

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290007

研究課題名(和文) Shootinによる脳の形成とその機能不全による破綻の解明

研究課題名(英文) Mechanical and pathological analyses of shootin-mediated brain formation

研究代表者

稲垣 直之 (Naoyuki, Inagaki)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：20223216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：組織の形成には、細胞の移動が重要な役割を果たすと考えられている。しかし、従来の組織形成に関する研究は、細胞の分化や運命決定の視点から捉えた解析が主流で、組織構築のための細胞の移動を担う仕組み、特にそのために細胞-基質間に力を発生させる分子機構はよくわかっていない。本研究の結果からShootinがアクチン線維と細胞接着分子を連結することで細胞-基質間に細胞移動のための力を生み出し、脳組織の形成を担う可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Force interaction between cells and adhesive substrates induces cell migration that plays a key role in tissue morphogenesis. However, the molecular mechanics how cells generate forces between cells and substrates for cell migration and tissue morphogenesis remains unclear. Shootin1 is a brain-specific protein involved in axon formation. We found a novel splicing isoform of shootin1 which is expressed not only in the brain but also in peripheral tissues. We renamed the brain-specific shootin1 as shootin1a and termed the novel isoform as shootin1b. We found that shootin1 is involved in migration of olfactory neurons and formation of the olfactory bulb. Shootin1b interacts with actin filaments that undergo directional polymerization at the leading edge of migrating olfactory neurons. Our data suggest shootin1b mediates the linkage between the actin filaments and the cell adhesion molecule L1-CAM, thereby generating forces between cells leading and and substrates for migration.

研究分野：細胞生物学、神経科学、メカノバイオロジー、システム生物学

キーワード：Shootin 脳組織形成 ノックアウトマウス ゼブラフィッシュ メカノバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

組織の形成や再生には、細胞の移動や配置換えが重要な役割を果たすと考えられている。しかし、従来の脳組織形成に関する研究は、遺伝子調節による細胞の分化や運命決定の視点から捉えた解析が主流で、組織構築のための細胞の移動や配置換えを担う仕組み、特にそのために細胞-細胞間あるいは細胞-基質間に力を発生させる分子機構はよくわかっていない。

我々はこれまでに、新規軸索形成分子 Shootin1 を同定し、Shootin1 が軸索先端で重合・脱重合 (treadmilling) を繰り返すアクチン線維を細胞接着タンパク質に連結して軸索伸長やガイダンスのための駆動力を生み出すことを見出した。さらに、Shootin ノックアウトマウスを作製してその脳を解析し、軸索の形成不全や前脳の組織構築に異常を示す予備データを得た。Shootin1 は軸索伸長のために細胞間あるいは細胞-基質間に滑りを引き起こす力を発生するため、これらの結果から、Shootin1 が細胞移動や配置換えのためにも同様の力を発生する可能性が示唆された。また、Shootin の組織構築への関与を解析することにより、組織形成の仕組みを力発生という新たな視点から理解することができると思われた。

2. 研究の目的

本研究は、Shootin がいかにして組織の形成を担うのか、細胞が発生する力を基盤として解明することを目指す。組織形成のための細胞の移動や配置換えを担う仕組み、特にそのために力を発生させる分子機構は未だ不明である。本研究では、Shootin ノックアウトマウスを用いて前脳形成における Shootin の役割を解明する。また、ゼブラフィッシュの Shootin を解析しライブイメージングにより、Shootin による組織形成機構を力の発生と細胞移動・配置換えの観点から明らかにする。さらに、申請者らの予備データをもとに、ヒトの前脳形成における Shootin の関与とその機能破綻が全前脳胞症を引き起こす可能性を調べる。

3. 研究の方法

マウス組織における Shootin の発現は、特異抗体を用いて免疫組織染色で解析した。ゼブラフィッシュにおける Shootin の発現解析は In situ hybridization 法を用いて行った。マウス脳における軸索の走行は、軸索マーカーの抗 L1 抗体を用いた免疫組織染色や蛍光トレーサー-DiI によるラベリングで解析した。神経細胞における Shootin の局在は、特異抗体を用いた免疫細胞染色によって行なった。

Shootin1b の細胞内ライブイメージングは、mRFP-Shootin1b を発現させて蛍光タイムラプス顕微鏡を用いて行い、1 分子計測は HaloTag-Shootin1b を細胞に発現させて蛍光顕微鏡あるいは全反射顕微鏡を用いて行っ

た。また、マウスやゼブラフィッシュ組織における細胞移動は、コンフォーカル顕微鏡を用いてモニターした。

タンパク質の相互作用は、免疫沈降法および精製タンパク質を用いた in vitro binding assay を用いて解析した。細胞が生み出す牽引力は、牽引力計測法 (Toriyama et al, *Curr Biol* 2013) で解析した。また、ゼブラフィッシュの Shootin の変異体は Crisper/Cas9 システムを用いて作製した。

