

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：14603

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25102010

研究課題名(和文) 生体分子素子の自己組織化による細胞の動的秩序形成

研究課題名(英文) Dynamic ordering of cellular functions through self-assembly of component molecules

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 75,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経軸索の伸長とガイダンスを担うShootin1およびCortactin、L1-CAMからなる分子集合体を同定した。この分子集合体は、細胞外の軸索誘引分子Netrin-1の僅かな濃度の違いを検知して集合離脱を行うことで正しい軸索の伸長方向を決定する。また、この分子集合体と細胞外基質との機械的な相互作用を介した新たな軸索ガイダンスの仕組みが明らかとなり、小児の神経難病L1症候群ではその破綻が起こることもわかった。さらに、Shootin1およびCortactin、L1-CAMからなる分子集合体が細胞移動や新たな細胞内分子輸送機構にも関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified a molecular assembly, consists of shootin1, cortactin and L1-CAM, which is involved in neuronal axon outgrowth and guidance. This molecular assembly senses shallow gradients of extracellular netrin-1 concentration and decides the direction of axon outgrowth through its spatially regulated assembly and disassembly. This assembly is also involved in a new type of axon guidance mechanism which utilizes mechanical slippage between L1-CAM and adhesive substrates. This mechanism is disrupted in a human patient of L1-CAM/CRASH syndrome, suffering corpus callosum agenesis and corticospinal tract hypoplasia. Furthermore, the molecular assembly, consists of shootin1, cortactin and L1-CAM, mediates cell migration and a new type of intracellular molecular transport mechanism.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経細胞 軸索 アクチン 自己組織化 メカノバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

細胞内では、その構成分子が動的な集合体を形成することにより、例えば細胞の形態変化や運動といった、様々な高次機能を発現する。しかしながら、このようなマクロレベルでの細胞機能の発現をミクロレベルの分子素子の動的な構造変化や自己組織化の視点に立脚して解析した試みは、これまでにほとんどなされていない。

これまでに、我々は神経細胞の軸索を伸長させる分子 Shootin1 が同定していた (Toriyama et al, *J Cell Biol* 2006)。また、軸索の伸長は、神経ネットワーク形成時に誘引分子に導かれて正しい方向へと誘導されるが、軸索先端で方向性を持った集合・離散を繰り返すアクチン線維が軸索先端の移動のための駆動力を提供する可能性が示唆されていた。最近我々は、軸索先端において軸索誘引分子 Netrin-1 により活性化されたリン酸化酵素 PAK1 が、Shootin1 のリン酸化を介して Shootin1 とアクチン線維との複合体形成を引き起こすことを見出した (Toriyama et al, *Curr Biol* 2013)。さらに、Shootin1 は細胞接着分子 L1 とも相互作用し (Shimada et al, *J Cell Biol* 2008)、Shootin1 とアクチン線維の複合体形成は、軸索先端でアクチン線維の集合・離散により生じる駆動力を L1 に伝えて推進力を生み出し、軸索伸長を促進させた。以上の結果から、アクチン線維および Shootin1、L1 は、軸索誘引刺激で生じた細胞内シグナル伝達を軸索伸長を引き起こす力に変換させる動的な集合体を構成することが示唆された (Toriyama et al, *Curr Biol* 2013)。

2. 研究の目的

以上の研究成果を踏まえて、本研究では、このシグナル伝達を力に変換する集合体をモデルシステムとして、分子素子の動的なエネルギー・結合力・構造変化を起点として、時間発展とともに、力の発生、さらには高次の細胞機能へと至る機構の解明を目指す。具体的には、まず、軸索伸長のための駆動力となるアクチン線維の方向性を持った自発的集合・離散の仕組みをエネルギー・結合力・構造変化の視点から解析する。次に、Shootin1-アクチン線維集合体のシグナル→力の変換を担うインターフェースの詳細を解析し、その構造変化および集合・離散の動態を多角的に解明する。また、軸索先端における、i) シグナル→力の変換を担う分子群の集合・離散、ii) それに伴う推進力の発生、iii) および軸索伸長の速度を、培養神経細胞を用いて時間軸に沿って同時にライブ計測する。さらに、これらの研究をもとにして自発的に突起を伸ばす人工系を再構築することにより、細胞運動のための必要十分となる高次分子集合体の全容を解明する。

3. 研究の方法

神経細胞は、ラットあるいはマウスの海馬から一次培養したものを用い、免疫細胞染色は、過去の報告に基づいて行った (Toriyama et al, *J Cell Biol* 2006)。

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 (Kubo et al, *J Cell Biol* 2015)。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。

