

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500443

研究課題名(和文) CRMP1・フィラミンA相互作用によるFアクチン機能制御

研究課題名(英文) Interaction of CRMP1 and Filamin-A regulates F-actin-cytoskeleton.

研究代表者

中村 史雄 (Nakamura, Fumio)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：10262023

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)：神経ガイド分子セマフォリン3A (Sema3A) は神経突起伸長を抑制する。Sema3Aは細胞内情報伝達分子CRMP1を介してアクチン細胞骨格を崩壊させる。本研究ではCRMP1とアクチン結合蛋白質Filamin-Aとの相互作用を見いだした。CRMP1はFilamin-AのN末端とC末端に結合し、その立体構造を大きく変化させた。CRMP1やFilamin-Aのそれぞれの結合領域の変異体はSema3Aの作用を阻害した。これはCRMP1・Filamin-A相互作用がSema3A情報伝達に必要なことを示す。CRMP1・Filamin-A結合の阻害により神経突起伸長を促す新たな薬物の開発へと発展させたい。

研究成果の概要(英文)：Sema3A, an axon guidance molecule, repels neurite outgrowth. This action accompanies the collapse of actin-cytoskeleton in the neuronal growth cones. We found that CRMP1, an intracellular mediator for Sema3A-signaling, interacts with Filamin-A, an actin binding protein. In *C. elegans*, Filamin-1 (Filamin-A homologue) is involved in DD/VD motoneuron guidance with UNC-33 (CRMP1 homologue). CRMP1 binds N- and C-termini of Filamin-A and alters its ternary structure. We determined the interaction residues in Filamin-A and CRMP1. Overexpression of the point-mutants of those residues in cultured neurons interferes Sema3A-response. Sema3A induces phosphorylation of CRMP1. A phospho-mimicking mutant of CRMP1 binds Filamin-A with higher affinity than wildtype. The phospho-mimicking CRMP1 interferes the actin cytoskeleton weaved with F-actin and Filamin-A. These results suggest that phosphorylated CRMP1 removes Filamin-A from actin-cytoskeleton in turn to bring the collapse in Sema3A-signaling.

研究分野：神経生物学

キーワード：神経回路形成 細胞骨格 アクチン セマフォリン Sema3A CRMP1 Filamin-A リン酸化

1. 研究開始当初の背景

神経ガイド分子セマフォリン 3A (Sema3A) は神経突起伸長を抑制して回路形成を制御する(Nakamura, 2000)。Sema3A は脊髄後根神経節(DRG)や海馬神経細胞の突起先端の成長円錐に発現する Neuropilin-1/Plexin-A 受容体複合体に結合する。Plexin-A は細胞内情報伝達機構を活性化して神経突起内のアクチン及びチューブリン細胞骨格を再構築させ、軸索伸長を停止、あるいは方向の転換を引き起こす。

Collapsin response mediator protein (CRMP)は Sema3A 細胞内情報伝達分子として同定された(Goshima, 1995)。CRMP には 5 種類 (CRMP1~CRMP5) のメンバーが存在する。CRMP1/2 は Sema3A 情報伝達において Fyn、Cdk5、GSK3 β などのキナーゼによりリン酸化され、活性化する(Uchida, 2005,2009)。CRMP2 はチューブリンダイマーに結合しその輸送に関わるが、リン酸化によりこの結合能を失い、神経突起伸長が抑制される (Yoshimura, 2005)。申請者らは Sema3A、CRMP1 のホモ変異、及び二重ヘテロ変異マウス大脳の解剖学的解析から、Sema3A と CRMP1 の遺伝的相互作用を明らかにした (Yamashita, 2007)。しかし Sema3A 情報伝達において CRMP1 を介したアクチン細胞骨格の制御機構はまだ不明の点が多い。

そこで線虫を用いて相互作用分子を探索した。線虫の CRMP1 相同分子 UNC-33 を Bait として Yeast two hybrid 法によるスクリーニングを行い、アクチン結合蛋白質 Filamin-1 を得た。また脊椎動物における Filamin-1 相同分子の Filamin-A も CRMP1 と相互作用した。これらの事実から、Filamin-A が Sema3A 情報伝達において CRMP1 とアクチン骨格をつなぐ分子と想定して研究を開始した。

