

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640043

研究課題名(和文)新奇セマフォリン受容体阻害剤による中枢神経再生能賦活化への挑戦

研究課題名(英文) Axon regeneration in the central nervous system with a novel blocker for semaphorin

研究代表者

生沼 泉 (Oinuma, Izumi)

兵庫県立大学・生命理学研究科・教授

研究者番号：40452297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：活性化型のR-Rasは、神経軸索の伸長と分枝の促進を引き起こすことを以前の研究で明らかにしている。R-Rasによる軸索形態制御のメカニズムを明らかにすることは、神経再生ターゲット分子の解明につながることから、活性化型特異的なR-Ras結合分子を探索した。その結果得られたアクチン結合蛋白質afadinについての評価を行った。さらに、afadinの軸索分枝調節の生理活性の発揮機序についての解析過程で、afadinには軸索伸長を正・負に制御する2つの選択的スプライシングアイソフォーム、l-afadin, s-afadinが存在することが明らかになったので、各アイソフォームの機能解析も行った。

研究成果の概要(英文)：We have reported that GTP-bound R-Ras stimulates axonal elongation and branching in cultured neurons. Elucidation of regulatory mechanisms for axonal morphogenesis by active R-Ras is helpful for axonal regenerative study, and we searched for R-Ras-binding proteins responsible for axonal development through yeast-two-hybrid screening. Through the screening, we identified an actin-binding protein, afadin, for R-Ras binding partner mediating axonal branching. We further identified alternative variants for afadin, l-afadin and s-afadin, and their opposite roles for inducing axonal branching.

研究分野：神経科学

キーワード：axon small GTPase R-Ras axon regeneration actin

1. 研究開始当初の背景

現在までに、様々な神経誘導因子が同定されているが、その生理活性から大きく2つのグループに分類され、1つは神経突起を誘引したり伸長を促進する分子で、netrinファミリーやNGL-1が知られている。もう1つのグループは神経突起を反発させたり伸長を阻害する因子で、Semaphorin(Sema)ファミリー、slitファミリー、ephrinファミリーなどがある。細胞内情報伝達機構やその調節因子などについては、長年、数あるガイダンス因子に関して、各々に特化し、細分化された断片的な情報が散在していたが、近年、申請者や他グループの研究によって、神経突起を誘引したり伸長促進する分子は低分子量Gタンパク質R-Rasの活性を上昇させ、逆に、神経突起を反発させたり伸長阻害する因子はR-Rasの活性を低下させることがわかってきた(Oinuma et al., *Science*, 2004, Toyofuku et al., *Nat. Neurosci.*, 2005, Dail et al., *J. Cell Sci.*, 2006)。さらに、海馬や大脳皮質の神経細胞を用いた実験で、全てのSemaファミリーは受容体Plexinを介してR-Rasを不活性化することで中枢神経軸索の伸長を抑制することを申請者は明らかにしてきた(Oinuma et al., *J. Neurosci.*, 2004; Ito and Oinuma et al., *EMBO Rep.*, 2006)。R-RasはRasファミリーに属する低分子量Gタンパク質で、細胞膜の伸展やPI3-キナーゼ経路の活性化により、神経繊維の伸長を促進する神経伸長促進分子である(Oinuma et al., *J. Biol. Chem.*, 2007)。これらの成果から、神経細胞内におけるR-Rasの活性状態の制御は神経繊維の伸長におけるキーファクターであると言える。そこで、申請者は、神経伸長阻害の生理活性を持つSemaの受容体、Plexinの持つR-Ras不活性化触媒活性(R-Ras GAP活性)を特異的に阻害することで、中枢神経繊維軸索の形態学的再生、さらには機能的再生が可能となるのではないかと考えられる。

本研究は、軸索形態調節に関わるR-Rasの下流シグナル分子の同定、さらにはその下流シグナル分子の操作により、軸索再生を目指し、研究を行うこととした。

2. 研究の目的

ES細胞やiPS細胞由来の神経幹細胞の移植治療による損傷中枢神経の再生治療は近年、国民の関心や期待を集めている。しかしながら、損傷組織では神経伸長阻害作用を持つセマフォリンが誘導され、移植した神経幹細胞からの神経繊維の伸長が妨げられて結局再生ができない。申請者らは、神経細胞内在性に神経再生を阻害しているシグナル伝達経路を明らかにし、それを操作することにより、神経繊維再生を目指した。本研究は神経再生阻害の分子基盤の研究であり、再生分野の開拓的發展に相乗的に寄与できると考えられる。