分子の細胞内ライブイメージングは、蛍光ラベルしたタンパク質を細胞内に発現をさせて蛍光タイムラプス顕微鏡を用いて行い (Toriyama et al, *J Cell Biol* 2006)、1分子計測は蛍光顕微鏡あるいは全反射顕微鏡を用いて行った (Shimada et al, *J Cell Biol* 2008; Abe et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 2018)。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。

4. 研究成果

(1) シグナル伝達を軸索伸長のための力に変換させる動的な分子集合体の解明

我々のこれまでの研究により、Shootin1 がアクチン線維および細胞接着タンパク質 L1-CAM と動的集合体を形成し、軸索誘引分子 Netrin-1 の刺激で生じた細胞内シグナル伝達を軸索伸長のための力に変換することがわかっている。また、我々の予備実験により Shootin1 がアクチン結合タンパク質 Cortactin を介してアクチン線維と集合体を形成することも示唆された。そこで、まず、Shootin1 と Cortactin の相互作用を *in vitro* binding assay と免疫沈降法で解析したところ、Shootin1 と Cortactin が直接結合することが明らかとなった (Kubo et al, *J Cell Biol* 2015)。さらに、Shootin1 (全長 456aa) と Cortactin (全長 509aa) の欠失変異体を作成して結合部位を解析したところ、Shootin1 の 261-377aa が Cortactin の 80-287aa と結合することがわかった。また、免疫細胞染色により Shootin1 と Cortactin が軸索の先端で共局在することが確認された。Netrin-1 の刺激を受けた軸索先端では、リン酸化酵素 PAK1 が Shootin1 の Ser101 と Ser249 をリン酸化させて軸索伸長のための力を生み出す。そこで、Shootin1 を PAK1 によりリン酸化させて Shootin1 と Cortactin の相互作用を解析したところ、Shootin1 と Cortactin の相互作用が Shootin1 のリン酸化により促進されることがわかった (Kubo et al, *J Cell Biol* 2015)。

次に、Shootin1 と L1-CAM の細胞内ドメインとの相互作用を *in vitro* binding assay と免疫沈降法で解析したところ、Shootin1 と L1-CAM も直接結合することが明らかとなった (Baba et al, *eLife, revised*)。さらに、Shootin1 欠失変異体を作成して L1-CAM との結合部位を解析したところ、Shootin1 の

1-125aa が L1-CAM の細胞内ドメインと結合することがわかった。また、免疫細胞染色により Shootin1 と L1-CAM が軸索の先端で共局在することが確認された。さらに、PAK1 による Shootin1 のリン酸化によって Shootin1 と L1-CAM の結合も促進されることがわかった (Baba et al, *eLife*, revised)。

以上の結果から、Shootin1 が Cortactin および L1-CAM と集合体を形成すること、また、Shootin1 が PAK1 によりリン酸化を受けることにより、Shootin1、Cortactin、L1-CAM の集合体の形成が促進することが明らかとなった (図 1、緑矢印)。

さらに、本研究領域の加藤晃一班員、内山進班員との共同研究による native mass 解析により、リン酸化を受けていない Shootin1 が 2 量体を構成することを示唆するデータを得た。また Shootin1 と L1-CAM がそれぞれ 2 分子、1 分子からなる複合体を形成することが明らかとなった。本研究領域の上久保裕生班員との共同研究による X 線溶液散乱でも同様の解析結果が得られている (未発表データ)。

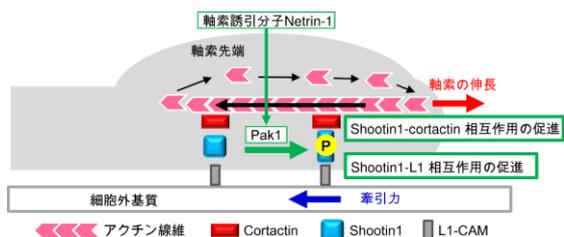


図 1 同定された分子集合体

(2) 構造学的解析および人工膜再構築系を用いた解析

本研究では、①で解析を行った Shootin1 が Cortactin および L1-CAM からなる分子集合体 (図 1) の集合離散に加えて、これをつかさどる分子の構造解析を行った。しかしながら、精製された Shootin1 の結晶化の難しさのために進展が遅れている。現在、この問題を克服するために本研究領域の村田和義班員とクライオ電顕を用いた Shootin1 とリン酸化 Shootin1 の構造解析を進めている。また、上久保裕生班員との共同研究で X 線溶液散乱を用いた構造解析も進行中である。

