

平成 22 年 5 月 15 日現在

研究種目：特定領域研究
研究期間：2005 年度～2009 年度
課題番号：17023019
研究課題名（和文） 成長円錐のシナプス形成に関与するCa ²⁺ センサーの探索と機能解析
研究課題名（英文） A study of searching the growth cone proteins involved in synapse formation
研究代表者 五十嵐 道弘 (IGARASHI MICHHIRO) 新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：50193173

研究成果の概要（和文）：脳の神経回路を構成するシナプス形成に必須の前駆構造である、成長円錐の分子メカニズムはほとんど知られていなかった。研究代表者は、網羅的に蛋白質を同定する手法であるプロテオミクスを用いて約 1,000 種類の蛋白質を見出し、定量的免疫染色で成長円錐に強く濃縮され、遺伝子の発現を特異的に抑制する RNAi で成長円錐機能を阻害するものを絞り込み、18 種類を神経成長に直結する分子群として同定した。これらはこれまで神経成長への関与が報告されていない分子群であり、全く新しい方法論で、成長円錐の分子基盤を明らかにすることに成功した。

研究成果の概要（英文）：The growth cone is the essential structure for accurate synaptogenesis to form the brain neuronal network, however, in the mammalian brain, the molecular basis is poorly understood. Here, we successfully used a proteomic approach to identify 945 proteins, including highly abundant, membrane-associated and actin-associated proteins. Almost one hundred of the proteins appear to be highly enriched in the growth cone, as determined by quantitative immunostaining, and for 18 proteins, the results of RNAi suggest a role in axon growth. Most of the proteins we identified have not previously been implicated in axon growth and thus, their identification presents a significant first step forward, providing new marker proteins and candidate neuronal growth-associated proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	18,100,000	0	18,100,000
2006 年度	15,500,000	0	15,500,000
2007 年度	14,200,000	0	14,200,000
2008 年度	14,100,000	0	14,100,000
2009 年度	14,100,000	0	14,100,000
総計	76,000,000	0	76,000,000

研究分野：神経生化学

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：成長円錐、プロテオミクス、RNAi, 神経極性形成、リン酸化、コンドロイチン硫酸、シタキシン、遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

成長円錐は発生時期の軸索・樹状突起先端に形成される運動性に富んだ構造体であり、1) 神経の成長、2) 軸索の経路選択、3) シナプス形成、の各機構に関わるきわめて重要な役割を果たす。しかし、その機能を遂行する分子機構については、いまだに包括的な理解はできておらず、断片的な知識に留まっている。その理由は、高等脊椎動物脳においては直接的に神経成長に関係する分子群を見出す方法には限界があり、これまでのように形質から分子をスクリーニングする方法では非常に長時間がかかってわずかな分子の発見すらおぼつかない、という事態を打開しない限り、偶発的な発見を待つしかないのが数年前の状況であった。

神経発生にはモデル動物である線虫やショウジョウバエの変異体スクリーニングが大きな力を発揮してきたが、これらは構造も単純であるため、そろそろ高等動物のモデルとなる部分は発掘され尽くした感もあり、分子の重複性から見てもアイソフォームが多様に存在する高等脊椎動物のモデルとしては、シグナル伝達経路全体を考えると、ガイド分子などを除けばそれほど成長円錐機能シグナル伝達に寄与する可能性は既に乏しいといえる。

この状態を根本的に解決する手段として、われわれはプロテオミクスに注目した。プロテオミクスは、ある系に存在するタンパク質を網羅的に同定する手法で、本研究領域が発足する前年の2004年の段階で、数百種類の分子が同定できる状況にあった。また単にタンパク質の名前がわかるだけでなく、それぞれの量がある程度決定できるため、同定された分子がどの程度その系に存在するのか、おおよそ推測できる状況になった。これは後述の結合分子の同定に関してはきわめて重要な情報であり、ある特定分子の結合タンパク質が10種類程度見出された際にその中で何が最も生理的な重要な結合であるか、量的な指標に基づいて判断できるようになった。よって、成長円錐の研究においてはプロテオミクスを導入して革新的な情報を得ることを期待した。

また成長円錐の機能解析において、コンドロイチン硫酸(CS)の量的調節が神経発生に重要であることが、同分子が最大の成長円錐抑制因子であることから推測される。この折、従来はコンドロイチナーゼABCという細菌由来の分解酵素を用いてCSの量を減らすという薬理的な実験しか方法が無かったが、2000-2004年にCS合成に関わる酵素群のほとんどが発見されたため、それらの合成酵素の遺伝子改変マウスを作成できるようになった。このうち、CSの糖鎖骨格を合成する第一段階を担う酵素CSGALNACT1のノックアウトマウスを作成して解析を進

