

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700463

研究課題名(和文)セブチン複合体の分子作用機構解析

研究課題名(英文)Mode of action of Septin-molecular complex

研究代表者

篠田 友靖 (Shinoda, Tomoyasu)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80505652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では大脳皮質形成時の神経細胞遊走を解析モデルとして精神・神経疾患関連分子であるSeptinファミリー分子の作用機序解明を遂行した。1)生化学的手法による分子機能検証、2)分散培養および大脳皮質内の神経細胞の動態・形態観察というふたつの手法にて検証した結果、Septinファミリー分子の一部がヘテロダイマーを形成し、異なる機能を持つふたつのF-actin結合タンパク質、cofilin-1およびdrebrin-1の「足場」として機能することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Septins are a family of conserved GTP/GDP-binding proteins implicated in a variety of cellular functions such as cell cycle control and cytokinesis. We performed a screening to identify interacting molecules for Sept4 and Sept14. By using a method combining affinity column chromatography with shotgun liquid chromatography tandem mass spectrometry, we obtained several candidates including Drebrin-1 and Cofilin-1, regulator proteins of actin cytoskeleton. As it was previously reported that Cofilin-1 is involved in cortical neuronal migration, we examined the functional involvement of Drebrin-1 for neuronal migration. Knockdown experiments by in utero electroporation showed that reduction of Drebrin-1 caused inhibition of neuronal migration. Biochemical analyses revealed the direct interaction between Sept4 and Drebrin-1, Sept14 and Cofilin-1, respectively. These results suggest that Sept4-Sept14 complex involved in neuronal migration by regulating the dynamics of actin cytoskeleton.

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：神経発生 大脳皮質形成

1. 研究開始当初の背景

Septinは真核細胞生物において高度に保存されているGTP結合タンパク群である。哺乳動物では14種のSeptin (Sept1~Sept14)が存在しており、分子ファミリーを形成している。SeptinのGTP結合領域は、低分子量GTP結合タンパクであるRasおよびRhoと高い相同性を示すが、(1)GTP水解放活性がない、もしくは著しく低い、(2)エフェクター領域が存在しない、といった特徴を有しており、従来のGTP結合タンパクとは異なる分子作用メカニズムを持つことが予想される。生理条件下においてSeptinは多量体を形成して繊維状の構造をとり種々の細胞質タンパクと相互作用することで細胞骨格系の制御に関与すると考えられている (Barral and Kinoshita, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2008)。また遺伝学的解析から、線虫*C. elegans*のSeptin変異体 (unc-59, unc-61)において特定の神経軸索の走行異常が報告されている (Ngyuen et al., *J. Cell Sci.*, 2003)。また近年の研究でSeptinが神経/精神疾患の病態に関与する可能性が示唆されており、臨床的にも注目されている。例えば、(1)ダウン症患者脳組織において複数のSeptinの発現上昇/減少、(2)パーキンソン病患者脳組織におけるレビー小体へのSept4の集積 (Ihara et al., *J. Biol. Chem.*, 2003)、(3)アルツハイマー症候群患者脳組織でのSept1, Sept2, Sept4の異常集積 (Kinoshita et al., *Am. J. Pathol.*, 1998)、(4) Sept9のアミノ酸置換を伴う点突然変異が末梢神経障害のひとつである遺伝性神経痛性筋萎縮症 (HNA)の原因遺伝子である (Kuhlenbaumer et al., *Nat. Genetics*, 2005)といった報告がなされている。このようにSeptinが神経系形成、神経機能獲得に深く関与する可能性は示唆されるものの、具体的な機能およびその作用メカニズム、更に各Septin分子の機能特異性は現時点で殆ど解明されていないかった。

