

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430045

研究課題名(和文)細胞骨格調節因子FILIPの神経突起伸展調節機構に関わる機能解析

研究課題名(英文)Study of the function of FILIP on the neuron morphology

研究代表者

八木 秀司 (Yagi, Hideshi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10303372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経系を構成する神経細胞の機能を明らかにするため、神経細胞の形態を調節する機構について研究を行った。中枢神経系や脊髄神経節に発現しているFILIPは、細胞内のミオシンの細胞内での分布を制御することで、神経細胞の形態を調節している。今回の研究で、この調節機構にHsc70の機能が必要であることが判明した。また、FILIPによる神経細胞の形態調節にもHsc70の機能が必要であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of morphological control of neurons that have an essential role in the function of the nervous system. FILIP which expression is observed in the central nervous system and spinal ganglia controls neuronal cell morphology through the control of intracellular distribution of non-muscle myosin IIB. In this study, we revealed that the function of Hsc70 was indispensable for the control mechanism of non-muscle myosin IIB via FILIP. We also revealed that the function of Hsc70 was involved in the function of FILIP that controls neuronal morphology.

研究分野：神経科学

キーワード：ミオシン アクチン 神経細胞

### 1. 研究開始当初の背景

神経発生時に各種分泌蛋白や受容体により神経突起の伸展方向が決定され、回路形成がなされる。この神経突起の伸展に関わる分子群(セマフォリンとその受容体(プレキシン等)など)が重要な役割を果たしていることが知られている(Hur et al.)。セマフォリン等の因子は、神経突起先端部にある成長円錐を誘因もしくは反発することで、伸展の方向性が決定される。このとき、神経突起内でのミオシン活性化の調節が伸展の方向性を決定するために重要な役割を果たしている(Brown & Bridgman)。つまり、外部からの情報により、神経突起内のアクトミオシンが変化し、その神経突起の伸展方向の決定、退縮などが引き起こされている。以前より、脊髄神経節の神経細胞は、神経突起の伸展の研究に用いられてきた。しかしながら、多種類の神経細胞が混在している脊髄神経節神経細胞を区別せずに扱った報告が多い。脊髄神経節神経細胞の種類によって、脊髄に終止する様式や再生時の神経突起の伸展が異なる(Leclere et al.)ことから、それぞれの神経細胞に特徴的な機構が存在することが考えられる。この違いをもたらす機構は、転写因子や細胞表面の分子の発現の違いに求められている(Leclere et al.)が、いまだに全貌は明らかにされていない。

FILIPは神経発生時に神経細胞移動調節を行う分子として解析され(Nagano et al.)、さらに、興奮性シナプスが構築される神経細胞樹状突起上の棘突起の形態がFILIPにより調節されていることが判明した。FILIPが直接にミオシン分子に結合し細胞内局在を変化させることにより、この棘突起の形態調節が行われることを見いだした(Yagi et al.)。

FILIPのミオシンに対する作用を考慮すると、細胞骨格に対する直接の作用により神経突起の伸展が調節されている可能性があり、FILIPの発現の有無が脊髄神経節神経細胞の種類の違いによる脊髄への終止様式や神経突起伸展に差をもたらしていると考えられる。

最近、統合失調症患者における解析で、FILIPの遺伝子変異が報告された(Gulsuner et al.)。FILIPは脳内でも、特に嗅覚伝導に関わる部位に強く発現している。統合失調症の症状には、嗅覚の異常が含まれており、FILIPの変異に伴う神経回路網の異常が統合失調症の症状と関わる可能性も考えられる。さらに、FILIP遺伝子欠損マウスの視覚野では、皮質内での興奮の伝播の低下を認めている。また、神経回路形成に重要な役割を持つセマフォリンの受容体であるプレキシンの一つがFILIP遺伝子欠損マウスの大脳皮質で発現が低下している可能性を見いだしている。これらは、大脳皮質においても神経突起伸展の制御機構にFILIPが関与し、FILIPの欠損により皮質神経回路に異常を来している可能性を示している。FILIPの機能解析

が病態の解析にもつながる可能性が高いと考えている。

### 2. 研究の目的

今までに我々は、細胞骨格の制御系として、細胞内のミオシンの局在および活性を調節する分子FILIPの発現の有無により脳内の部位特異的に棘突起の形態が調節されていることを見いだした。今回、アクチン・ミオシンの調節系が重要な役割を果たしている神経突起伸展に関して、FILIPによるアクトミオシンの調節について検討を行うことで、神経細胞の機能に重要な突起伸展に関わる機構を明らかにすることを目的とした。神経細胞、特に神経突起でのミオシンの細胞内局在の調節機構については、いまだに不明な点がある。FILIPの今までの解析より、本研究では神経突起伸展時のミオシンの神経細胞内における局在調節について新しい知見が得られ、神経突起伸展の新しい機構が明らかに出来ると考えた。また、FILIPが発現している細胞が限られていることより、同じ細胞外からのシグナルを受けた機能の異なる神経細胞の突起伸展形式が異なる理由を説明できると考えた。さらに、本研究により、FILIPによる神経突起伸展機構が回路網の形成に働く機構の一部として明らかに出来ると考えており、この機構の解明が病態における脳機能の異常の解明に将来的に結びつけることが可能となる。