2. 研究の目的

線虫を用いて UNC-33 と Filamin の生体内相互作用を検証する。次に脊椎動物の Sema3A 情報伝達経路における CRMP1・Filamin-A 相互作用の役割を明らかにする。相互作用部位を Filamin-A、CRMP1 それぞれについて、部分配列及び 1 アミノ酸変異体を用いた結合実験により決定する。相互作用部位に変異を導入した Filamin-A や CRMP1 を DRG 培養神経細胞に導入し、Sema3A 情報伝達の阻害効果を検証する。CRMP1・Filamin-A 複合体の立体構造を、原子間力顕微鏡を用いて明らかにする。構造情報を基に Filamin-A の CRMP1 相互作用に関するアミノ酸配列を含むペプチドを合成し、in vitro における CRMP1-Filamin-A 相互作用の阻害効果や神経細胞における Sema3A 作用の抑制を検討して、軸索反発因子の細胞内情報伝達を阻害する薬物開発の基盤とする。

3. 研究の方法

(1) 線虫を用いた Filamin-1・UNC-33 生体内相互作用の検証: Filamin-1(fln-1)欠失変異体(tm545)の DD/VD 運動神経を GFP で可視化し、神経走行の異常を評価する。また Filamin-1 変異体と unc-33 の弱変異体(e204)あるいは欠失変異体(mn407)の二重変異の DD/VD 神経走行を評価し、遺伝的相互作用を検証する。弱変異体の異常を増強し、欠失変異体の異常を増強しなければ、Filamin-1 と unc-33 の遺伝的相互作用が実証できる。同様の遺伝的相互作用を Sema2A 受容体の Plexin-2 欠失変異体 (tm729)とも行い、線虫のセマフォリン情報伝達における Filamin-1 の関与を明らかにする。

(2) Filamin-A・CRMP1 相互作用部位の決定: Filamin-A の ABD や CRMP1 の部分配列を、大腸菌を用いて発現・精製する。Dot blot 法によりそれぞれの結合部位を限定する。限定された部位について、1~数アミノ酸のアラニン置換をそれぞれの分子全長に対して導入し、結合能を評価する。この解析により Filamin-A、CRMP1 それぞれについて相互作用に重要なアミノ酸が決定される。

(3) 相互作用部位の bioassay による検証: Filamin-A や CRMP1 のアラニン置換変異体を、ヘルペスウイルスベクターを用いてニワトリ胚脊髄後根神経節(DRG)に変異体を発現させ、Sema3A 退縮応答に対する阻害効果を検討する。

(4) Filamin-A 全長と CRMP1 複合体の原子間力顕微鏡による構造検証: Filamin-A は C 末端領域を介して二量体化し、V 字型の形状をとる。一方、CRMP1 は 4 量体を形成する。Filamin-A と CRMP1 の精製蛋白質を再構成し、原子間力顕微鏡により複合体構造を明らかにする。また Filamin-A の F-actin 結合が CRMP1 により増強するあるいは減弱するかを、精製蛋白の再構成系や HEK293 培養細胞を用いて検討する。

(5) Filamin-A-ABD と CRMP1 の複合体結晶構造解析: ABD 及び CRMP1 を発現・精製し複合体の X 線結晶構造解析を行う。

(6) CRMP1-Filamin-A 相互作用阻害ペプチドの検討: 見いだした相互作用部位を含む部分ペプチドを合成し、CRMP1-Filamin-A 相互作用の阻害効果、及び Sema3A 退縮応答の抑制作用を検討する。

4. 研究成果

(1) 線虫における filamin-1・unc-33 相互作用と神経回路形成

線虫の DD/VD 神経は腹側に 19 個の神経細胞体を持つ。その繊維は腹側を走行した後、交連繊維となり背側に投射する。野生型では 14~17 本の交連繊維が梯子状に観察される(図 1A)。これらの繊維は背側で 1 本の連続した神経束(dorsal nerve cord)を形成す

る。Filamin-1 欠失変異体(tm545)では、DD/VD 神経の異常な交連線維の投射（途中停止など）や、途切れた背側神経束が認められた（図 1 B）また、unc-33 の弱変異体(e204)も類似の異常を示した（図 1 C）。さらに filamin-1(tm545) unc-33(e204)二重変異体では異常が増強した（図 1 D, E）。一方 unc-33 欠失変異体(mn407)では増強されなかった（図 1E）。このことから unc-33 と filamin-1 は遺伝的に相互作用して DD/VD 神経投射を制御すると考えられた。