2. 研究の目的

上記の背景をふまえ、申請者は神経発生の観点から、種々の神経発達段階におけるSeptinの蛋白質発現を包括的に解析した。7種類のSeptin (Sept6, Sept7, Sept8, Sept9, Sept11, Sept12, Sept14)に対する特異抗体を作製し、神経組織における発現をマウスを用いて組織学的・生化学的に検討した。その結果、多くのSeptinが、大脳皮質・海馬・小脳などの神経細胞に、分子ごとに特徴的な時間的・空間的パターンで発現することが明らかになった (未発表)。申請者は発生過程の中枢神経組織に特徴的な発現様式を示したSept14に着目した。大脳の発生過程において興奮性神経細胞は、(1)脳室帯での誕生、(2)中間帯での多極性移動、(3)双極性形態での皮質板内の遊走および局在化、(4)機能的な成熟、という一連の過程を経ることが知られている。前述

の発現解析の結果、Sept14は層構造形成期の脳において中間帯上層および皮質板に局限した発現を示すことが明らかになった。従ってSept14が大脳発生過程の(2)もしくは(3)の過程に関与する可能性が想定された。これを検証するために申請者は子宮内遺伝子導入法を用いて脳室帯細胞にSept14特異的siRNAを導入し、皮質神経細胞でのSept14の発現抑制を試みた。その結果、Sept14発現抑制細胞は本来局在すべき皮質板上層(II-III層)に到達することが出来ず、局在異常を示した。この結果から、脊椎動物の神経発生にSeptinが機能的に関与することが初めて明らかにされた。申請者はさらにSept14の新規相互作用分子として同じSeptinファミリー分子のSept4を同定した。子宮内遺伝子導入法を用いてRNAiによるSept4の発現抑制を行ったところ、Sept14の発現抑制時と同様に、皮質神経細胞の局在異常が認められた。またSept14発現抑制と同時に様々なSept14フラグメントを発現させるレスキュー実験の結果、Sept14はSept4との相互作用依存的に皮質神経細胞遊走に関与することが明らかになった。一方で発生期大脳において発現が見られる他のSeptinファミリー分子については、予備的実験の結果現時点では皮質神経細胞移動に関与するものは見出せていない(未発表)。以上の研究結果は、大脳皮質発生過程においては特定のSeptin分子の組み合わせが神経細胞遊走に必要であることを示唆している (Shinoda et al., *Mol. Biol. Cell*, 2010)。しかしながらSept14およびSept4が相互作用することの分子作用機構における意義、およびこのSeptin複合体がいかなる作用機序によって細胞運動に寄与しているのかは未だ不明であり、解明すべき重要な点であった。

3. 研究の方法

本研究では、大脳皮質形成時の神経細胞遊走を解析モデルとして精神・神経疾患関連分子であるSeptinの分子作用機序解明を遂行した。これまでの知見から、Sept14およびSept4が細胞骨格系タンパクの制御を通じて細胞遊走に関与するという可能性が示唆される。これを(1)生化学的手法による分子機能検証、(2)分散培養および大脳皮質内での神経細胞の動態・形態観察というふたつの側面から検証した。加えてレーザー共焦点顕微鏡を使用したタイムラプスイメージングを用いることで、遊走細胞の動態および細胞内での分子の挙動を解析した。また各Septin分子の機能的差異を見出すために、親和性クロマトグラフィーと質量分析を組み合わせた網羅的な相互作用分子スクリーニングを実施した。

4. 研究成果

(1) 網羅的スクリーニングによるSeptin分子の新規相互作用分子同定

質量分析による網羅的スクリーニングの結果、Drebrin-1およびCofilin-1をそれぞれSept4, Sept14の新規相互作用候補分子として見出した。興味深いことに、Drebrin-1およびCofilin-1は、ADHドメインという共通構造をもち、主要な細胞骨格タンパクのひとつであるF-actinに結合する事が知られている。さらにCofilin-1は、F-actinの切断・脱重合を介して興奮性神経細胞の遊走に関与することがすでに報告されていた(Kawauchi et al., 2008)。精製タンパクを用いた結合実験の結果、Drebrin-1とSept4、Cofilin-1とSept14が直接(すなわち他のタンパクを介さず)に結合すること、およびその結合はADHドメインを介していることが明らかになった。これらの結果は、Septinファミリー分子(の少なくとも一部が)F-actin結合タンパクとの直接的な相互作用により、細胞骨格系を制御しうること、さらにSept4-Sept14のヘテロダイマーが、異なる機能を持つF-actin結合タンパクたちの‘足場’として機能する可能性を示唆している(図1)。また本スクリーニングによって、上記以外の新規Sept4, Sept14結合候補分子を複数見出している(未発表)。これらはまだ解析の途上であるが、複数の分子は直接各Septin分子に結合する可能性を得ており、従来の結合分子探索法(例: yeast two-hybrid)に対する優位性、すなわち低バックグラウンドおよび高特異性が明確に認められつつあるといえる。