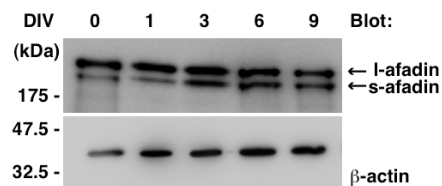
3. 研究の方法

我々は、以前の研究で、活性化型(GTP結合型)の低分子量G蛋白質は、神経軸索の伸長と分枝の促進を引き起こすことを以前の研究で明らかにしている。R-Rasによる軸索形態制御のメカニズムを明らかにすることは、神経再生ターゲット分子の解明につながることから、酵母two-hybrid法を用いて、活性化型特異的なR-Ras結合分子を探索した。その結果得られたアクチン結合蛋白質afadinについて、*in vitro*での結合実験、初代培養大脳皮質神経細胞を用いた軸索形態の評価を行った。

さらに、afadinの軸索分枝調節の生理活性の發揮機序について詳細に検討、抗体を作製しての発現パターンの解析を行った。その解析過程で、afadinには軸索伸長を正・負に制御する2つの選択的スプライシングアイソフォーム、l-afadin, s-afadinが存在することが明らかになったので、各アイソフォームの機能解析も行った。

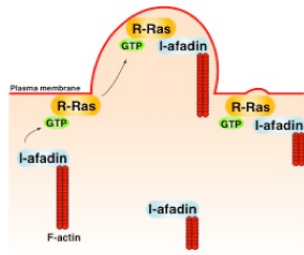
4. 研究成果

(1) われわれは、従来の研究で、afadinによる軸索分岐促進を明らかにしていた。平成28年度の研究で、そのafadinには軸索分枝に促進的に働くl-afadinと、l-afadinによる軸索分枝促進に対してドミナントネガティブに働くs-afadinの2つのアイソフォームが存在すること、また、それらの神経軸索分枝に対する機能を明らかにした。まず、ラット初代培養神経細胞の発達過程において、L体が培養初期から恒常的に発現しているのに対し、S体は培養後3日目以降に遅れて発現してくることを明らかにした。生体組織内での発現の検討においても、出生前から発現しているL体に対し、S体は出生後から発現してくることが明らかになった。

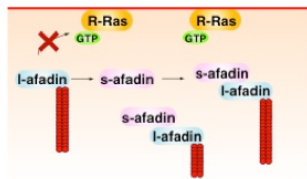


(培養神経細胞発達過程におけるL体およびS体の内在性タンパク質の発現変化)

さらに、各々の発現を特異的に抑制するshRNAを用いた機能解析を行い、L体のノックダウンにより、大脳皮質神経細胞の軸索の分岐が抑制される一方で、S体のノックダウンにより、逆に、軸索分枝の促進が確認された。



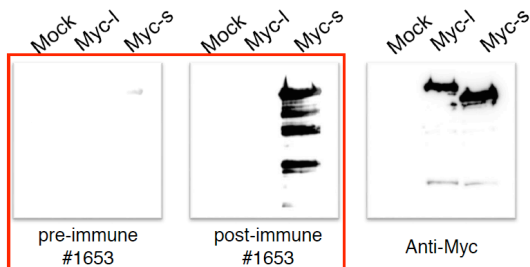
(L体による軸索分枝促進)



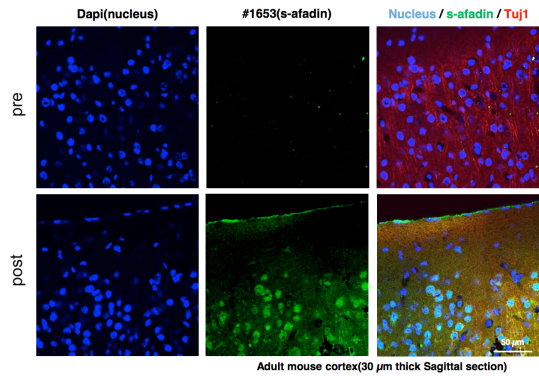
(S体によるL体抑制による軸索分枝抑制)

この成果により、内在性のS体の発現抑制により、神経軸索の成長促進を引き起こすことができることが明らかになったことから、今後、S体の操作による損傷神経軸索の再生が可能であるかの検証を行う。

