

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24700349

研究課題名(和文)神経活動依存的な軸索伸長における分子クラッチタンパク質shootin1の役割

研究課題名(英文)Role of clutch protein shootin1 in activity-dependent axonal elongation

## 研究代表者

島田 忠之 (SHIMADA, Tadayuki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生分野・主席研究員

研究者番号：80379552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：てんかん発作に伴う海馬歯状回顆粒細胞軸索の形態変化においてshootin1の明確な機能は認められなかったことから、発作により発現が上昇するタンパク質の機能を解析した結果、Neuritinタンパク質の過剰発現により、顆粒細胞軸索の分枝形成が促進されることを見出した。薬剤により発作を誘導した際、neuritinノックアウトマウスは発作の程度が軽く、てんかん発作後に観察される顆粒細胞の異常な分枝形成も少なかった。NeuritinはFGF受容体を細胞外に移動させることでFGFシグナルを活性化させており、FGFシグナルが活性化することで顆粒細胞軸索形成が促進されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Because we could not find the evidence that shootin1 is involved in the aberrant axonal branch formation of hippocampal granule cells after epileptic seizure, we investigated the function of activity-dependent proteins in seizure-mediated axonal branching. We found that overexpression of neuritin, one of the protein increased after the seizures, promoted axonal branching in granule cells. Chemical kindling induced less severe seizures in neuritin knockout mice than in wild-type mice, and neuritin knockout mice showed smaller number of axonal branching after the induction of epileptic seizures. We found that excess amount of Neuritin recruited FGF receptors to cell surface and the recruitment of FGF receptors activated FGF signaling. Furthermore, the increased activity of FGF signaling promoted axonal branching in granule cells. We concluded that Neuritin-mediated translocation of FGF receptors induce aberrant axonal branching after epileptic seizures.

研究分野：神経科学

キーワード：てんかん 軸索分枝 神経回路 FGFシグナル

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 脳の神経回路網は、標的細胞とのシナプス形成が確立した成熟段階においても、機能や構造を変化させることができる可塑性を有している。「難治性てんかん」においては発作が繰り返されることで海馬顆粒細胞の軸索に異常な発芽や分枝が生じ、通常は海馬 CA3 領域に投射する軸索が歯状回に伸長し自己回路を形成する苔状線維発芽といった現象が観察される (Buckmaster et al J Neurosci 22:6650-8 (2002))。この軸索形態異常は発作に伴う神経細胞の過剰な活動により生じると考えられているが、伸長を司るタンパク質の単離やその機能解析は行われていない。

(2) 応募者らは軸索伸長を促進するクラッチタンパク質 shootin1 を単離していた。Shootin1 は発生期に強く発現し、神経突起、および軸索の伸長を促進することを見出していたが (Shimada et al., J. Cell Biol. 181:817-829 (2008))、成熟後の神経細胞における機能は不明であった。

(3) てんかん発作などの神経活動に伴い発現が上昇するタンパク質はいくつか単離されていたが、実際に顆粒細胞の軸索分枝の形成や軸索伸長に関与するタンパク質の単離や機能解析は行われていなかった。

### 2. 研究の目的

(1) 成熟神経細胞における神経活動依存的な軸索伸長に shootin1 が関与していることを明らかにする。神経活動と軸索先端における shootin1 存在量との相関関係、および shootin1 の蓄積に伴う軸索の伸長、運動性の変化を解析する。また、shootin1 の過剰発現あるいは発現抑制を行った際に、神経活動依存的な軸索伸長がどのように変化するか、てんかん発作に伴う苔状線維の異常伸長、分枝がどのように変化するかを解析する。これらの結果から shootin1 が神経活動特異的な軸索伸長を制御していることを明らかにする。  
 (2) 神経活動に伴い発現量が上昇し、軸索の伸長または分枝の形成を誘導するタンパク質を探索する。神経活動に伴い、神経細胞内における発現量が上昇するタンパク質はいくつか知られている。これらのうち、過剰発現することで神経活動非依存的に軸索の伸長、分枝の形成を誘導するタンパク質を探索する。発見したタンパク質について、相互作用するタンパク質を単離すると共に、軸索の伸長、分枝の形成に関与するシグナルカスケードを抑制した際に、過剰発現時の軸索の伸長、分枝の形成が変化するかを測定することで、標的タンパク質が既知のシグナルカスケードに関与するかを明らかにする。また神経活動に伴い発現が上昇するタンパク質の細胞内局在についても解析する。