(2) Sept4結合分子Drebrin-1の興奮性神経細胞遊走への関与検証

Drebrin-1は神経組織に発現するF-actin結合タンパクとして報告されており、神経細胞形態に重要な役割を果たすことがすでに報告されていた。本研究では、その結合相手であるSept4が興奮性神経細胞の遊走に関与することを念頭に置き、Drebrin-1の脳皮質発生における機能解析を実施した。子宮内遺伝子導入によりマウス脳皮質原基にてDrebrin-1の発現抑制を行った結果、72時間後の興奮性神経細胞のポジショニングに異常が認められた(図2)。このことから、Cofilin-1-Sept14-Sept4-Drebrin-1というタンパク複合体が(高い確度で)F-actinの動態を制御することで、興奮性神経細胞の遊走過程に重要な役割を果たすことが強く示唆された(図1)。本研究の結果から、①結合相手(F-actin)は同一で、②かつ結合相手に対し異なる機能を持つタンパク(cofilin-1とDrebrin-1)がSept4-Sept14複合体という‘足場’に架橋されることが細胞生物学的に重要であるという、新規性の高い分子複合体機能の提案がなされたと考える。一方で、このよ

うな分子複合体がF-actinの「局所」に対していかなる作用をもたらすのか(例えば局所的な重合・脱重合の促進によるターンオーバーの増加)かは、未解明の課題として残されている。

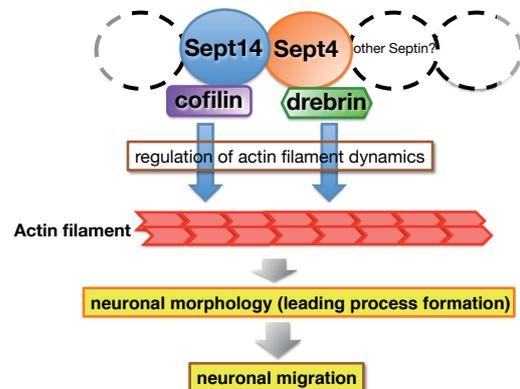


図1: 本研究成果より示唆されるseptin複合体によるF-actin制御機構

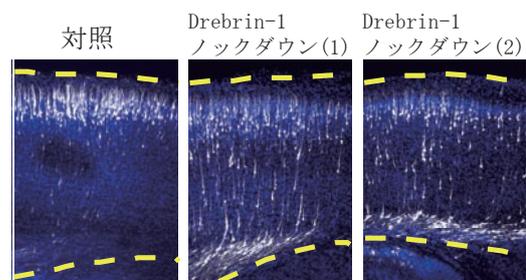


図2: Drebrin-1の発現抑制(ノックダウン)は興奮性神経細胞の配置異常を引き起こした

(3) 脳皮質原基の全細胞イメージング法の改良

本研究を進める過程で、脳皮質原基内細胞のライブイメージングを①より高解像度で、②より低障害で行う必要性に迫られた。特に複数の細胞の画像情報が重なってしまうほどの状態(すなわち全細胞をラベルするような場合)だと、個々のシグナルが周囲に出すフレアノイズが積み重なり、組織深部のイメージングが極めて困難であった。試行錯誤の結果、ニポードディスク型レーザー共焦点顕微鏡システムがこのような観察系に極めて適することを見出した。全細胞核が可視化されるトランスジェニックマウス(H2B-mcherry)の脳皮質原基をニポードディスク型レーザー共焦点顕微鏡システムで観察した結果、脳室帯に存在する神経系前駆細胞の細胞体動態を「集団として」捉えることに成功し、個々の細胞の動態を数学的に記述することが出来た(Okamoto et al., 2013, 図2)。本手法は、興奮性神経細胞の「集団的遊走」を解明する