4. 研究成果

(1) Shootin の新しいスプライシングバリエーションと新しい Shootin 遺伝子の同定:

軸索形成分子 Shootin1 (Toriyama et al, *J Cell Biol*, 2006) はラットでは 456 個のアミノ酸から構成されているが、これに加えて 633 個のアミノ酸からなる Shootin1 の新たなスプライシングバリエーションを同定した。そこで、前者を Shootin1a、後者を Shootin1b と命名した (Higashiguchi et al, *Cell Tissue Res*, 2016)。Shootin1b はヒトやマウスを含む哺乳類に広く存在することがわかった。

また、Shootin1 に加えて、ゼブラフィッシュに新たな 2 つの Shootin 遺伝子を見出し、Shootin2、Shootin3 と名付けた (Urasaki et al, 投稿準備中)。Shootin1 および Shootin2、Shootin3 の存在を系統的に調べたところ、Shootin1 が魚類から哺乳類に至る幅広い脊椎動物に存在することがわかった。また、Shootin2 は魚類から非胎盤哺乳類まで存在するが胎盤哺乳類には見出されないこと、Shootin3 が魚類に存在するが両生類や爬虫類、鳥類、哺乳類には見出されないことが明らかとなった。

(2) マウスにおける Shootin1a と Shootin1b の組織局在の解析:

次に、Shootin1a と Shootin1b に対する特異抗体を用いて、マウスにおける発現を解析した。Shootin1a と Shootin1b は、発生時期の脳の広範囲に発現し、特に神経軸索が密に走行する脳梁や海馬交連、脳弓、前交連、後交連等では高い発現が見られた。また、Shootin1a の抹消組織での発現は認められなかったが、Shootin1b は肺、肝臓、胃、腸、脾臓、膵臓、腎臓、皮膚、精巣、卵巣といった様々な組織に発現し、特に上皮組織には高い発現が見られた (図 1)。

(3) Shootin1 ノックアウトマウスでは軸索ガイダンスや脳組織形成に異常が見られる:

次に、Shootin1 ノックアウトマウスの脳組織の解析をしたところ、軸索が密に走行する脳梁や前交連の形成不全が認められた。そこで、これらの軸索を軸索マーカーの抗 L1 抗体や蛍光トレーサー-DiI でラベルし詳細に解析したところ、軸索のガイダンスおよび束化に異常が見られた。また、嗅球や中隔野の欠損および左右の大脳半球の融合が見られた。

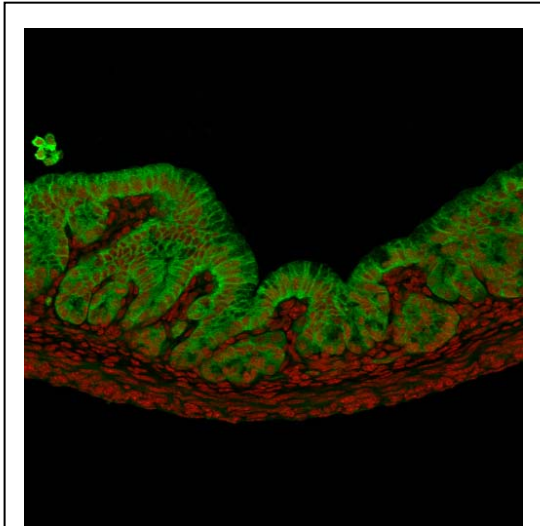


図1：胎生18.5日目のマウス胃におけるShootin1bの免疫組織化学染色像。緑はShootin1b、赤は核(DAPI染色)を表す。

(4) 全前脳胞症患者のShootin1遺伝子の解析：

上述の大脳半球融合や嗅球の欠損はヒト全前脳胞症患者の症状と似ているため、全前脳胞症患者の遺伝子を入手して配列解析を行った。これまでに8検体のヒト全前脳胞症患者のShootin1遺伝子の解析を行ったが、残念ながらShootin1遺伝子の変異は認められなかった。全前脳胞症は胎児の1/250に発症する大変頻度の高い疾患であるため、Shootin1以外の複数の遺伝子や要因が関与している可能性がある。従って、今後も継続的に検体を入手してShootin1遺伝子の解析を進める必要があると考えている。

(5) Shootin1bは嗅球神経細胞の細胞移動に関与する：

上述のように、Shootin1のノックアウトマウスで嗅球の欠損が見られた。また、発生時期及び成体の脳内では脳室下帯で生まれた神経細胞が嗅球に向かって移動することが知られている。そこで、この神経細胞の移動経路を解析したところ、Shootin1bが発現することがわかった。一方、移動経路にShootin1aの発現は検出できなかった。さらに、Shootin1ノックアウトマウスでは、嗅球の形成不全に伴って脳室下帯に神経細胞の異常な蓄積が観察された。以上の結果からShootin1bが嗅球を構成する神経細胞の嗅球への細胞移動に関与する可能性が示唆された。

そこで、嗅球へ移動する脳室下帯由来の神経細胞を培養し、Shootin1bの局在を調べたところShootin1bが移動する神経細胞の先端突起の先端に濃縮することがわかった。さらにmRFP- Shootin1bを発現させてライブイメージングを行ったところ、Shootin1bが先端突起先端にダイナミックに濃縮し、その濃縮

に伴って先端突起が伸長することがわかった。また、Shootin1ノックアウトマウス由来の神経細胞やShootin1ドミナントネガティブ体を発現した神経細胞では神経細胞の移動速度が有意に遅くなった。さらに、Shootin1ノックアウトマウス由来の神経細胞を脳に移植し嗅球へ向かう移動速度を解析したところ、その移動速度が有意に遅くなることがわかった。以上の結果から、Shootin1bが嗅球神経細胞の細胞移動に関与することが明らかとなった。

(6) Shootin1bは先端で重合・脱重合をするアクチン線維を細胞接着タンパク質に連結して神経細胞移動のための駆動力を生み出す：

さらに、Shootin1bがいかにして神経細胞の移動に関与するかを調べるためにHaloTag-Shootin1bを神経細胞に発現させて1分子計測を行ったところ、Shootin1bが先端突起先端で重合・脱重合(treadmilling)を繰り返すアクチン線維と相互作用することがわかった。また、免疫沈降実験と精製タンパク質を用いたin vitro binding assayにより、Shootin1bが細胞接着分子L1-CAMと直接相互作用することもわかった。さらに牽引力顕微鏡を用いて神経細胞が細胞外基質に対して生み出す力を計測したところ、Shootin1ノックアウトマウス由来の神経細胞では、先端突起の先端が基質に対して生み出す推進力が低下していた。以上の結果から、Shootin1bが先端で重合・脱重合をするアクチン線維を細胞接着タンパク質に連結することにより細胞移動のための駆動力を生み出すことが示唆された。

(7) ゼブラフィッシュにおけるShootinの発現および機能解析：

In situ hybridization法を用いてゼブラフィッシュにおけるShootinの発現を調べたところ、Shootin1とShootin3が受精卵に発現することがわかった。また、Shootin2とShootin3は発生時期の脳神経系に広範囲に発現をし、Shootin1は前脳腹側部に局在して発現していた。

そこで、Shootin1、Shootin2、Shootin3の、ゼブラフィッシュの変異体をCrisper-Cas9を用いて作製し、発生初期の細胞移動をライブイメージングで解析したところ、Shootin3変異体において発生初期の細胞移動に遅れが生じることがわかった。また、XTC線維芽細胞を用いて細胞内1分子計測を行ったところ、ゼブラフィッシュのShootin1、Shootin2、Shootin3が細胞の先端で重合・脱重合(treadmilling)を繰り返すアクチン線維と相互作用をすることが明らかとなった。

本研究の結果から、哺乳類のShootin1に新たなスプライシングバリエーションShootin1bが存在することがわかった。Shootin1bノック

クアウトマウスでは軸索ガイダンスの異常に加えて、嗅球の形成不全が認められた。これに関連して、Shootin1b が嗅球を形成する神経細胞の移動に関与することと、移動する神経細胞の先端で (treadmilling) を繰り返すアクチン線維を細胞接着タンパク質に連結して神経細胞移動のための駆動力を生み出すことも明らかになった。また、ゼブラフィッシュにおいて新たな Shootin 遺伝子が見つかり、これら細胞移動に関与することを示唆するデータが得られた。

以上の結果から、Shootin がアクチン線維と細胞接着分子を連結することで細胞移動のための力を生み出し、組織の形成を制御する可能性が示唆された。今後の詳細な解析により、細胞-細胞間あるいは細胞-基質間の力を視点とした組織形成機構とその破綻による病態がより明らかとなることが期待される。

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 3 件)

① Higashiguchi, Y., Katsuta, K., Minegishi, T., Yonemura, S., Urasaki, A. and Inagaki, N., Identification of a shootin1 isoform expressed in peripheral tissues, *Cell Tissue Res.*, 査読有, 366, 2016, 75-87

