

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570066

研究課題名（和文） アクチン結合タンパク質 *lasp-2* の神経細胞における機能解析研究課題名（英文） Functional analysis of *lasp-2* in chicken neuron

研究代表者

氏 名（ローマ字）：寺崎朝子（Asako TERASAKI）

所属機関・部局・職：千葉大学・融合科学研究科・助教

研究者番号：30311616

研究成果の概要：ニワトリ脳より申請者が同定したアクチン結合タンパク質 *lasp-2* に東化活性があることを明らかにし、ニワトリ初代神経細胞の成長円錐やスパインに局在することを示した。また、アクチン結合領域を欠損した *lasp-2* の導入によって神経細胞の成長円錐の運動が異常になることも明らかにした。関連した論文を 2 本、総説 1 本を発表した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
20 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理化学

キーワード：アクチン結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

神経細胞のネットワーク形成は細胞からの突起形成から始まり、軸索の先端部は運動性の高い構造である成長円錐として移動を続け、他の神経細胞などの標的に到達すると神経終末となってシナプスを形成する。成長円錐に含まれるラメリポディアとフィロポディア、およびスパイ

ンの主成分はアクチン系細胞骨格であり、多くのアクチン結合タンパク質が形態を制御している。

Lasp-2 (LIM and SH3 protein -2) は F アクチンカラム法 (F アクチンをリガンドとするアフィニティカラム) (Miller and Alberts, 1989) によって申請者がニワトリ脳から発見したアクチン結合タンパク

質である。類似した構造を持つアクチン結合タンパク質として lasp-1 が知られているが、lasp-1 が非筋組織に広く発現するのに対して lasp-2 は脳で顕著に発現している。しかし lasp-2 のアクチンに対する作用の詳細は調べられておらず、神経細胞における局在、相互作用するタンパク質、リン酸化などの制御機構も不明である。

2. 研究の目的

lasp-2 の神経細胞における機能を明らかにするために以下の視点で研究を進めた。

- 1) アクチンに結合してどのような構造を作るのか？
- 2) アクチンの他に相互作用するタンパク質はあるか？相互作用に必要な領域はどこか？
- 3) 生体内でもアクチンを含む構造に lasp-2 結合タンパク質とともに局在するのか？
- 4) 過剰発現や発現阻害をすると細胞の形態はどのように変化するのか？
- 5) ニワトリの脳の発生ではいつからどのような種類の細胞や組織に発現するのか、その細胞や組織は脳の形成時にどのように挙動するのか？

3. 研究の方法

A. Lasp-2 のアクチン結合活性の解析：組み換え lasp-2 存在下で形成されるアク

チンフィラメントの構造を共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡で観察する。また、lasp-2 とアクチンの結合モル比を求め、化学架橋実験やゲル濾過によって lasp-2 が二量体を形成するのかを調べ、lasp-2 がどのような機構でアクチンの三次元構造の構築に関与しているのかを明らかにする。

B. 初代培養細胞における lasp-2 の免疫染色：運動性が高く大きな成長円錐を形成することが知られているニワトリの後根神経節 (Dorsal root ganglia = DRG) に由来する末梢神経細胞、および神経ネットワーク形成の解析に用いられているニワトリ大脳由来の中枢神経細胞を抗 lasp-2 抗体で免疫染色し、局在を調べる。

C. 初代培養細胞における GFP-lasp-2 の観察：初代培養神経細胞に GFP-lasp-2 を導入し、免疫染色と同様にアクチンを含む構造に局在するかを経時的に観察する。

D. Lasp-2 と lasp-2 結合タンパク質との相互作用：申請者が lasp-2 アフィニティカラムで同定した結合タンパク質候補の直接結合を GST pull-down assay などで確認するとともに、神経細胞内での挙動も調べる。

E. 過剰発現、RNAi による発現抑制時の観察：初代培養神経細胞を用いて過剰発現や発現抑制がフィロポディアの形成頻度や長さ、成長円錐の面積、軸索の伸長速度、樹状突起の形成、スパインの形態、細胞間ネットワーク形成などに及ぼす影響を解析する。

F. Lasp-2 の脳組織における局在：ニワトリ胚の脳形成時における局在を免疫染色や in situ hybridization で観察する。

4. 研究成果

A. Lasp-2 のアクチン結合活性の解析：組み換え lasp-2 存在下でアクチンフィラメント束が形成されることを確認した。ただし、束化に必要なモル比が 1 : 2 であったことから、束化活性は比較的弱いことも明らかになった（論文 1）。 α -actinin と直接結合することも明らかとなったがアクチン結合活性においては独立の作用を示した（論文 1）。トロポミオシンとも競合関係が見られなかった（投稿準備中）。アクチン結合領域が LIM domain と最初の nebulin repeat にあることも示した（投稿中）。