うえで極めて有効な手段であると思われ、大脳皮質発生をその構成物である個々の細胞の増殖・運動から統合的に解明するために用いたい。

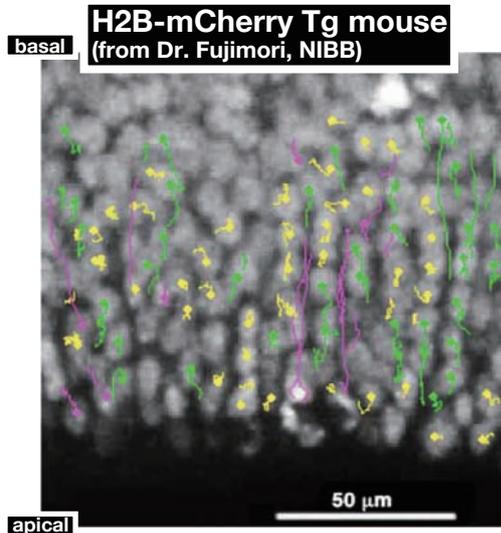


図3:ニポードディスク式レーザー共焦点顕微鏡による大脳皮質原基神経前駆細胞のライブイメージング結果 (Okamoto et al., 2013より)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者 及び連携研究者は下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1)Kawaue T, Sagou K, Okamoto M, Shinoda T, Kiyonari H, Kawaguchi A, Miyata T ‘Neurogenin2-d4Venus and Gadd45g-d4Venus transgenic mice: Visualizing mitotic and migratory behaviors of cells committed to the neuronal lineage in the developing mammalian brain.’ Dev. Growth Differ., 2014, in press, 10.1111/dgd.12131 査読有り

(2)Okamoto M, Shinoda T, Kawaue T, Nagasaka A, Miyata T ‘Ferret-mouse difference in interkinetic nuclear migration and cellular densification in the neocortical ventricular zone.’ Neuroscience Research, 2014, in press, 査読有り

(3)Okamoto M, Namba T, Shinoda T, Kondo T, Watanabe T, Inoue Y, Takeuchi K, Eno

moto Y, Ota K, Oda K, Wada Y, Sagou K, Sakakibara A, Kawaguchi A, Nakajima K, Adachi T, Fujimori T, Ueda M, Hayashi S, Kaibuchi K, Miyata T

‘TAG-1-assisted progenitor elongation streamlines nuclear migration to optimize subapical crowding.’

Nat. Neurosci.16, 2013, doi: 10.1038/nn.3525, 査読有り

[学会発表] (計 12 件)

(1)Shinoda T, et al, ‘Physiological meanings of the dynamics of the progenitor cells for the maintenance of the ventricular zone’, Neuro2013, 2013年6月21日、京都国際会館、京都市

(2)篠田友靖, ‘Molecular mechanism of Septin-mediated neuronal migration’, 第34回日本分子生物学大会, 2011年12月8日、パシフィコ横浜、横浜市

(3)Shinoda T, et al, ‘Molecular mechanism of Septin-mediated neuronal migration’, Neuroscience2011, Nov.11, 2011, Washington D.C., USA.

(4)篠田友靖, ‘Molecular mechanism of Septin-mediated neuronal migration’, 第54回日本神経化学会, 2011年9月26日、山代温泉瑠璃光、金沢市

[図書] (計 1 件)

(1)篠田友靖、伊東秀記 ‘子宮内胎仔脳遺伝子導入法」『病気の分子形態学』日本臨床分子形態学会 編, 学際企画株式会社, 370 (192-193), 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠田 友靖 (SHINODA, Tomoyasu)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 80505652

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし