

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770184

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた発達期および成体の脳におけるセブチン細胞骨格の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the septin cytoskeleton in developing and mature brain

研究代表者

上田 奈津実(石原奈津実)(Ageta-Ihsihara, Natsumi)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60547561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：神経回路形成における神経突起伸展には微小管やアクチン細胞骨格系が不可欠である。この現象には神経系に大量に発現するセブチン細胞骨格系の関与も示唆されているが、そのメカニズムは不明である。本研究では、必須サブユニットSEPT7欠乏/欠損ニューロンにおいて、軸索と樹状突起の伸展が阻害され、チューブチンのアセチル化が亢進していることを見出した。また、脱アセチル化酵素HDAC6阻害剤処理により同様の表現型を得た。この結果をうけ、HDAC6とセブチンが直接結合すること、この結合がHDAC6と基質であるチューブリンとの結合を制御することを見出した(Nature Communications 2013)。

研究成果の概要(英文)：Neurite outgrowth is a vital process for neural network formation in which microtubules and actin filaments play major roles. Previous studies revealed that another class of nucleotide-binding protein polymers of septins is also required for neurite outgrowth. However, the mechanism are unclear. Here we found that depletion of the pivotal septin subunit SEPT7 from cerebrocortical neurons causes hyperacetylation of microtubules and inhibits the outgrowth of both axons and dendrites. The phenotypic similarity between SEPT7 depletion and inhibition of the major tubulin deacetylase HDAC6 allowed the detection of their functional and physical interactions. While HDAC6-acetylated tubulin interaction is unaffected by the association of septins, it is significantly diminished in SEPT7-depleted neurons. These data suggest a novel molecular network in which septins facilitate HDAC6-mediated tubulin deacetylation, thus optimizing microtubule dynamics for neurite outgrowth.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

胎生期から生後発達期にかけての脳組織でみられるニューロンやグリア細胞の分裂、移動、突起伸展などの現象には微小管やアクチン細胞骨格系による細胞形態と運動の制御が不可欠である。一方、重合性ヌクレオチド結合蛋白質ファミリーSEPT1-14 から成るセプチン細胞骨格系も神経系に大量に存在するが、その生理的意義には不明な点が多い。申請者が所属する木下研究室はこれまでに、セプチンがアクチン系やリン脂質 2 重膜と相互作用しつつ多様な形状に高次集合するユニークな活性を持ち、細胞分裂と分裂後の多様な細胞現象に關与することを示してきた。神経系においては脳皮質形成時の細胞移動や培養ニューロンのスパイン形成におけるセプチン細胞骨格系の關与が RNAi 実験から示唆されている。しかし、セプチン遺伝子破壊マウスの多くが胎生致死となるか軽微な異常しか示さないことも災いして、非分裂細胞におけるセプチン細胞骨格系の機能解析は十分になされていない。

申請者は脳皮質ニューロン初代培養系を用いた神経突起(軸索・樹状突起)形成の定量解析系を行う一方、*in vivo* でも胎生期脳皮質ニューロンの対側皮質への投射を解析した(Ageta-Ishihara et al., J Neurosci 2009) (Takemoto-Kimura*, Ageta-Ishihara* (*equal contribution) et al., Neuron 2007)。この経験を生かし、平成 22-23 年度の若手研究(B)「神経突起形成とリモデリングにおけるセプチン細胞骨格の解析」の代表者として研究を推進し、セプチンはチュープリンの脱アセチル化反応を促進し、微小管ダイナミクスを保障することで神経突起伸展を制御することを見出した。

そこで本研究では、これらの成果を進展させ、初代培養系(*in vitro*)とノックアウトマウスを含めた個体レベルの実験系(*in vivo*)を相補的に組み合わせ、セプチン細胞骨格系の機能を生理的コンテキストで探索することを目指した。