次に線虫のセマフォリン Sema2A の情報伝達機構に Filamin-1 が関与するかどうかを検証した。Filamin-1 変異体(tm545)の背側神経束の異常は、Sema2A 受容体 Plexin-2 の欠失変異(tm729)との二重変異では増強されなかった（図 1 F）。この結果は Filamin-1 の Sema2A/Plexin-2 情報伝達への関与を示す。

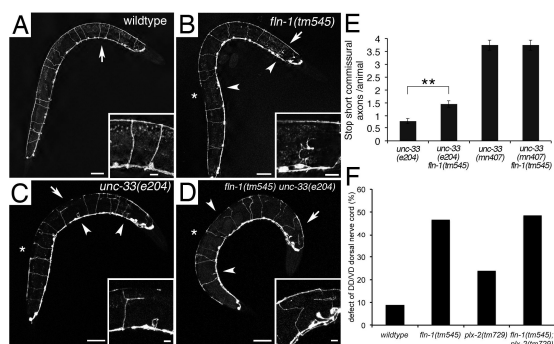


図 1 線虫 Filamin-1 変異体の神経投射異常 A) 野生型 DD/VD 神経の 14~17 本の交連線維は梯子状に走行する。また DD/VD は背側で 1 本の連続した神経束を作る。矢印部分は強拡大。B) filamin-1 欠失変異体(tm545) DD/VD 交連線維の投射異常（矢頭）や背側神経束の断裂がみられる（*）。C) unc-33 弱変異体(e204) 交連線維や背側神経束の異常が見られる。D) filamin-1(tm545) unc-33(e204)二重変異 DD/VD の投射異常が増加する。E) 交連線維投射異常の定量 filamin-1(tm545)との二重変異において unc-33(e204)弱変異体の表現型増強、unc-33(mn407)欠失変異体の増強無しは、filamin-1 と unc-33 との遺伝的相互作用を示す。**, p<0.01, T-test. F) plexin-2 と filamin-1 の DD/VD 背側神経束異常 filamin-1(tm545)と filamin1(tm545); plexin-2 欠失変異体(tm729)では背側神経束の異常に有意な差がない。これは 2 者の遺伝的相互作用を示す。

(2) CRMP1・Filamin-A 相互作用

ラット脳を用いた免疫沈降により Filamin-A と CRMP1 との相互作用を見いだした（図 2 A）。また HEK293T 細胞を用いた免疫沈降においても Filamin-A と CRMP1 の相互作用が確認された。次にマウス DRG 培養神経細胞に Filamin-A の RNAi 発現抑制を行い、Sema3A の感受性低下を見いだした（図 2 B, C）。これは Filamin-A が Sema3A 情報伝達を構成する分子であることを示す。

Filamin-A はアクチン結合領域(ABD)とイムノグロブリン様(Ig)反復配列 2 4 個から構成される紐状の分子である。Filamin-A を部分領域に分割して CRMP1 相互作用領域を決定した。CRMP1 は ABD(アクチン結合領域)と Ig24 に結合した（図 3 A）。また ABD の

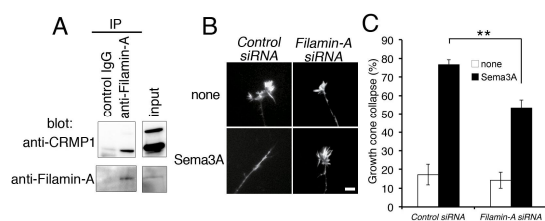


図 2 Filamin-A と CRMP1 相互作用 A) ラット生後 1 日脳から Filamin-A を免疫沈降すると CRMP1 が共沈した。B, C) マウス DRG における Filamin-A RNAi の効果 Sema3A のない条件下で神経成長円錐は扇型の形態を示す。Sema3A を添加すると針状に変化する（左下）。これを退縮応答と呼ぶ。Filamin-A RNAi の神経成長円錐では Sema3A による退縮応答が抑制される（右下）。C) 定量グラフ 退縮応答が Filamin-A RNAi では有意に抑制される。**, p<0.01, T-test.