### 3. 研究の方法

以下の検討を行うため本研究に含まれている動物実験に関しては、兵庫医科大学動物実験規程に基づき、兵庫医科大学動物実験委員会の審査を受け承認された。また、遺伝子組換え実験に関して、兵庫医科大学遺伝子組換え実験安全管理規程に基づき、兵庫医科大学遺伝子組換え実験委員会の審査を受け承認された。

(1) 組織化学的な脊髄神経細胞の可視化による検討

FILIPは成体の脊髄神経節に存在する様々な神経細胞のうち特定の細胞に発現していることを見いだしている。まず、この細胞集団の中での発現パターンについてFILIP遺伝子欠損マウスを用いて、免疫組織化学法により検討を行った。胎生期のマウスの神経節細胞、および成体の脊髄神経節細胞を検討するため、4%パラフォルムアルデヒドを用いて固定した後、凍結切片を作成し、FILIP発現細胞の同定をFILIP遺伝子欠損マウスにおけるガラクトシダーゼの発現を見ることで評価した。さらに、脊髄神経節神経細胞のFILIPを発現する特定の神経細胞の軸索を、その発現している分子に対する抗体もしくは、結合する分子を用いて免疫組織化学法により可視化し、その神経突起の終末の状態を皮膚、および脊髄にて検討を行った。

また、様々な蛋白質の分布に関して検討す

る場合にも、免疫組織化学法を用いた。免疫組織化学法は、それぞれの蛋白質に対応した一次抗体を反応させた後、蛍光標識された二次抗体を用いて、可視化を行った。画像は共焦点顕微鏡を用いて取得した。

#### (2) 胎生期の脊髄神経節神経突起伸展の検討

この検討のため、胎仔を用いた wholemount immunohistochemistry を行った。本方法は、胎仔を 4%パラフォルムアルデヒドで固定後、前処置を行い、神経軸索に存在する蛋白質に対する抗体を用いて、免疫組織化学法で神経突起を染色した後、胎仔を透明化し神経軸索の伸展の違いを評価した。

#### (3) 脊髄神経節細胞の培養

胎生期の脊髄神経節を取り出し、その脊髄神経節内に存在する神経細胞を単離した後、細胞外基質をコートしたガラスボトムディッシュの上で培養した。培養は神経細胞用の培地を用い、37℃ 5%二酸化炭素の条件下で行った。その後、神経突起伸展に関して検討を行った。

#### (4) FILIP と結合する分子の検索

FILIP はアクチン結合蛋白質と結合することが判明しているが、機能ドメインは明らかでは無い。何らかの活性を有する他の蛋白質と結合し、その蛋白質の機能により細胞骨格の調節を行っている可能性を考え、FILIP 分子と結合する分子を探索した。この一つとして Pull-Down 法を用いた。これは、FILIP 分子の一部分を GST 蛋白質との結合蛋白質として発現するベクターを作成し、蛋白を大腸菌に発現させた。その後、発現した蛋白質を回収し、細胞より抽出した蛋白質と反応させ、精製したのち、SDS-PAGE で分離回収した。その回収した蛋白質を質量分析器で同定を行った。また、FLAG タグの付いた FILIP 分子を発現するプラスミドベクターを培養細胞内に導入し、FILIP が発現した細胞の蛋白質を取得し、FLAG に対する抗体を用いて、FILIP と共に結合する蛋白質を回収し、SDS-PAGE にて蛋白を分離し、Western Blot 法を用いて同定した。神経細胞の形態の検討は以下の方法で行った。胎生期の脳から、神経細胞を単離し、神経細胞用の培地中で培養した。FILIP 発現ベクターを導入し、同時に導入し発現した蛍光蛋白質により、細胞を可視化し、共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した。

#### (5) 脊髄神経節神経細胞における神経突起伸展に関わる受容体の発現の検討

in situ hybridization 法を用いて、プレキシンと共にセマフォリンの受容体を構成するニューロピリンの分布を検討した。脊髄神経節の凍結切片を作成し、前処理後、RI ラベルを行ったニューロピリンに対するプローブを反応させ、乳剤にて検出し、その分布を検討した。

## 4. 研究成果

#### (1) アクチン結合蛋白質の脊髄神経節内での発現

FILIP 分子はアクチン結合蛋白質に影響を与えるという知見から、アクチン線維に影響を与える分子群を中心に、その脊髄神経節内の発現について、免疫組織化学法を用いて検討した。軸索の伸展に影響を与えると考えていた数種類のアクチン結合蛋白質の分子群の発現は FILIP 遺伝子欠損マウスの脊髄神経節内での発現分布は正常と比較して、調べた発達段階においては明らかな異常を示していないと判断した。