DOI 10.1007/s00441-016-2415-9

② Tahara, K., Tsukui, M., Maeno, T., Inagaki, N. and Kikuchi, J., Efficient Solid-Phase Gene Delivery Mediated by Cerasome: Effect of Reverse Procedure on Transfection Performances in Comparison with Solution-Based Method, *Chem. Lett.*, 査読有, 44, 2015, 1643-1645, DOI:org/10.1246/cl.150777

③馬場健太郎, 浦崎明宏, 稲垣直之, ラージゲルプロテオミクスを基盤とした神経細胞の軸索形成とガイダンスの解析, *生物物理化学 電気泳動*, 査読有, 第 58 巻第 2 号, 2014, 49-52

DOI:10.2198/sbk58.49

[学会発表] (計 12 件)

① Inagaki, N., Molecular Mechanism for Axon Outgrowth and Neuronal Network Formation, Colorado State University Seminar (招待講演), 2016 年 12 月 8 日, デンバー (U.S.A.)

② Inagaki, N., Abe, K., Katsuno, H., Baba, K. and Watanabe, R., Axonal Haptotaxis Mediated by Grip and Slip between Cell Adhesion Molecule and Adhesive Substrates., 2016 The American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2016 年 12 月 3-7 日, サンフランシスコ (U.S.A.)

③ Kono, T., Nakazawa, H., Colleen F. Manning, James S. Trimmer, Kohno, K., Urasaki, A. and Inagaki, N., The role of singar during neuronal circuit development, 第 39 回日本神経科学大会, 2016 年 7 月 20-22 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

④ 稲垣直之, Molecular mechanics for axon outgrowth and navigation, The Rri-lateral NAIST-TLL-CU Joint Symposium 2016 (招待講演), 2016 年 3 月 28 日, 奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県生駒市)

⑤ Urasaki, A., Matsui, T., Kawakami, K., Bessho, Y. and Inagaki, N., Role of shootin1 during embryonic development in zebrafish, 2014 American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2015 年 12 月 6-10 日, フィラデルフィア (U.S.A.)

⑥ 稲垣直之, 軸索伸長・ガイダンスのメカニクス, 第 6 回神経科学と構造生物学の融合研究会 (招待講演), 2015 年 11 月 26 日, 岡崎統合バイオサイエンスセンター (愛知県岡崎市)

⑦ Inagaki, N., Molecular Mechanism for Axon Outgrowth and Neuronal Network Formation, 7th Annual National Convention of Philippine Society for Developmental Biology (招待講演), 2015 年 10 月 24 日, University of the Philippines Diliman (フィリピン)

⑧ Kono, T., Nakazawa, H., Colleen, F Manning., James, S Trimmer., Kono, K., Urasaki, A. and Inagaki, N., In vivo function of singar which regulates polarity of cultured hippocampal neurons, 2015 年 7 月 28-31 日, 日本神経科学学会大会, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

⑨東口泰奈, 伊波幸紀, 勝田和夫, 米村重信, 稲垣直之, 上皮における新規タンパク質 shootin1b の機能解析, 第 67 回日本細胞生物学会, 2015 年 6 月 30 日, タワーホール船橋 (東京都江戸川区)

⑩高野拓郎, 中澤瞳, Colleen F Manning, James S Trimmer, 河野憲二, 浦崎明宏, 稲垣直之, 生体内における神経極性安定化因子 Singar の役割の解析, 第 37 回日本神経科学学会, 2014 年 9 月 11-13 日, パシフィコ横浜 (横浜市)

⑪吉田互, 島田忠之, 鳥山道則, Colleen F Manning, 河野憲二, James S Trimmer, 稲垣直之, 脳発生における Shootin1 と Shootin2 の機能解析, 第 37 回日本神経科学学会, 2014 年 9 月 11-13 日, パシフィコ横浜 (横浜市)

⑫浦崎明宏, 渡瀬恵美子, 松井貴輝, 川上浩一, 別所康全, 稲垣直之, ゼブラフィッシュを用いた脳形成における Shootin1 の役割の解析, 第 66 回日本細胞生物学会大会, 2014 年 6 月 11-13 日, 奈良県新公会堂東大寺総合文化センター (奈良市)

〔図書〕（計 2 件）

- ① 勝野弘子, 稲垣直之, 神経細胞極性, 脳科学辞典(林康紀 他編), 2015
DOI : 10.14931/bsd.7001
- ② 久保祐亮, 浦崎明宏, 稲垣直之, CRMP2 (改訂版), (林康紀 他編), 2017
DOI:10.14931/bsd.2286

〔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

<http://bsw3.naist.jp/inagaki/>

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・教授
研究者番号：20223216

(2) 連携研究者

浦崎 明宏 (URASAKI Akihiro)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・助教
研究者番号：40550083

作村 諭一 (SAKUMURA Yuichi)
愛知県立大学・情報科学研究科・准教授
研究者番号：40550083