93~96 番目のアミノ酸が CRMP1 の結合に関与した（図 3 B）。この部分をアラニンに置換した Filamin-A 変異体は CRMP1 との親和性が低下した（図 3 C）。さらにニワトリ胚 DRG への Filamin-A 変異体、ABD 欠失体(ABD)、Ig24 欠失体(Ig24)、R96A 変異体の強制発現は Sema3A 応答を抑制した（図 3 D-F）。一方 Ig1-15 欠失変異体(Ig1-15)は抑制しなかった。これは ABD や Ig24 が Sema3A 情報伝達に関わることを、ABD 内では 9 6 番目のアルギニン(R96)が Sema3A 情報伝達に重要なことを示す。

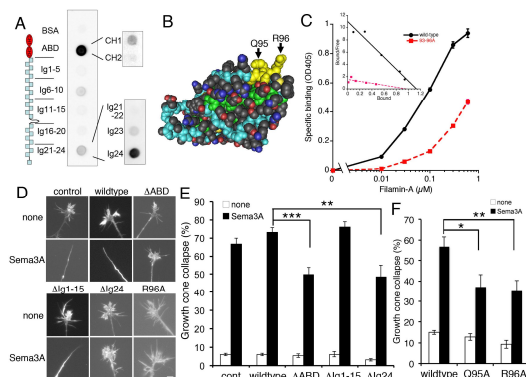


図 3 Filamin-A の CRMP1 相互作用部位の決定

A) Filamin-A 分子構造模式図と結合領域決定 Filamin-A を分割し、dot blot 法により相互作用部位を検討した。ABD と Ig24 に結合する。B) ABD 構造図 93~96 アミノ酸が結合に関与する。このうち黄色で示す Gln95、Arg96 が分子表面に露出する。C) 93~96 をアラニンに置換した Filamin-A 変異体(93-96AA, 赤破線)は野生型(黒線)に比べ、CRMP1 への結合が低下する。D-F) Filamin-A の部分欠失変異体、点突然変異体の効果 各変異体を DRG に強制発現させ Sema3A 感受性を評価した。ABD 欠損(ΔABD)や Ig24 欠損(ΔIg24)は Sema3A 反応を抑制する。また Gln95 や Arg96 を Ala に置換した変異体(Q95A, R96A)も Sema3A 反応を抑制した。

CRMP1 についても同様の解析を行い、相互作用部位として 245~247 番目のアミノ酸を見いだした。この領域のアラニン置換変異体を作成し、Filamin-A 結合能、DRG における Sema3A の退縮応答抑制を検討した。その結果、247 番目のアスパラギン(N247)が相互作用及び Sema3A 情報伝達に重要であることが明らかになった。これらの結果から

Filamin-A・CRMP1 相互作用が Sema3A 情報伝達に与ることが裏付けられた。

(3) CRMP1 リン酸化と相互作用

Sema3A 情報伝達において Cdk5 は CRMP1 の 522 番目のセリンをリン酸化する。このリン酸化を介して Sema3A 退縮反応が起こる。リン酸化セリンを模倣するアスパラギン酸置換を CRMP1 に導入した変異体 CRMP1(S522D)は、CRMP1 野生型に比べて Filamin-A への親和性が増加した。さらにニワトリ DRG へこの変異体を導入すると、退縮応答様の形態変化を引き起こした。すなわち CRMP1(S522D)は活性型変異体と考えられた。さらにこの反応は Filamin-A を RNAi 発現抑制により減弱化することから、Filamin-A はリン酸化 CRMP1 の下流で機能すると考えられた。

(4) Filamin-A・CRMP1 複合体構造

Filamin-A はアクチン結合領域(ABD)と 24 個の Ig 反復配列から構成され、さらに Ig24 を介して二量体化する。Filamin-A は V 字型の紐状形態を示す。CRMP1 は Filamin-A の ABD と Ig24 に結合し、Filamin-A の構造を変化させると予想された。そこで Filamin-A と CRMP1(S522D)の複合体形態を原子間力顕微鏡 (AFM) により観察した。Filamin-A 単体は V 字状で一辺 140 nm の形態 (図 4A-C) を示し、CRMP1(S522D) 4 量体は直径 40nm の粒子を示した (図 4D-F)。Filamin-A・CRMP1(S522D)複合体は異なる大きさの粒子が存在したが、長径 60nm のものが多かった (図 4G-I)。結晶構造からの Filamin-A 二量体の容積は 650nm³、AFM 像からの CRMP1 四量体は 362nm³ と推定された。一方 Filamin-A、CRMP1(S522D)複合体は様々な大きさが観察された (図 4G、白、青矢印) が、小さいものは 1680nm³ と推定された。これは Filamin-A 二量体と CRMP1 の 4 量体 2 個から構成されると考えられた。また超遠心による Filamin-A・CRMP1(S522D)複合体沈降物のモル比と一致した。