#### (2) 胎生期の脊髄神経節から伸展する神経線維の検討

wholemount immunohistochemistry 法を用い胎生期の脊髄神経節からの神経線維の伸展度について検討した。FILIP 遺伝子欠損マウスでは、ある時期の神経線維の長さは短い傾向にあった。しかしながら、成体に関して、皮膚に分布している知覚神経に関して、免疫染色法を用いて検討を行った結果、その神経軸索の分布には大きな異常を認めなかった。これらの結果から、胎生期に認められた伸展の差異は、成体時には、大きな異常をもたらしていない可能性が高いと考えられた。

#### (3) 培養脊髄神経節による軸索伸展の検討

脊髄神経節の神経細胞を培養し、その突起伸展の有無に関して評価を行った。観察した脊髄神経節神経細胞全体に対する神経突起を有する細胞の比率に関して検討を行った。現在までの検討では FILIP の有無にかかわらず、その比率に明らかな差を認めなかった。

#### (4) FILIP と結合する分子の検索

FILIP 分子と結合する分子についてアクチン結合蛋白質以外の分子を探索した。その結果、Pull-Down 法で FILIP 分子はシャペロン蛋白質の一つである Hsc70 と結合することが判明した。また、免疫沈降法でも、FILIP が Hsc70 と結合することが判明した。さらに、FILIP 分子と Hsc70 は生体内の組織でも結合していることを見いだした。FILIP はアクチンと結合して機能を発揮する非筋肉型ミオシン分子の動向を調節しているが、FILIP とミオシン分子の結合に Hsc70 の結合の有無が影響を与えないことを明らかにした。Hsc70 は ATPase 活性を有する。その Hsc70 の ATPase 活性の阻害剤を投与すると、FILIP によるミオシンの細胞内局在に対する影響は低下していた。FILIP のミオシンに対する作用に Hsc70 の機能が重要であることが判明した。つまり、FILIP がミオシンと結合するのみでは、ミオシン分子の細胞内での分布に影響を与えることは出来ないが、Hsc70 が結合することでミオシンの細胞内分布に影響を与えることが可能になることが判明した。この機構が、神経細胞内で実際に機能しているか、培養神経細胞を用いて検討を行った。その結果、ミオシンと結合できるが Hsc70 と結合できない FILIP 変異分子では、神経の形態に対する作用は低減してい

ることが判明した。さらに、Hsc70 の阻害剤を用いると、FILIP の神経細胞の形態に及ぼす影響は低減していることが判明した。つまり、FILIP は Hsc70 と共に、神経細胞の形態に影響を及ぼしていることが明らかになった。この結果により、神経細胞の突起や形態形成に関しての、新しい機序を明らかにすることが出来た。本結果は、論文として公表した。

(5) 脊髄神経節神経細胞における神経突起伸長に関わる受容体の発現

脊髄神経節内にセマフォリンの受容体と考えられているニューロピリンが発現している事を確認できた。

#### 引用文献

Hur, E. M., Saijilafu & Zhou, F. Q. Growing the growth cone: remodeling the cytoskeleton to promote axon regeneration. *Trends Neurosci* **35**, 164-174 (2012).

Brown, J. & Bridgman, P. C. Role of myosin II in axon outgrowth. *J Histochem Cytochem* **51**, 421-428 (2003).

Leclere, P. G., Norman, E., Groutsi, F., Coffin, R., et al. Impaired axonal regeneration by isolectin B4-binding dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Neurosci* **27**, 1190-1199 (2007).

Nagano, T., Yoneda, T., Hatanaka, Y., Kubota, C., et al. Filamin A-interacting protein (FILIP) regulates cortical cell migration out of the ventricular zone. *Nat Cell Biol* **4**, 495-501 (2002).

Yagi, H., Nagano, T., Xie, M. J., Ikeda, H., et al. Filamin A-interacting protein (FILIP) is a region-specific modulator of myosin 2b and controls spine morphology and NMDA receptor accumulation. *Sci Rep* **4**, 6353 (2014).

Gulsuner, S., Walsh, T., Watts, A. C., Lee, M. K., et al. Spatial and temporal mapping of de novo mutations in schizophrenia to a fetal prefrontal cortical network. *Cell* **154**, 518-529 (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 1件)

Yagi H, Takabayashi T, Xie MJ, Kuroda K, Sato M. Subcellular distribution of non-muscle myosin IIb is controlled by FILIP through Hsc70. *PLoS ONE* **12**, e0172257 (2017) 査読有

[学会発表](計 2件)

八木秀司 細胞骨格の調整による神経細

胞の形態制御機構 第130回 関西実験動物研究会(神戸大学医学部:兵庫県神戸市) 2016年6月17日

Hideshi Yagi, Hirosato Kanda, Koichi Noguchi, Makoto Sato. Deletion of FILIP influenced the development of peripheral nerve. 第58回 日本神経化学会大会(大宮ソニックシティ:埼玉県さいたま市)2015年9月13日

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

八木 秀司 (YAGI, Hideshi)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10303372

##### (2) 研究分担者

佐藤 真 (SATO, Makoto)  
大阪大学・大学院連合小児発達学研究所・教授  
研究者番号: 10222019

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

##### (4) 研究協力者

( )