本研究では、人工膜再構築系を用いた分子集合体の解析も進め、人工膜内でアクチン線維を形成させるところまで成功した。しかし、人工膜内においてのアクチン線維を集合離脱させることの難しさや Shootin1 と Cortactin の不安定性のため、本解析が技術的に必ずしも簡単なものではないことがわかってきた。Shootin1、Cortactin、L1-CAM の集合体 (図 1) の人工膜内での再構築は、今後のさらなる研究課題としたい。

(3) 細胞内における分子集合体の集合・離脱とそれに伴う力の発生および軸索伸長の解析

次に、上述の実験で明らかとなった分子集

合体 (図 1) の神経軸索先端における動態を、1分子計測法と免疫沈降法によって解析した。その結果、Netrin-1 刺激により Shootin1 と Cortactin の相互作用および Shootin1 と L1-CAM の相互作用が細胞内で実際に促進することを示唆するデータが得られた。また、Shootin1 と Cortactin の相互作用を阻害するドミナントネガティブ体と Shootin1 と L1-CAM の相互作用を阻害するドミナントネガティブ体を用いて、軸索先端における Shootin1 と Cortactin の相互作用および Shootin1 と L1-CAM の相互作用を阻害した。その結果、Netrin-1 の刺激によって引き起こされる力の発生が弱まり、軸索の伸長も阻害された。また、神経細胞における Cortactin の発現量を抑制しても同様の結果がみられた。

以上の結果から、シグナル伝達によって引き起こされる Shootin1 と Cortactin の相互作用および Shootin1 と L1-CAM の相互作用が牽引力を発生させて (図 1、青矢印)、軸索の伸長を引き起こすことがわかった (図 1、赤矢印) (Kubo et al, *J Cell Biol*, 2015; Baba et al, *eLife*, revised)。すなわち、Shootin1、Cortactin、L1-CAM の集合離脱がシグナル伝達を軸索伸長のための力に変換するインターフェースとして働くことが本研究で明らかとなった (図 1)。

(4) Shootin1 のリン酸化による軸索方向転換のための Netrin-1 の濃度勾配の検出の解析

神経軸索は細胞外の誘引物質の僅かな濃度差を高感度に検出して伸長方向を決定するが、その分子メカニズムは明らかではない。そこで、マイクロ流路を用いて軸索先端 (成長円錐) の両端に 0.4% の Netrin-1 の濃度差を与えたところ、驚くべきことに成長円錐内において Netrin-1 濃度の濃い側に限局した Shootin1 の強いリン酸化の上昇 (71%) が認められた。さらに、Shootin1 の Ser101 と Ser249 の疑似リン酸化変異体 (Shootin1DD) を用いて、成長円錐内で限局する Shootin1 のリン酸化が起こらないようにすると、軸索の伸長は妨げられないものの Netrin-1 濃度の濃い側へ軸索の方向転換が阻害された。以上の結果から、Shootin1 のリン酸化が軸索方向転換のための Netrin-1 の濃度勾配の検出に重要な役割を果たすことがわかった (Baba et al, *eLife*, revised)。

(5) Shootin1、Cortactin、L1-CAM からなる集合体による新たな軸索ガイダンス機構の解明と小児神経難病 L1 症候群の分子病態の解析

神経軸索は、細胞外基質タンパク質によってもその伸長方向が制御を受けることがわかっており、走触性と呼ばれている。神経細胞をラミニンとポリリジンのマイクロパターン上に培養すると、ラミニンに沿って軸索を延ばしたが (図 2)、Shootin1 や Cortactin、

L1-CAM をノックダウンすると、軸索をラミニンに沿って伸ばすことができなくなった。この結果から、Shootin1、Cortactin、L1-CAM からなる集合体 (図1) がラミニンに向かう軸索の走触性に必要とされることがわかった (Abe et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 2018)。また、軸索の先端では、タイヤにあたる L1-CAM が、ラミニン上では路面にあたる細胞外基質をとらえて (グリップして) 推進力を効率的に生み出し、一方、ポリリジン上ではスリップして推進力が効率的に路面に伝わらないことがわかった。以上の結果から、軸索先端が L1-CAM と路面とのグリップとスリップを巧妙に利用して正しい方向に進んでゆくことがわかった。すなわち、これまでに走触性のモデルとして、軸索先端の細胞内シグナル伝達が重要な役割を果たすことが提唱されていたが、本研究により、シグナル伝達に依存せず、細胞と細胞外環境の間に生じる力と分子の滑りを巧妙に利用した新たな走触性の仕組みが明らかとなった (Abe et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 2018)。

