現抑制させた神経細胞では、軸索先端へ順行性に輸送される synaptophysin 陽性の数とその輸送速度が有意に減少することが解った。また、Rab33a を発現抑制させた神経細胞の軸索先端では synaptophysin 陽性小胞の数が減少していた。以上の結果から、Rab33a がゴルジ装置由来の synaptophysin 陽性の小胞の軸索内の順行性輸送に関与することが示唆された。

iv) Rab33a は軸索先端における synaptophysin 陽性小胞の膜供給に関与する

次に、Rab33a が軸索先端における膜の供給に関与するかを調べるために、神経細胞に、細胞膜に挿入されると蛍光を発するように改変させた GFP を付加した synaptophysin (sypHy) を発現させて、軸索先端の成長円錐における細胞膜に融合した小胞の数を測定した。コントロールの細胞では成長円錐の広い領域で小胞の細胞膜への融合が観察され、特にアクチン線維に富む P-ドメインと微小管に富む C-ドメインの境界領域で膜融合が多く見られた。一方、Rab33a を発現抑制させた神経細胞では、コントロールと比較して成長円錐で観察される膜融合のイベントが有意に減少した。以上の結果より、Rab33a が軸索先端における synaptophysin 陽性小胞の膜供給に関与する可能性が示唆された。

v) Rab33a は軸索の形成に関与する

最後に、Rab33a が神経細胞の形態形成に影響を及ぼすかを、Rab33a を発現抑制、もしくは過剰発現させた神経細胞の形態を観察した。その結果、Rab33a を発現抑制させた細胞では、軸索をもつ細胞の割合が有意に減少し、突起の長さも短くなっていた。一方、Rab33a を過剰発現させた神経細胞では、過剰な軸索をもつ細胞の割合が有意に増加した。これらの結果より、Rab33a は軸索の形成に関与する可能性が示唆された。

以上の結果より、神経細胞内において Rab33a は、ゴルジ装置から突起先端への順行性輸送を制御することによって、軸索の伸長や形成に関わる分子である可能性が示唆された (図 2)。

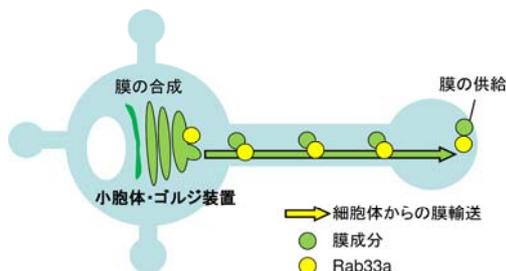


図 2 神経細胞が軸索を伸ばすために細胞膜を広げるしくみ。Rab33a は、細胞体の小胞体とゴルジ装置で新たに合成された膜成分を軸索先端へ輸送し軸索先端の細胞膜に膜成分を供給することで、軸索の細胞膜を広げてその形成と伸長を引き起こす。

(2) Singar のノックアウトマウスの解析 :

Singar のノックアウトマウス脳内における神経細胞の形態異常を解析した。興味深いことに、Singar のノックアウトマウスは、生後、1

日ほどで死亡する。そこで、生後、1日目の脳をニッスル染色で調べたところ、マクロの脳構造や神経核の構造に目立った異常は認められなかった。そこで脳のバレル構造の解析に適した CO 染色で解析した。バレル構造は、げっ歯類のヒゲからの体性感覚を情報処理する機能モジュールであり、細胞体と樹状突起、軸索が整然とした特徴ある構造を構築する。興味深いことに、Singar のノックアウトマウスでは、脳幹のバレル構造に該当する Barrelettes の形成が認められなかった。以上の結果から、Singar は脳内における樹状突起の配列や、神経細胞の配列形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

(3) 考察

本研究により、これまでに知られていなかった軸索を伸ばすために細胞膜を広げる仕組みに光を当てるといふ、当初予想していなかった興味深い研究成果が得られた。本研究で解明を目指した Singar による神経極性の安定化・維持のメカニズムに関してはまだ明確な答えが得られていないが、Singar が Rab33a の働きを阻害することにより不必要な軸索の形成を抑制して神経極性の安定化に寄与する可能性が考えられる。つまり軸索以外の突起で Rab33a による膜供給が抑制されて、過剰な軸索ができない可能性が想定される。今後、Singar と Rab33a も機能的関係を解析することによってこの点を明らかにしてゆきたい。

また、Singar ノックアウトマウスでは興味深いことに脳幹における Barrelettes の形成不全がみられた。バレル構造は樹状突起および軸索、細胞体が整然とした特徴ある構造を構築する。Singar と Rab33a が、極性の安定化を含む神経細胞の形態形成に深く関与することが予想され、今後、脳組織における Singar と Rab33a のさらなる機能解析を行ってゆきたい。

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)

- 1) Nakazawa, H., Sada, T., Toriyama, M., Tago, K., Sugiura, T., Fukuda, M. and Inagaki, N., Rab33a mediates anterograde vesicular transport for membrane exocytosis and axon outgrowth, *J. Neurosci.* 32, 12712–12725 (2012).

[学会発表] (計 3 件)

- 1) Nakazawa, H., Sada, T., Toriyama, M., Tago,

K., Sugiura, T., Fukuda, M., and Inagaki, N., Rab33a stimulates vesicular trafficking and promotes 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28日、神戸。

- 2) Nakazawa, H., Sada, T., Toriyama, M., Tago, K., Fukuda, M., and Inagaki, N., Rab33a stimulates vesicular trafficking and promotes axon outgrowth, 2011 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, December 6, 2011, Denver, USA.
- 3) Nakazawa, H., Sada, T., Toriyama, M., Tago, K., Sugiura, T., Fukuda, M., and Inagaki, N., Rab33a interacts with singar1 and promotes axon formation, 第63回日本細胞生物学会大会、2011年6月27日、札幌。

〔図書〕(計1件)

- 1) 稲垣直之, ニューロンの極性を担う細胞内シグナル経路, 脳の発生学(宮田卓樹, 山本亘彦 編), 化学同人, 印刷中(2013)。

〔産業財産権〕

○取得状況(計1件)

名称: Singar の発現または機能の抑制による神経軸索の形成・伸長と神経再生への応用
発明者: 稲垣直之, 森達也, 小原収, 長瀬隆弘

権利者: 奈良先端科学技術大学院大学, かずさDNA研究所

種類: 特許登録

番号: 特許第4952944号

取得年月日: 2012年3月23日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

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

新聞報道

- 1) 毎日新聞(2012年9月12日夕刊8面)
脳の軸索伸長に必須物質 奈良先端科技大
- 2) 産経新聞(2012年9月12日夕刊8面)
神経伸びる仕組み解明 奈良先端大チーム
- 3) 奈良新聞(2012年9月13日) 軸索伸ばす仕組み解明 再生医療に応用も先端大ラットで
- 4) 日刊工業新聞(2012年9月13日21面)
脳神経活動を解明 細胞膜ネット形成 関与タンパク質特定 奈良先端大

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) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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

作村 諭一 (SAKUMURA YUICHI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任准教授
研究者番号: 50324968