(5) Filamin-A・CRMP1 複合体とアクチン骨格

Filamin-A はアクチン線維 (F-アクチン) を架橋し、網状のアクチン骨格を形成する。CRMP1(S522D)は Filamin-A・F-アクチンの骨格を脆弱化させた。これはリン酸化 CRMP1 が Filamin-A をアクチン骨格から遊離させると推測された。さらに Sema3A 受容体、CRMP1、Filamin-A を発現する HEK293 細胞において、Filamin-A と F-アクチンの相互作用は、Sema3A 刺激により減少した。しかしこの減少は CRMP1(N247A) や Filamin-A(R96A)変異体では認められなかった。以上の結果から、Sema3A 情報伝達においてリン酸化された CRMP1 は Filamin-A と相互作用して Filamin-A をアクチン骨格か

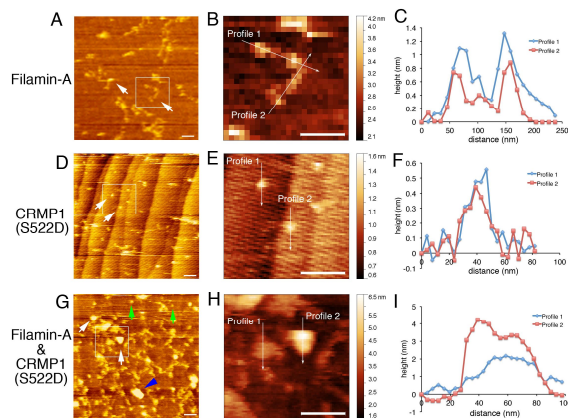


図4 Filamin-A、CRMP1、及び複合体の原子間力顕微鏡像 A、B)Filamin-A 矢印で示す Y や V 字型の構造がみられる。C)Filamin-A 1 枝の分子構造プロフィール。長さは 140nm 程度で 2 箇所高さが増加するところがある。これは Ig 反復配列が部分的に重なったものと推測される。C-E)CRMP1(S522D) 直径 40nm、高さ 0.5nm の粒子が多い。F-G)Filamin-A・CRMP1(S522D)複合体長径 60nm、高さ 2~4 nm の粒子が出現する。高さは Filamin-A や CRMP1 単独より大きい。青矢頭はさらに大きな複合体を示す。

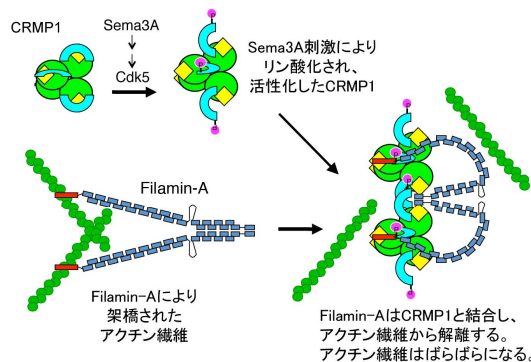


図5 CRMP1 Filamin-Aの相互作用模式図

ら解離させ、アクチン骨格を崩壊させると考えられた (図 5)。

(6) ABD・CRMP1 の結晶構造解析 高純度に発現・精製された ABD の CRMP1 の複合体結晶作成を試みた。しかしそれぞれ単体の結晶構造は得られたが、複合体の構造は得られなかった。また液層での ABD・CRMP1 複合体形成はカロリーメトリーでは検出できなかった。ABD と CRMP1 の相互作用は固相系の結合実験で見いだされたが、解離定数 1.46 μM と弱いため、液層において複合体形成が困難と考えられた。

展望

Sema3A 情報伝達におけるアクチン骨格の制御に CRMP1 と Filamin-A の相互作用が関わることを明らかにした。また CRMP1 と Filamin-A の相互作用部位をアミノ酸レベルで決定した。これら相互作用部位に結合する低分子化合物やペプチドを見いだし、Sema3A 作用の阻害薬物へと発展させることができると考えられる。当初の計画では 3 (6) に示したペプチドの効果確認を目標としたが、本研究期間内では研究方法の (1)

～(5)の実験及び論文発表(Nakamura, 2014)までに留まった。今後は(6)の実験について継続して検討する予定である。

引用文献

Goshima Y et al Nature 376:509-14, 1995.

Nakamura F et al J Neurobiol 44: 219-229, 2000.