### 3. 研究の方法

(1) シナプス形成後の神経細胞 (培養 7 ~ 2

1 日程度の培養海馬顆粒細胞、海馬スライス培養) を用い、成長円錐に存在する shootin1 の量の神経活動の誘導に伴う変化と、その際の軸索伸長速度との相関関係を解析する。海馬スライス培養を用い、shootin1 による軸索伸長の制御機構が、海馬顆粒細胞における過剰な神経活動に伴う軸索投射の異常に関与していることを示す。

(2) 神経活動依存的に発現が上昇することが知られている遺伝子を海馬顆粒細胞に過剰発現し、軸索の形態に変化が生じるかを解析する。過剰発現により軸索形態に変化が生じる遺伝子について、発現を抑制した際に神経活動に伴う軸索分枝形成が抑制されるかを解析する。さらに、分子的な機能を明らかにするために、免疫沈降法を利用して相互作用するタンパク質の単離を試みる。

### 4. 研究成果

(1) 分散培養系において成熟神経細胞に shootin1 を過剰発現した場合、軸索、樹状突起のいずれにおいても異常な伸長を観察することはできなかった。また海馬スライス培養においては shootin1 を過剰発現することができなかった。このため、神経活動依存的な軸索の形態変化について shootin1 は機能を持たないのではないかと推測された。

(2) 神経活動依存的に発現が上昇する遺伝子について探索を行ったところ、Neuritin 遺伝子を過剰発現すると、顆粒細胞軸索の分枝の形成と伸長を促進することが明らかとなった。しかし、Neuritin の過剰発現は軸索の伸長は引き起こさなかった。(図 1)

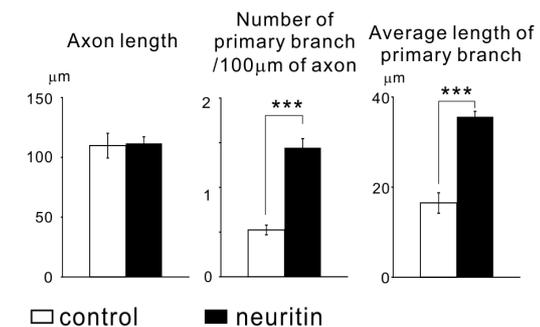


図 1 : Neuritin 過剰発現により、軸索長は変化しないが、分枝の形成と伸長は促進される。

この結果を受けて、Neuritin の解析を行うことにした。Neuritin 過剰発現による顆粒細胞における分枝形成は、ラット海馬スライス培養においても観察された。

(3) Neuritin のてんかん発作後における軸索分枝形成への関与を明らかにするために、培地中にカイニン酸を添加し、神経活動を亢進させたところ、野生型マウス由来の海馬顆粒細胞では軸索分枝形成が誘導されたが、ノックアウトマウス由来の細胞では軸索分枝形成は観察されなかった。(図 2)

野生型、ノックアウト双方から得た海馬スラ

イス培養においても同様の結果を得た。

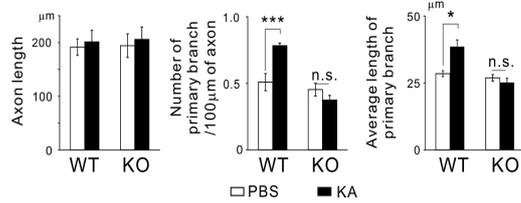


図2：野生型マウス由来の顆粒細胞ではカイン酸添加により軸索分枝形成が促進されたが、Neuritin ノックアウトマウス由来の顆粒細胞では、分枝形成は起きなかった。

(4)Neuritin による顆粒細胞軸索分枝形成が、てんかん発作にどのように関与するかの解析を行った。低用量のペンチレンテトラゾールを慢性投与することで、投与直後の発作が次第に悪化する現象が知られている(ケミカルキンドリング)。Neuritin ノックアウトマウスにペンチレンテトラゾールを投与したところ、野生型と比べて発作の悪化速度は緩やかであった(図3上)。また、投与後の海馬を解析すると、苔状線維発芽の程度も低かった(図3下)。

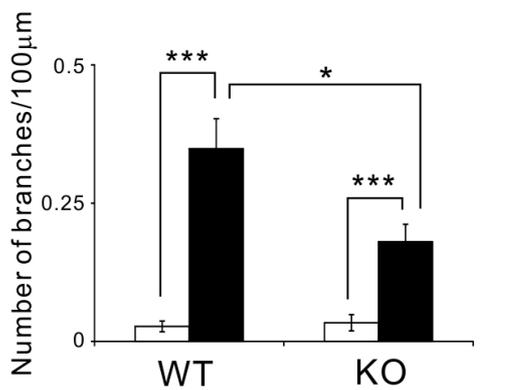
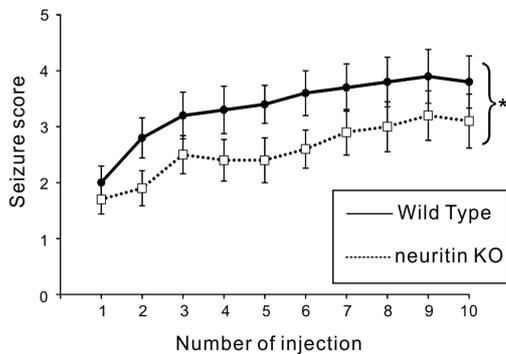


図3：Neuritin ノックアウトマウスはケミカルキンドリングにおける発作強度の悪化が緩やかであり、投与後の苔状線維発芽も起きにくい。

(5)Neuritin と相互作用するタンパク質を探索した結果、FGF 受容体が Neuritin と結合することが明らかとなった。そこで、Neuritin を過剰発現する神経細胞の培地中

に FGF 受容体の阻害剤を添加した。すると Neuritin による軸索分枝形成が抑制された

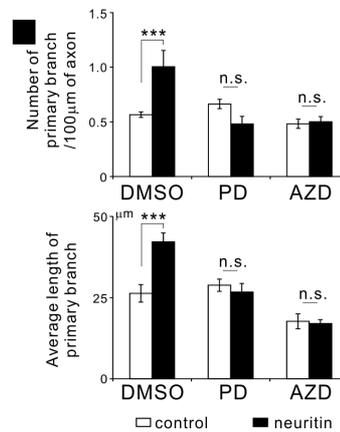


図4：Neuritin による軸索分枝形成は、FGF 受容体阻害剤 ( PD173074 、 AZD4547 )により抑制された。

すなわち、Neuritin が FGF 受容体と結合することで FGF 受容体が活性化し、その結果軸索分枝形成が誘導されると考えられた。

(6)FGF シグナルの中で Neuritin による軸索形成誘導に必要なものを明らかにするために、FGF シグナルを構成する MAPK、PI3K、PLC の阻害剤をそれぞれ添加すると、いずれにおいても Neuritin 依存的な軸索形成は抑制された(図5)。すなわち、Neuritin はこの3種のシグナルをすべて活性化し軸索分枝形成を行っていると考えられる。

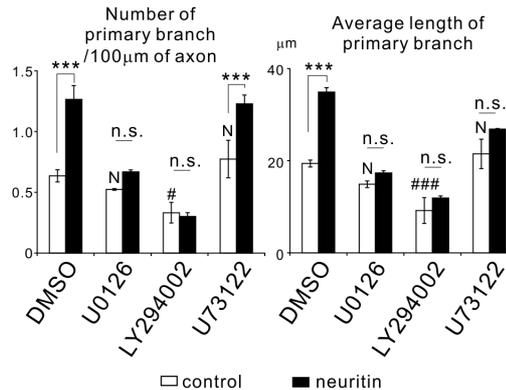


図5：Neuritin による軸索分枝形成は、MAPK 阻害剤(U0126)、PI3K 阻害剤(LY294002)、PLC 阻害剤(U73122)により抑制された。

(7)FGF による軸索分枝形成と Neuritin との関連を解析するため、まず、培養顆粒細胞に各種 FGF を添加した。その結果、FGF4、FGF7、FGF8 サブファミリーは顆粒細胞軸索に分枝形成を誘導することが明らかとなった(図6上)。

続いて、Neuritin ノックアウトマウス由来の培養顆粒細胞に FGF4、FGF7、FGF8 を添加したところ、FGF4 による軸索分枝形成は起き

なかったのに対し、FGF7,FGF8 では軸索分枝形成が観察された(図6下)。これらの結果から、Neuritin はFGF4 サブファミリーと協調することで、軸索分枝形成を誘導すると考えられた。

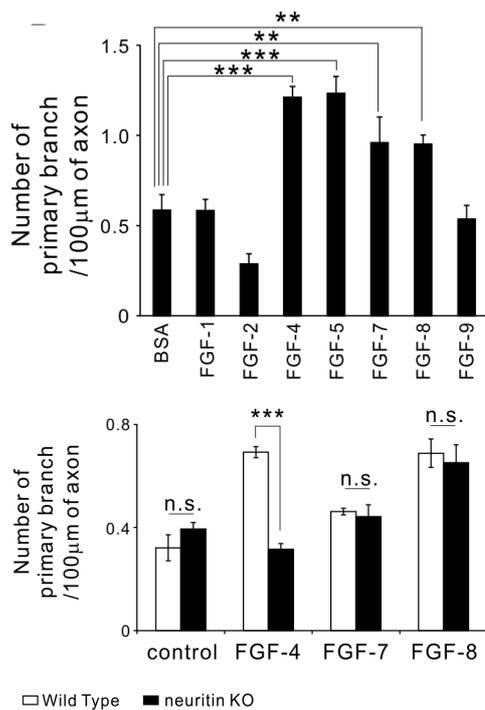


図6 : FGF-4,FGF-7,FGF-8 は顆粒細胞軸索分枝の形成を誘導するが、FGF-4 に限り、Neuritin ノックアウトマウス由来の顆粒細胞の軸索分枝形成を誘導できなかった。

(8)最後に Neuritin と FGF4 がどのような協調関係にあるのかを解析した。精製 Neuritin タンパク質、あるいは FGF4 を培地に添加すると、培養顆粒細胞において細胞表面上に現れる FGF 受容体の量が増加した。しかし、Neuritin ノックアウトマウス由来の顆粒細胞では FGF4 を添加しても細胞表面の FGF 受容体の量は増加しなかった(図7)。このことから、Neuritin と FGF4 は協調して FGF 受容体を細胞表面に輸送し、その結果 FGF シグナルが活性化すると考えられる。また、大過剰の Neuritin はそれだけで FGF 受容体を細胞表面に輸送することが可能である。

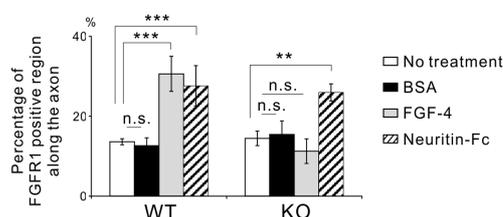


図7 : FGF4 は Neuritin 存在下で FGF 受容体を細胞外に輸送することができる。

## 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 6 件)

Shimada T, Yoshida T, Yamagata K. Neuritin Mediates Activity-Dependent Axonal Branch Formation in Part via FGF Signaling. *J Neurosci*. 36: 4534-4548, 2016. 査読あり.  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.1715-15.2016.