L1-CAM 遺伝子に変異が起こると、軸索ガイダンスの障害や精神発達遅滞、失語症、歩行障害等の症状を伴う小児の神経難病 L1 症候群を引き起こす。今回、L1 症候群の患者由来の L1-CAM では、上記のグリップとスリップの仕組みに障害が生じて、軸索が正しい方向に伸びることができないことも明らかとなった (図2) (Abe et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 2018)。

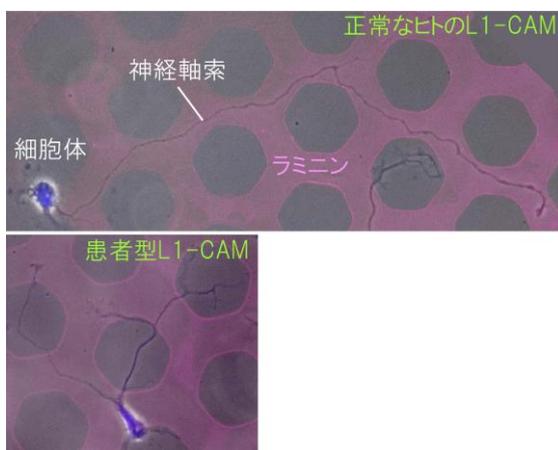


図2 ラミニン (赤) による軸索ガイダンスが L1 症候群の患者型 L1-CAM により破綻する

(6) Shootin による細胞移動の解析

Shootin1 遺伝子は選択的スプライシングにより少なくとも 2 種類のタンパク質を生じることが明らかになった (Higashiguchi et al, *Cell Tissue Res*, 2016)。また、脊椎動物には、Shootin1 に加えて、新たな Shootin ファミリータンパク質 Shootin2 と Shootin3 が存在することもわかった (Urasaki et al, submitted)。興味深いことに、これらの分子の解析の結果、Shootin が上述の軸索伸長やガイダンスのみならず神経細胞の細胞移動

(Minegishi et al, *Cell Rep*, under revision) やゼブラフィッシュ側線原器の細胞集団移動 (Urasaki et al, submitted) を担うことがわかってきた。従って、今回我々が同定した図1の分子集合体が、軸索伸長やガイダンスにとどまらず幅広い細胞形態の制御に関与する可能性が示唆された。

(7) 分子集合体の集合・離脱による新たな細胞内分子輸送機構

神経軸索の伸長・維持に必要な分子は、細胞体で合成され、軸索輸送によって供給される。これまで、アクチンおよびアクチン結合タンパク質を軸索内で輸送する分子機構は不明であった。今回、アクチンおよびアクチン結合タンパク質が、アクチン波として本研究で同定された Cortactin/Shootin1/L1-CAM 集合体 (図1) により軸索内を輸送されることがわかった (矢頭、図3) (Katsuno et al, *Cell Rep*, 2015)。すなわち、細胞膜や細胞外基質に連結したアクチン線維が方向性を持った重合・脱重合を繰り返すことで前進し、一方アクチン結合分子はアクチン線維に結合することで輸送されることがわかった。この仕組みは、従来知られているモータータンパク質を介した細胞内の分子輸送機構とは異なる新しい仕組みである (Katsuno et al, *Cell Rep*, 2015; Inagaki and Katsuno, *Trends Cell Biol*, 2017)。

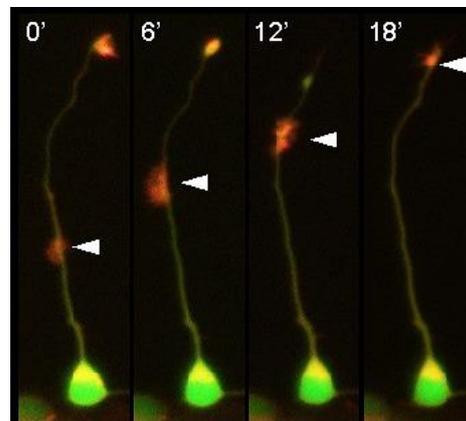


図3 神経軸索内移動するアクチン波
蛍光タンパク質 (RFP) で標識したアクチン (赤色) を遺伝子導入した培養海馬神経細胞を 6 分間隔で撮影した。GFP (緑色) は細胞を表している。軸索の根元で発生したアクチン波が軸索先端へと移動している (白矢頭) ことがわかる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

① Abe, K., Katsuno, H., Toriyama, M., Baba, K., Mori T., Hakoshima T, Kanemura Y., Watanabe, R. and Inagaki, N. (2018) Grip and slip of L1-CAM on adhesive substrates direct growth cone haptotaxis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 115,

2764-2769. doi:10.1073/pnas.1711667115, <http://www.pnas.org/content/early/2018/02/16/1711667115>

② Inagaki, N., Katsuno, H. (2017) Actin waves: origin of cell polarization and migration?, *Trends Cell Biol.*, 査読有, 27, 515-526,

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892417300272?via%3Dihub>

③ Higashiguchi, Y., Katsuta, K., Minegishi, T., Yonemura, S., Urasaki, A., Inagaki, N. (2016) Identification of a shootin1 isoform expressed in peripheral tissues, *Cell Tissue Res.*, 査読有, 366, 75-87, naister: <http://library.naist.jp/dspace/handle/10061/10666>

④ Kubo, Y., Baba, K., Toriyama, M., Minegishi, T., Sugiura, T., Kozawa, S., Ikeda, K., and Inagaki, N. (2015) Shootin1-cortactin interaction mediates signal-force transduction for axon outgrowth. *J Cell Biol.*, 査読有, 210, 663-676, <http://jcb.rupress.org/content/210/4/663?etoc>

⑤ Katsuno, H., Toriyama, M., Hosokawa, Y., Mizuno, K., Ikeda, K., Sakumura, Y., and Inagaki, N. (2015), Actin migration driven by directional assembly and disassembly of membrane anchored actin filaments, *Cell Reports*, 査読有, 12, 648-660, [https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(15\)00674-9](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(15)00674-9)

⑥ K. Tahara, M. Tsukui, T. Maeno, N. Inagaki, J. Kikuchi, (2015) 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, Vol. 44 No. 12 p.1643-1645, doi:org/10.1246/cl.150777

⑦ 加藤晃一、稲垣直之、(2015) 離合集散が織りなす生命分子機能の研究フロンティア、*実験医学*、査読無、33 巻、p1316-1320

⑧ 馬場健太郎、浦崎明宏、稲垣直之、(2014) 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, 58 (2), 49-52, naister: <http://library.naist.jp/dspace/handle/10061/10675>

⑨ Kozawa, S., Sakumura, Y., Toriyama, T.,

Inagaki, N., Ikeda, K., (2014) Bayesian cell force estimation considering force directions, *Neural Processing Letters*, 査読有, 41, 2, 191-200, DOI:10.1007/s11063-013-9320-y

[学会発表] (計 48 件)

① 稲垣直之、分子の自己組織化による細胞の形態形成、特別企画講演、日本化学会第 98 春季年会、2018 年

② 稲垣直之、Molecular bases for gradient reading and force generation of the axon guidance、新領域「動的秩序と機能」第 6 回国際シンポジウム、2018 年

③ 稲垣直之、Molecular mechanics of neuronal axon guidance、2017 年度生命科学系学会合同年次大会シンポジウム、2017 年

④ 稲垣直之、分子の集合・離脱が駆動する神経軸索ガイダンスの分子メカニクス、第 55 回日本生物物理学会年会シンポジウム、2017 年

⑤ 稲垣直之、新たな細胞内輸送機構 Actin wave と細胞形態形成、第 69 回日本細胞生物学会大会シンポジウム、2017 年

⑥ Inagaki N., Molecular mechanism for axon navigation in the brain, Frontier Bioorganization Forum 2017 Dynamical ordering and integrated functions of biomolecular systems, 2017

⑦ Inagaki N., Abe, K., Katsuno, H., Baba, K., Mori T., Watanabe, R. and Sakumura, Y. Axonal haptotaxis mediated by grip and slip between cell adhesion molecule and extracellular substrate, EMBO 2016 Symposia Actin in Action, 2016

⑧ 稲垣直之、蛍光ライブイメージングと牽引力顕微鏡による神経軸索ガイダンス機構の解析、第 25 回日本バイオイメーキング学会学術集会シンポジウム、2016 年

⑨ Inagaki N., Molecular mechanism for axon outgrowth and neuronal network formation, The 4th International Conference on Pharmacy and Advanced Pharmaceutical Sciences, 2015

⑩ 稲垣直之、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、日本電気泳動学会シンポジウム、2014 年

⑪ 稲垣直之、生体分子素子の自己組織化による神経軸索の伸長と調節、第 14 回日本蛋白質科学会シンポジウム、2014 年

⑫ 稲垣直之、Signal-force transduction in axon outgrowth and guidance、第66回日本細胞生物学会大会シンポジウム、2014年

⑬ Inagaki N.、Signal-force transduction in axon outgrowth and guidance、生命分子システムにおける動的秩序形成と高次機能発現第2回国際シンポジウム、2014年

〔図書〕（計 1 件）

稲垣直之、(2013) ニューロンの極性化をになう細胞内シグナリング、査読有、脳の発生学（宮田卓樹，山本亘彦 編），化学同人，5章，pp72-89

〔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

<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) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()