Nakamura F et al Nat Commun doi: 10.1038/ncomms6325. 2014.

Uchida Y et al Gene Cell 10:165-79, 2005.

Yamashita N et al J Neurosci 27:12546-54, 2007.

Yoshimura T et al Cell 120:137-49, 2005.

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8件)*corresponding author

Fukuda N, Naito S, Masukawa D, Kaneda M, Miyamoto H, Abe T, Yamashita Y, Endo I, Nakamura F*, Goshima Y*. Expression of ocular albinism 1 (OA1), 3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA) receptor, in both neuronal and non-neuronal organs. Brain Res. 査読有 1602:62-74, 2015.

doi: 10.1016/j.brainres.2015.01.020.

Hida T, Nakamura F, Usui H, Takeuchi K, Yamashita N, Goshima Y*. Semaphorin3A-induced axonal transport mediated through phosphorylation of Axin-1 by GSK3β Brain Res 査読有 1598:46-56, 2015.

doi: 10.1016/j.brainres.2014.12.028.

Nakamura F*, Kumeta K, Hida T, Isono T, Nakayama Y, Kuramata-Matsuoka E, Yamashita N, Uchida Y, Ogura K, Gengyo-Ando K, Mitani S, Ogino T, Goshima Y*. Amino- and carboxyl-terminal domains of Filamin-A interact with CRMP1 to mediate Sema3A signalling. Nat Commun. 査読有 2014 Oct 31;5:5325. doi: 10.1038/ncomms6325. 2014.

Yamashita N, Usui H, Nakamura F, Chen S, Sasaki Y, Hida T, Suto F, Taniguchi M, Takei K, Goshima Y*. Plexin-A4-dependent retrograde semaphorin 3A signalling regulates the dendritic localization of GluA2-containing AMPA receptors. Nat Commun 査読有 2014 Mar 6;5:3424. doi:

10.1038/ncomms4424, 2014.

Isono T, Yamashita N, Obara M, Araki T, Nakamura F, Kamiya Y, Alkam T, Nitta A, Nabeshima T, Mikoshiba K, Ohshima T, Goshima Y*. Amyloid-β25-35 induces impairment of cognitive function and long-term potentiation through phosphorylation of collapsin response mediator protein 2. Neurosci Res 査読有 77: 180-185, 2013.

doi: 10.1016/j.neures.2013.08.005.

中村史雄、五嶋良郎：セマフォリン3A受容体としてのニューロピリン1・プレキシンA複合体 生体の科学 査読無 64: 498-499, 2013.

Takagawa S, Nakamura F*, Kumagai K, Nagashima Y, Goshima Y, Saito T*. Decreased Semaphorin3A expression correlates with disease activity and histological features of rheumatoid arthritis. BMC Musculoskelet Disord. 査読有 doi: 10.1186/1471-2474-14-40, 2013.

Kou K, Nakamura F*, Aihara M, Chen H, Seto K, Komori-Yamaguchi J, Kambara T, Nagashima Y, Goshima Y, Ikezawa Z*. Decreased expression of semaphorin-3A, a neurite-collapsing factor, is associated with itch in psoriatic skin. Acta Derm Venereol 査読有 92: 521-528, 2012.

doi: 10.2340/00015555-1350

〔学会発表〕(計3件)

Nakamura F and Goshima Y The interaction of CRMP1 and an actin binding protein Filamin-A mediates Sema3A signaling. ISN Special Conference 2014 9.22 東京大・農学部(東京)

Nakamura F and Goshima Y Collapsin Response Mediator Protein 1 augments Filamin-A and F-actin interaction in Sema3A-signaling. 第36回日本神経科学大会 2013. 6.22 京都国際会議場(京都)

中村史雄、五嶋良郎 Sema3A 情報伝達におけるアクチン結合蛋白質 Filamin-A と CRMP1 の相互作用 第85回日本生化学会大会 2012.12.15 福岡国際会議場(福岡)

〔その他〕

ホームページ

http://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/res/nakamura_201410.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 史雄 (Nakamura, Fumio)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：10262023

(2)研究分担者

有田 恭平 (Arita, Kyohei)
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究
科・准教授
研究者番号： 40549648

山下 直也 (Yamashita, Naoya)
横浜市立大学・医学研究科・客員講師
研究者番号：40508793

橋本 博 (Hashimoto, Hiroshi)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号：40336590
(H 2 5 年度より連携研究者)