Khazaei MR, Girouard MP, Alchini R, Ong Tone S, Shimada T, Bechstedt S, Cowan M, Guillet D, Wiseman PW, Brouhard G, Cloutier JF, Fournier AE. Collapsin Response Mediator Protein 4 regulates growth cone dynamics through the actin and microtubule cytoskeleton. *J Biol Chem*. 289: 30133-30143, 2014. 査読あり  
doi: 10.1074/jbc.M114.570440

Shimada T, Takemiya T, Sugiura H, Yamagata K. Role of Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Epilepsy. *Mediators Inflamm*. 2014: 901902. 1-8, 2014. 査読あり  
doi: 10.1155/2014/901902

Yasuda S, Sugiura H, Katsurabayashi S, Shimada T, Tanaka H, Takasaki K, Iwasaki K, Kobayashi T, Hino O, Yamagata K. Activation of Rheb, but not of mTORC1, impairs spine synapse morphogenesis in tuberous sclerosis complex. *Sci Rep*. 4: 5155. 1-8, 2014. 査読あり  
doi: 10.1038/srep05155.

Shimada T, Fournier AE, Yamagata K. Neuroprotective function of 14-3-3 proteins in neurodegeneration. *Biomed Res Int*. 2013: 564534. 1-11, 2013. 査読あり  
doi: 10.1155/2013/564534.

Shimada T, Sugiura H and Yamagata K. Neuritin: A therapeutic candidate for promoting axonal regeneration. *World J Neurol* 3: 138-143, 2013. 査読あり  
DOI: 10.5316/wjn.v3.i4.138

(学会発表)(計 8 件)

Shimada T 他, Neuritin induces axonal branch formation in hippocampal granule neurons by activating FGF signaling, 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016 年 3 月 28 日～30 日、ビッグパレット福島(福島県・郡山市)

Shimada T 他 , Neuritin mediates activity-dependent axonal branch formation through FGF signaling, 第 4 9 回日本てんかん学会学術集会、2015年10月30日～31日、長崎ブリックホール、長崎新聞文化ホール(長崎県・長崎市)

Shimada T 他 , Neuritin induces activity-dependent axonal branch formation through FGF signaling, 第 3 7 回日本神経科学大会、2014年9月11日～13日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Shimada T 他 , Neuritin mediates activity-dependent axonal branching in hippocampal granule cells, Development, Functions and Disorders of the Nervous System, 2014年7月19日～24日、Montreal, Canada

Shimada T 他, Activity-dependent axonal branching mediated by neuritin, International symposium: "New Frontier of Molecular Neuropathology 2014" 2014年3月16日～17日、東京医科歯科大学(東京都・文京区)

Shimada T 他 , Neuritin induces activity-dependent axonal branching in hippocampal granule cells, 第 4 7 回日本てんかん学会学術集会、2013年10月11日～12日、北九州国際会議場、西日本総合展示場新館(福岡県・北九州市)

Shimada T 他 , Neuritin Induces activity-dependent axonal branching in hippocampal granule cells, 第 3 6 回日本神経科学大会、2013年6月20日～23日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

Shimada T 他, Involvement of neuritin in activity-dependent neurite branching in hippocampal neurons, 第 4 6 回日本てんかん学会学術集会、2012年10月11日～12日、都市センターホテル、JA共済ビルカンファレンスホール(東京都・千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
2014年10月8日 世界脳週間講演会にて講演  
<http://www.igakuken.or.jp/public/column/column2.html>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
島田 忠之 (SHIMADA, Tadayuki)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・主席研究員  
研究者番号：80379552