めた。

2. 研究の目的

シナプス形成は神経回路の作動が正常に行なわれる第一歩であり、この過程は高等動物の中枢神経系においては、十分な解明がなされていない。またわれわれがかつて証明したように、シナプス形成の前段階である神経成長は、シナプス伝達の中核分子であるsyntaxin-1が関わっていることから、シナプス形成はシナプス伝達とも関わっている一連の現象である。この研究をおこなうため、1) シナプス形成の要となる成長円錐の機能解析をプロテオミクスを通じて行なう、2) 成長円錐の機能を抑制することが知られているコンドロイチン硫酸に関する遺伝子改変マウスを作成して、その検討を行なう、3) Syntaxin-1Aに関する分子間相互作用を解明し、さらに遺伝子改変マウスを通じて研究を進める、の3点を目的として研究を進め、包括的に神経回路形成におけるシナプス形成・成熟機構の理解を進めることを行なった。

3. 研究の方法

(1) 成長円錐のプロテオミクス

成長円錐のプロテオミクスを行なうためには、純度が高い成長円錐の標品を得る必要がある。われわれは既に予備的に検討していた細胞画分を用いて、単離成長円錐としてプロテオミクスを実行した。この際に他の画分の混入が避けられないので、その検討は成長円錐の免疫染色によって確認を行なうこととした。実際には、生後1日目のラット胎仔から前脳を採取して、成長円錐画分の単離を行なった。RNAiはわれわれが開発したグリーンラットを用いる方法で行った。

(2) CS合成の遺伝子改変に伴う脳発生の変化

CSGALNACT1のノックアウトマウスはCL57/B6系統として作成されたが、これには統合脳支援班のB6マウス遺伝子改変支援のサポートを受けた(崎村 建司教授)。糖鎖合成に必須のDXDモチーフをコードするエクソン6を選択的に除去するfloxマウスを作成した。

(3) Syntaxin-1Aの相互作用による開口放出の調節と遺伝子改変によるリサイクリング異常

第7エクソンにR151G置換が生ずるようsyntaxin-1Aの遺伝子改変を行い、C57系統で作成した。

4. 研究成果

(1) 成長円錐のプロテオミクス

プロテオミクスによって成長円錐全体(GCP)と膜部分(GCM)の両者を合わせると950種類のタンパク質を同定することができ

た。これは従来の哺乳動物での成長円錐の分子が 30-50 種類程度しか知られていなかった点を考慮すると、格段の進歩である。

成長円錐の特徴的な分子群として、1) 微小管関連のタンパク質、2) 脂肪酸代謝に関係するタンパク質、3) 小胞輸送系の rab ファミリーなどが多量存在することが、成熟シナプスのプロテオミクスの結果との比較でわかった。しかし予想以上に多数のタンパク質の存在が証明できたため、これだけでは特徴的な分子群を絞り込むには至らない。そこで、大脳皮質の培養神経細胞を用いて定量的に免疫染色を行い、成長円錐に濃縮したタンパク質を拾い出すこととした。この方法のため、約 200 種類の免疫染色を行ったが、この中でいわゆる偽陽性になった分子は見られなかった。この結果は、われわれの細胞画分の純度が高く、その結果としてのプロテオミクスもきわめて信頼度が高いことを意味している。

われわれは従来からの成長円錐マーカー GAP-43 を標準として、おおよそ 70 種類のタンパク質が成長円錐に GAP-43 よりも相対的に濃縮されていることを見出した。また同等に濃縮されているものも 30 種類程度存在した。

これらの分子が機能的な成長円錐マーカーであるためには、成長円錐の局在だけでなく、神経成長を担うことを証明する必要がある。これまで神経系では多数の遺伝子に関する網羅的な RNAi を行うことができていなかったが、それを可能とするため、まず EGFP-トランスジェニックラット（グリーンラット）を用いて、以下の方法で行った。すなわち、グリーンラットの脳からの培養神経細胞に EGFP と目的遺伝子の双方に対する siRNA を同時投与し、免疫染色で双方が消失した神経細胞の長さを測定することで、確実に RNAi 導入神経細胞を同定できた。この方法で約 60% の遺伝子発現が抑制された。われわれはこの結果から、合計 18 種類の成長円錐分子マーカーを同定し、これらに neuronal growth-associated proteins (nGAPs) と命名した。これらは、細胞骨格調節、小胞輸送、情報伝達等の機能を持つ分子群で多岐にわたっていたが、これまでに線虫やショウジョウバエなどのモデル生物で神経成長に関連があると見出されていたものはわずかであった。よって、これらは従来型の研究では見出され得なかった分子群であり、その点でわれわれの研究が革新性を有することを意味する。これらの分子群は哺乳動物と異なり、線虫やショウジョウバエでは存在はするが必ずしも神経系に発現していないものもあり、モデル生物での変異体研究のみでは哺乳動物脳の構築機構の理解が十分でないことを示している。なお当該論文は、PNAS

に direct submission として L. Landmesser 博士を editor として受理されたが、その際に「モデル生物の研究を補完する内容であり、従来殆どの研究者が着手していなかった手法で成果を挙げた」という評価を受け、当該号の表紙にも採用された。

(2) CS 合成の遺伝子改変に伴う脳発生の変化

CS 合成は非常に多数の遺伝子が関係するが、このうち CSGALNACT1 は CS 骨格合成の最初の段階を触媒するため、合成に影響すると考えられる。よってそのノックアウトマウスを作成した。

CSGALNACT1 のノックアウトマウスは CL57/B6 系統として作成されたが、これには統合脳支援班の B6 マウス遺伝子改変支援のサポートを受けた（崎村 建司教授）。当該のマウスは多くの糖鎖遺伝子と違って、ノックアウトでも致死ではなかったが、10% 程度の体長の短縮が認められた。まず CS 合成の減少を確認するために、CS がもっとも多量に存在する軟骨で合成量を確認したところ、軟骨では KO マウスで CS 量がほぼ半減していた。また骨端軟骨では明らかに軟骨層の厚さが 30% 以上減少していた。さらに電子顕微鏡レベルでは、軟骨の微細構造にも異常が見られた。また糖鎖の解析から、軟骨は少なくとも特定のサイズの CS 糖鎖が極端に減少していることがわかった。このことから、このマウスでは明らかに CS 合成の異常が生じていることが証明された（投稿中）。

このマウスで脳では E14 から大脳皮質の形成を追跡したところ、明らかに中間層の層の厚さが薄いことが示された。その形成は、最大で約 20% の減少が認められた。この厚さの差は、発生の進行とともに次第に小さくなっていった。しかしこの結果は、BrDU 等での解析結果から、細胞死の増加によるものではないことが確かめられた。よって、現時点では何らかの細胞移動の異常が影響しているものと考えている。脳では発生途中の CS 合成低下は 20-30% に留まっており、また CSGALNACT1 発現量も軟骨に比べると相当少ないが、にもかかわらず顕著な異常が生じているため、細胞移動の次に生ずる軸索成長の過程を解析している。

(3) Syntaxin-1A の相互作用による開口放出の調節と遺伝子改変によるリサイクリング異常

Syntaxin-1A が submicromolar Ca^{2+} 依存的に開口放出の調節を行う機構として、既に自己リン酸化型 CaMKII との結合を明らかにした (Ohyama et al. J Neurosci 22: 3342-51 [02]) が、これと同様の Ca^{2+} 依存性結合として、syntaxin-1A が分子モーター

myosin-V と結合することを証明した。すなわち、(+)端モーターである myosin-V はシナプス小胞とも結合しているが、0.3-1 uM Ca²⁺存在下で

Syntaxin-1A の SNARE モチーフ部分と結合し、複合体を形成する。この機構は、軽鎖のカルモジュリン (CaM) と交換されて syntaxin-1A が結合するという独特の機序であることが、生化学および原子間力顕微鏡を用いた研究でわかった。この過程を阻害すると、reserve pool の動員と考えられる開口放出のみが特異的に抑制されることが示された。よって、この機構は myosin-V がこれまで見出されていなかった小胞の tethering (小胞が docking の前に形質膜と近接することで、効率的に SNARE 複合体を形成すること) の実行機構の 1 つであることが証明された。この研究は、当該号の優れた論文として、2005 年の米国細胞生物学会の年間論文賞候補として取上げられた。