(2) 損傷神経組織内でのafadinのS体およびL体の発現量や局在の差違を調べるために必要となる、S体特異的抗体の作出を行った。具体的には、選択的スプライシングで付加されるS体に特異的な配列を含むペプチド抗原をウサギに免疫し、得られた抗血清について、ウエスタンブロット法および免疫組織化学法を用いて、特異性を検証した。その結果、S体およびL体を過剰発現させた293T細胞の細胞抽出液を用いたウエスタンブロット法により、得られた抗血清はS体タンパク質を特異的に認識することが明らかになった。



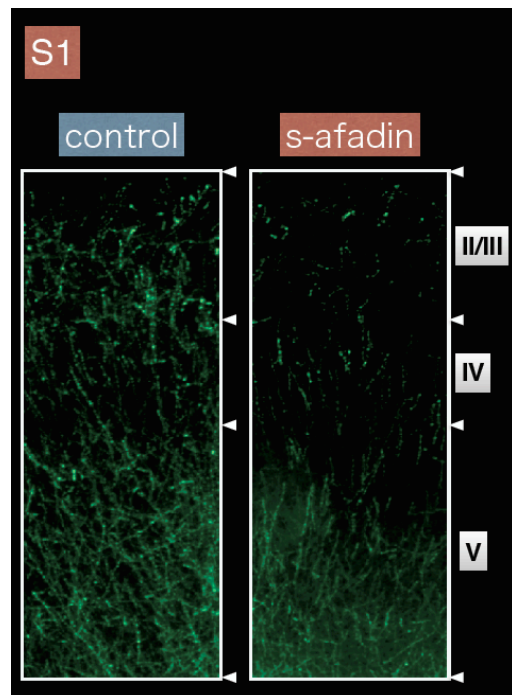
さらに、成体の大脳皮質切片に対する免疫組織化学法により、得られた抗血清による特異的シグナルを得た。以上から、afadinのS体に特異的な抗体が得られたと考えられることから、今後、この抗体を用いて、損傷神経組織内での、神経軸索成長阻害因子としてのS体タンパク質の誘導を検証する予定である。



Adult mouse cortex(30 μm thick Sagittal section)

(3) S体の発現制御による神経軸索繊維再生応用を目指し、神経細胞内在性のafadinを遺伝子置換するのに必要なゲノム編集の技法の構築を行った。この技法により、s-afadinおよびl-afadinの各アイソフォームを標識することに成功した。今後、この技法を用い、内在性のs-afadinの発現操作を行うことで、損傷神経繊維の再生が起こるかを検証する予定である。

(4) S体の大脳皮質神経細胞での過剰発現による影響の検証を行った。具体的には、マウス大脳皮質体性感覚野2/3層の神経細胞にS体を発現させることで、軸索形態に与える影響を観察した。その結果、S体の発現は、大脳皮質神経軸索の成長を負に制御し、特に、対側での軸索の分枝を抑制することが観察されたことから、*in vivo*においてもS体は軸索の成長に負に作用することが明らかになった。このことから、今後は、S体特異的に発現を抑制させることにより、損傷神経繊維の再生が起こるかを、検証する予定である。



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2件)

- ① Umeda K., Iwasawa N., Negishi M. and Oinuma I.

A short splicing isoform of afadin suppresses the cortical axon branching in a dominant-negative manner.
Mol. Biol. Cell, 26:1957-1970, 2015.
doi: 10.1091/mbc.E15-01-0039.

- ② 生沼泉

軸索ガイダンス分子セマフォリンの情報伝達機構
Journal of Japanese Biochemical Society, 87:428-437, 2015.
doi:10.14952/SEIKAGAKU.2015.870428.

[学会発表] (計2件)

- ① Izumi Oinuma

Live-cell imaging and functional analysis of endogenous neuronal proteins by CRISPR/Cas9-mediated genome editing.
平成28年度日本生化学会大会 (招待講演)
東北大学 (宮城県仙台市)
2017年9月25日~27日

- ② 生沼泉、根岸学

軸索形態調節における R-Ras サブファミリー低分子量 G タンパク質の役割
第121回日本解剖学会総会・全国学術集会(招待講演)
ビッグパレット福島 (福島県郡山市)
2016年3月28日~30日

[図書] (計1件)

- ① Negishi M. and Oinuma I.

Semaphorin Receptors and Their Signaling.
発行年 2015年
総ページ数 17 ページ

[その他]

研究科ホームページ

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/edu/kenkyu-u/base25.html>

個人ホームページ

<http://homepage1.canvas.ne.jp/izumi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生沼 泉 (OINUMA, Izumi)

兵庫県立大学・生命理学研究科・教授

研究者番号：4045297