2. 研究の目的

発達期の神経系の構造と機能を支える細胞骨格系の協調作用の中でセプチン系が果たす役割を生理的コンテキストで理解するため、以下のプロジェクトを推進する。

プロジェクト：発達期の神経突起伸展におけるセプチン依存性微小管制御機構の解析

- 神経突起伸展におけるセプチンの役割
- 微小管制御におけるセプチンの役割

3. 研究の方法

(1)13 種類のセプチン遺伝子のほとんどが発生過程の脳で発現するが、必須サブユニット *Sept7* 欠損マウスは胎生致死となることが知

られている。そこで、申請者らは *Sept7* floxed マウスを作製し、*Sept7* floxed マウス由来の脳皮質神経細胞に Cre リコンビナーゼ+GFP 共発現ベクターを電気穿孔法にて導入し、分散培養した。必須サブユニット SEPT7 の「欠損」による神経突起形成異常のフェノタイプを、すでに結果を得ている RNAi による「欠乏」の場合と対比しつつ解析した。

(2)(1)の実験を *in vivo* で再現・検証するため、子宮内電気穿孔法を用いて Cre リコンビナーゼ+GFP 共発現ベクターを導入し、*Sept7* floxed マウス 16 日胚の脳皮質 1 層の錐体ニューロンのセプチンを欠損させ、生後 15 日における対側皮質への軸索投射ならびに樹状突起形態を定量解析した。

(3)神経突起内微小管のダイナミクス制御におけるセプチンの役割を探索するため、脳皮質初代培養ニューロンに RNAi ベクターと +GFP-EB1(微小管会合分子)を電気穿孔法にて導入し、ライブイメージングによってチュープリンの重合/脱重合を反映するターンオーバー率を計測した。

(4)セプチンと脱アセチル化酵素 HDAC6 の直接的な相互作用を検討するため、Sf9 細胞で発現させた、His タグ付きの遺伝子組換え型 SEPT7/6/2 を Ni-NTA アガロースビーズに固定し、GST-HDAC6 もしくは GST とともに反応させた。ビーズは洗浄、Laemmli バッファー(200 mM Tris-HCl(pH6.8)、8% SDS、40% グリセロール)で溶出し、SDS-PAGE 及び CBB 染色した。

4. 研究成果

(1)神経突起伸展における表現型をより厳密に評価するため、*Sept7* floxed マウス由来の脳皮質初代培養ニューロンにおいて SEPT7 を欠損させた。遺伝子導入 2 日後、神経突起伸展期において軸索ならびに樹状突起伸展を精査した結果、SEPT7 欠損脳皮質初代培養ニューロンにおいて、軸索ならびに樹状突起伸展が著しく阻害されていた。

(2)マウス体性感覚野第 2/3 層の神経細胞は脳梁投射により対側皮質へ投射し 1-3 層と 5 層で軸索の分枝を発達させる。本過程は、子宮内電気穿孔法にて標識が可能である。子宮内電気穿孔法を用いて *Sept7* floxed マウス 16 日胚の脳皮質 2-3 層の錐体ニューロンに Cre リコンビナーゼ+GFP 共発現ベクターを導入し SEPT7 を欠損させ、対側皮質への軸索投射を定量解析した。解析の結果、SEPT7 欠損ニューロンにおいて、軸索投射が著しく阻害されていた。また、樹状突起伸展も阻害されていることを見出した。

(3)神経突起の主要構成成分である微小管に

はセプチンを含む多様な関連蛋白質群が会合し、構成蛋白質チューブリンもアセチル化やポリグルタミン酸化などの化学的修飾を受けている。微小管の修飾・制御におけるセプチンの役割を探索した結果、動的に安定な微小管の指標となるアセチル化チューブリンの量がSEPT7の欠乏によって変動することを見出したため、チューブリンのターンオーバーを定量した。その結果、SEPT7欠乏ニューロンにおいてチューブリンのターンオーバーが減弱していることを見出した。

(4)(1)-(3)の結果を受け、分子メカニズムを探索した結果、脱アセチル化酵素 HDAC6 が発達期の脳皮質ニューロンに発現していること、HDAC6 阻害剤を脳皮質ニューロンの突起伸長を阻害することを見出した。これらの結果から、HDAC6 とセプチンとの直接的相互作用を検討した結果、HDAC6 とセプチンが直接結合することを見出した。また、これらの結合が HDAC6 と基質であるチューブリンとの結合を制御することを見出した。