また syntaxin-1A と CaMKII の相互作用を弱める syntaxin-1A [R151G] の変異マウス(ノックイン)を作成した。このマウスは、単一アミノ酸変異であるにもかかわらず、シナプス小胞密度の減少 (渡邊 雅彦班員・深谷昌弘博士との共同研究)、シナプス伝達の放出確率の低下 (真鍋 俊也班員・渡部文子博士・片山憲和博士との共同研究)、行動における Open field test、Porsolt forced-swim test での異常 (第 5 班宮川剛班員・高雄啓三博士との共同研究) が見出された。このマウスでは、刺激時のリサイクリングの著明な遅延が認められ、また刺激時に syntaxin の集合状態に明らかな異常が生じていた。また免疫沈降の結果は、CaMKII と syntaxin-1A の相互作用の減弱が認められた。これらの結果は、CaMKII 依存性の調節が低下することで神経伝達のさまざまな障害が生ずることを意味しており、Südhof らによる CaM の RNAi による伝達異常とそれの常時活性化型 CaMKII による回復(J Neurosci 30:4132)から導き出された「CaMKII 依存性の伝達調節」との関連性が示唆される。

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 10 件)

1. Nozumi, M., Togano, T., Takahashi-Niki, K., Lu, J., Honda, A., Taoka, M., Shinkawa, T., Koga, H., Takeuchi, K., Isobe, T., and Igarashi M.: Identification of functional marker proteins in the mammalian growth cone. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 17211-17216 (2009). (査読有)

2. Lu, J., Nozumi, M., Fujii, H., and Igarashi, M.: A novel method for RNA interference using

EGFP-transgenic rats. *Neurosci. Res.* **61**, 219-224 (2008). (査読有)

3. Ishikawa, R., Katoh, K., Takahashi, A., Ooseki, K., Watanabe, M., Igarashi M., Nakamura, A., and Kohama, K.: Drebrin attenuates the interaction between actin and myosin-V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**, 398-401 (2007). (査読有)

4. Igarashi, M., and Watanabe, M.: Roles of calmodulin-binding proteins in synaptic vesicle recycling during regulated exocytosis at submicromolar Ca²⁺ concentrations. *Neurosci. Res.* **58**, 226-233 (2007). (査読有)

5. Watanabe, M., Nomura, K., Ohyama, A., Ishikawa, R., Komiyama, Y., Hosaka, Y., Yamauchi, E., Taniguchi, H., Sasakawa, N., Ushiki, T., Sato, O., Kumakura, K., Ikebe, M., and Igarashi M.: Myosin-Va regulates exocytosis through Ca²⁺-dependent binding of syntaxin-1A. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4519-4530 (2005). (査読有)

6. Togano, T., Kurachi, M., Watanabe, M., Grenningloh, G., and Igarashi, M.: Role of Ser 50 phosphorylation in SCG10 regulation of microtubule depolymerization. *J. Neurosci. Res.* **80**, 475-480 (2005). (査読有)

[学会発表] (計 50 件)

1. 五十嵐 道弘: プロテオミクスによって初めて可能となった成長円錐研究: 特異分子マーカーと機能制御機構 第 5 回プロテオミクス・構造生物学講演会 2009 年 11 月 2 日 東京

2. Nozumi, M., Igarashi, M.: Newly identified neuronal growth-associated proteins (nGAPs) are involved in rearrangement of cytoskeletons in the growth cone. 32nd Society for Neuroscience Annual Meeting, 2009 年 10 月 17 日 Chicago, USA

3. Igarashi, M., Toagano, T., Nozumi, M.: Functional Marker Proteins in the Mammalian Growth Cone. 17023019seika.pdf49th American Society for Cell Biology 2009 年 12 月 7 日 San Diego, USA

[図書] (計 1 件)

1. Igarashi, M., and Ohko, K.: Proteins Involved in the Presynaptic Functions. In "Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neural Signaling Mechanisms"(Lajtha A, Mikoshiba K, eds), pp. 45-62, Springer, US (2009).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

○取得状況（計0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://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 道弘 (IGARASHI MICHIMIRO)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：50193173

(2) 研究分担者

田中 憲一 (TANAKA KENNICHI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：10126427

阿部 春樹 (ABE HARUKI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：40018875

藤井 博 (FUJII HIROSHI)
信州大学・農学部・教授
研究者番号：90165340

田岡 万悟 (TAOKA MASATO)
首都大学東京・大学院・理学(系)研究科・
助教
研究者番号：60271160

渡部 通寿 (WATANABE MICHITOSHI)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：40303127

野住 素広 (NOZUMI MOTOHIRO)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：00420323