B. 初代培養細胞における lasp-2 の免疫染色：DRG 末梢神経細胞および大脳由来の中枢神経細胞では成長円錐のフィロポディアやラメリポディア上に局在し、大脳由来の中枢神経細胞ではスパインに局在した。DRG 末梢神経細胞でアクチンの局在と詳細に比較したところ、アクチンフィラメント上にドット状の局在を示しており、一部は基質との接着部部分に相当することが共焦点レーザー顕微鏡による解析で明らかとなった（投稿準備中）。

C. 初代培養細胞における GFP-lasp-2 の観察：免疫染色同様にフィロポディアやラメリポディアへの局在に加えてドット状の蛍光が見られた。ドットの動きにはいくつ

かのパターンがあり、[1]ドットがその場で動かない（C-domain およびフィロポディアの付け根）[2]ドットが現れその場で移動することなく 10 秒弱で消失（C-domain ~ T-zone）[3]ドットが短い距離（2~3 μ m）を移動した後に消失（T-zone ~ P-domain）[4]リング状の構造（直径 1~2 μ m）を形成したのちに消失（C-domain ~ T zone）[5]フィロポディア上を移動して消失（P-domain）、などが挙げられる。[1]は接着斑に相当する可能性が考えられ、また[2]、[3]の移動距離や消失までの時間は dynamin-1 の動態の報告に近かった。

D. Lasp-2 と lasp-2 結合タンパク質との相互作用：免疫染色の結果から、結合タンパク質候補の一つである zyxin はフィロポディアの付け根の部分で局在が一致し、dynamin は細胞質で一部が局在をともにすることが推測された（投稿準備中）。生化学的な結合様式に関しては引き続き解析中である。

E. 過剰発現、RNAi による発現抑制時の観察：アクチン結合に必要なドメインを欠損した GFP-lasp-2 Δ LIM を過剰発現させたところ成長円錐内に一様に拡がり、フィロポディアの運動に異常が見られた。zyxin との結合に必要なドメインを欠損した GFP-lasp-2 Δ SH3 は全長と同様にドットが運動し、成長円錐の形態や運動にも大きな変化が見られなかったが、全長と比較してフィロポディアやラメリポディアのふちへの局在が強くなる傾向が見られた。RNAi に関しては引き続き解析中である。

F. Lasp-2 の脳組織における局在：現在解析中である。

G. その他：lasp-2 が発生中の筋組織では一時的に発現上昇が見られ、Z線に局在することを明らかにした（論文1）。無脊椎動物にはlasp-1 とlasp-2 に同程度のホモロジーを示すlasp タンパク質が1種類ずつ存在することをデータベース解析や系統解析から明らかにした。カラユウレイボヤの初期胚ではlasp は未受精卵から偏った局在を示し、発生の一時期には神経系組織に高発現することを明らかにした（論文2）。プロテオミクスを用いた新規タンパク質の同定に関する総説を執筆した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

1. Zieseniss A, Terasaki AG, Gregorio CC "Lasp-2 Expression, Localization, and Ligand Interactions: a new Z-disc Scaffolding Protein." *Cell Motil. Cytoskeleton* 65, 59-72 (2008)
2. Terasaki AG, Hiruta J, Suzuki J, Suzuki H, Nishioka T, Ohashi K, Azumi K, Ogasawara M "A lasp family protein of *ciona intestinalis*" *Biophys. Biochim. Acta*, 1779, 51-59 (2008)

[学会発表] (計3件)

1. 寺崎朝子・喜屋武珠美・橋谷田志織・大橋一世「lasp-2 のドメイン構造と分子進化」生体運動班会議 東京大学駒場キャンパス 2009年1月

2. 寺崎朝子・蛭田仁・小笠原道生・安住薫・大橋一世「無脊椎動物のlasp の遺伝子構造」日本動物学会第78回大会 弘前大学 2007年9月

3. Suzuki J, Sakamoto S, Kaneko T, Ohashi K, Akiyama H, Kamiguchi H, Terasaki AG "Localization of lasp-2 in chicken neurons" 細胞生物学会・発生物学会合同大会 福岡国際会議場 2007年5月

[その他] (総説)

寺崎朝子「プロテオミクス的な手法を用いた脳のアクチン結合蛋白質の探索」日本薬理学会誌 (*Folia Pharmacol. Jpn.*) 130, 367~372 「神経系アクチン細胞骨格の基礎と臨床」 (2007)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者：寺崎朝子 (Asako TERASAKI) 千葉大学・融合科学研究科・助教・研究者番号 30311616
- (2) 研究分担者：なし
- (3) 連携研究者 (研究分担者より変更)：中川裕之 (Hiroyuki NAKAGAWA)・福岡大学・准教授・研究者番号 80274562