以上の結果から、脱アセチル化酵素 HDAC6 とセプチンとの直接的相互作用がチューブリンのアセチル化を制御し、微小管再編成を介した神経突起伸長を制御すると結論を出し、論文として発表した(Nature Communications, 2013)。

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4件)

Ageta-Ishihara N, Miyata T, Ohshima C, Watanabe M, Sato Y, Hamamura Y, Higashiyama T, Mazitschek R, Bito H, Kinoshita M, Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation, Nature Communications, 査読有, 4, 2013, 2532
Ageta-Ishihara N, Yamakado H, Morita T, Hattori S, Takao K, Miyakawa T, Takahashi R, Kinoshita M, Chronic overload of SEPT4, a parkin substrate that aggregates in Parkinson's disease, causes behavioral alterations but not neurodegeneration in mice, Molecular brain, 査読有, 6(1), 2013, 35
Ageta-Ishihara N, Morita T, Yamauchi Y, Kinoshita M, Mechanisms for the brain activation via physical exercise, 健康医科学, 査読有, 28, 2013, 44-51
木下専, 上田(石原)奈津実, セプチンによるドーパミン神経伝達機構の制御, 脳, 査読無, 16(3), 2013, 40-45

[学会発表](計15件)

Ageta-Ishihara N, Miyata T, Ohshima C, Watanabe M, Sato Y, Hamamura Y, Higashiyama T, Mazitschek R, Bito H, Kinoshita M, Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation, The American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2013年12月16日, New Orleans
Ageta-Ishihara N, Kinoshita M, Impaired cerebellar ultrastructure and motor coordination in mice that lack a septin-interacting protein BORG4/CDC42EP4, American Society for Cell Biology Annual Meeting, Special Interest Subgroup Meeting "Septins: Membrane organization and cytoskeletal dynamics from bud necks to dendritic spines.", 2013年12月9日, New Orleans
上田(石原)奈津実, 澤田明宏, 真野善有, 増田博紀, 西岡朋生, 貝淵弘三, 高雄啓三, 宮川剛, 重本隆一, 深澤有吾, 木下専, セプチン変異マウスを用いた未知の空間学習・記憶メカニズムの探索, 第36回日本分子生物学会年会ワークショップ, 2013年12月4日, 神戸
Kurita H, Fukazawa Y, Ageta-Ishihara N, Shigemoto R, Kinoshita M, Differential clustering of septin subunits beneath specific perisynaptic membrane domains in the cerebellar cortical neurons and glia, The 6th international neural microcircuit conference, 2013年6月25日, 岡崎
Kurita H, Fukazawa Y, Ageta-Ishihara N, Shigemoto R, Kinoshita M, Immuno-EM 3D reconstruction analysis of septin subunits in the cerebellum, The Fourteenth International Membrane Research Forum, 2013年3月16日, 京都
Ageta-Ishihara N, Ohshima C, Miyata T, Watanabe M, Mazitschek R, Bito H, Kinoshita M, Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation, SNSS 2013, 2013年3月10日, 大阪
Kurita H, Fukazawa Y, Ageta-Ishihara N, Shigemoto R, Kinoshita M, Immuno-EM 3D reconstruction analysis of septin subunits in the cerebellum, Frontiers in Structural Physiology Symposium, 2013年1月22日, 名古屋
上田(石原)奈津実, 木下専, Septins facilitate neurite outgrowth through HDAC6-mediated microtubule deacetylation, 第35回日本分子生物学会年会シンポジウム, 2012年12月12日, 福岡

Ageta-Ishihara N, Kinoshita M,
Septin-dependent microtubule
regulation required for the outgrowth of
axons and dendrites、第 35 回日本神経科
学大会シンポジウム、2012 年 9 月 21 日、
名古屋

〔図書〕(計 1 件)

上田(石原)奈津実、木下専、セブチン、
生化学辞典、査読無、in press

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田(石原) 奈津実
(AGETA-ISHIHARA NATSUMI)
名古屋大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：60547561

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし