

令和元年6月24日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19032

研究課題名(和文) 神経再生における成長円錐再形成機構

研究課題名(英文) Growth cone reformation in the axon regeneration

研究代表者

李 春 (Li, Chun)

名古屋大学・高等研究院(理)・特任助教

研究者番号：40755716

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)：1) LET-502-MLC-4-NMY-2からなるミオシンおよびその制御系が、軸索切断後の成長円錐形成に重要な役割を果たすことが明らかになった。2) CDK型プロテインキナーゼをコードしているSVH-16はJNK経路の上流あるいはJNK活性化で抑圧できるパラレルな経路で機能することが示唆された。3) アクチン結合タンパク質 -アクチニンの線虫ホモログATN-1はLIMドメインタンパク質ALP-1と結合することで神経軸索再生を制御することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経軸索の再生機構の解明は、医学的には事故や疾患による神経切断や欠損の治療法を開発する上で重要であり、社会的にも喫緊の研究課題である。従って、本研究は単なる学術的発見にとどまらず、ヒトにおける神経再生誘導の理解および再生治療に繋がることが期待される点で、日本発の極めて重要な研究と考える。

研究成果の概要(英文)：1. We found that LET-502-MLC-4-NMY-2 pathway regulated growth cone reformation in the axon regeneration. 2. We found that SVH-16, a CDK type protein kinase might have function in the upstream of JNK pathway or parallel to JNK pathway. 3. We found that C.elegans homolog ATN-1, actinin alpha 1 can bind to ALP-1, an ortholog of human LDB3 (LIM domain binding 3), which had important function in the axon regeneration.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経再生 線虫C.elegans

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

神経の再生は事故や疾患による神経切断や欠損を治療するための重要な課題であり、そのメカニズムの解明および再生を誘導する方法の開発は、医学的にも社会的にも喫緊のテーマである。軸索再生機構は種を越えて保存されており、モデル動物である線虫 *Caenorhabditis elegans* においても、哺乳動物と同様に軸索再生が起こる。通常、成長円錐は軸索の伸長が起こる発生期で数多く形成される一方、軸索の伸長が終了した神経ではほとんど形成されない。しかし近年の研究から、生体内で軸索が切断されると、発生終了後の神経においても新たな成長円錐が形成されることがわかってきた。切断を受けた軸索は、まずその切断部の先端が速やかに退縮して短くなり、先端に球状構造が形成される。その後球状の軸索先端が成長円錐に変化すると軸索の伸長が開始される。一方、軸索先端が成長円錐に変化しない場合には軸索の伸長は起こらない。切断軸索における成長円錐の形成現象は、分子生物学および遺伝学的解析が容易なモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* でも見出されている。申請者はこれまでに線虫の軸索再生を制御するシグナル伝達経路について、JNK MAPK 経路およびその上流を中心に解明してきた。一方、切断後の成長円錐の再形成がどのような細胞骨格タンパク質およびその制御因子の変化を介して起こるのか、そのメカニズムについてはよくわかっていなかった。

2. 研究の目的

成長円錐は、神経軸索が伸長する際に軸索末端に形成される放射状の構造体であり、物理的牽引力を生み出すことにより軸索を伸長させる役割を持つ。通常、成長円錐は軸索の伸長が起こる発生期で数多く形成される一方、軸索の伸長が終了した神経ではほとんど形成されない。しかし近年の研究から、生体内で軸索が切断されると、発生終了後の神経においても新たな成長円錐が形成されることがわかってきた。これまでの培養細胞を用いた解析から、成長円錐に局在するタンパク質としてアクチン/ミオシン系や GAP-43 などが報告されている。しかし、切断後に成長円錐の形成が再誘導される詳細なメカニズムについてはあまりよく分かっていない。そこで、本研究では、分子生物学および遺伝学的解析が容易なモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて軸索切断による成長円錐再形成機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、モデル動物である線虫を用いて、軸索再生時の成長円錐形成における（1）成長円錐形成における Rho-Rho キナーゼ-MLC-4 シグナル伝達経路（2）成長円錐形成における JNK 経路と細胞骨格との関係（3）細胞骨格制御タンパク質による神経軸索制御機構について、それぞれ解析を進めた。

4. 研究成果

まず、（1）で Rho-Rho キナーゼ-MLC-4 シグナル伝達経路が、切断軸索における成長円錐の再形成においてどのような役割を果たすか検討した。線虫の Rho キナーゼ *let-502* の変異体において軸索切断後の成長円錐形成率を見たところ、野生型と比べて顕著に低下することが判明した。また、この表現型は非筋ミオシン軽鎖の線虫ホモログ *mlc-4* のリン酸化型模擬フォームを発現させることにより抑圧された。そこで MLC-4 が本当に LET-502 によってリン酸化されているかどうか、免疫蛍光染色法により検討した。まず、野生型と LET-502 多量発現系統のそれぞれにおいて、抗リン酸化 MLC 抗体を用いて線虫内のリン酸化 MLC を検出したところ、LET-502 多量発現系統において発現神経における顕著な染色が認められた。さらに、軸索切断後の神経末端について検討したところ、野生型において切断軸索の先端部に顕著なリン酸化

MLC の染色を確認できた。さらに、線虫に複数あるミオシン重鎖のうち、軸索切断後の成長円錐形成に関与するものを探索した結果、*nmy-2* 変異体において軸索切断後の成長円錐形成率が顕著に低下することを見出した。この表現型はリン酸化ミミック型 MLC-4 の発現により抑圧できなかったことから、NMY-2 は MLC-4 の下流で機能すると推測される。以上の結果から、LET-502-MLC-4-NMY-2 からなるミオシンおよびその制御系が、軸索切断後の成長円錐形成に重要な役割を果たすことが明らかになった。

(2) 成長円錐形成における JNK 経路と細胞骨格との関係については、JNK 経路上で機能する遺伝子として同定された *svh-16* 遺伝子について解析を行なった。*svh-16* 遺伝子は CDK 型プロテインキナーゼをコードしており、その欠損変異体では軸索切断後の成長円錐形成率の顕著な低下が認められた。遺伝学的な解析から、*svh-16* 変異体でみられる形成率低下の表現型は、非筋ミオシン軽鎖の線虫ホモログ *mlc-4* のリン酸化型模擬フォームを発現させることにより抑圧された。このことから、SVH-16 は MLC-4 のリン酸化を介して機能する可能性が考えられた。MLC-4 のリン酸化は、Rho キナーゼによって誘導されることが哺乳動物で分かっている。線虫の Rho キナーゼ *let-502* の変異体も軸索切断後の成長円錐形成率が低下するが、その表現型も *mlc-4* のリン酸化型模擬フォームを発現させることにより抑圧された。しかし、LET-502 の活性化型の発現によっては *svh-16* 変異体でみられる軸索切断後の成長円錐形成率低下の表現型が抑圧できなかったことから、SVH-16 は LET-502 とは別の経路を介して MLC-4 のリン酸化を制御する可能性が示唆された。*svh-16* による再生制御の詳細をさらに解明するため、*svh-16* 変異体の再生率低下の表現型を抑圧する変異体を探索したところ、アクチン結合タンパク質カルポニンの線虫ホモログがその表現型を弱く抑圧できることを見出した。これらのことから、SVH-16 がアクトミオシン系を制御することにより、神経軸索再生を制御している可能性が示唆された。また、*svh-16* 変異体の軸索切断後の成長円錐形成率低下の表現型は、JNK 経路の MAPKKK である MLK-1 の多量発現により抑圧されたことから、SVH-16 は JNK 経路の上流あるいは JNK 活性化で抑圧できるパラレルな経路で機能することが示唆された。

(3) 細胞骨格制御タンパク質による神経軸索制御機構の解析については、アクチン結合タンパク質 α -アクチニンの線虫ホモログ ATN-1 に着目して、その解析を進めた。*atn-1* 変異体で軸索切断後の成長円錐形成率を見たところ、野生型と比べ顕著な低下が認められた。最近、当研究室では LET-502-MLC-4 経路において、BRCA2 の線虫ホモログ BRC-2 が、LIM ドメインタンパク質 ALP-1 を介して LET-502 を制御することで、LET-502 による MLC-4 のリン酸化制御をコントロールすることが明らかになっている。そこで、これらの因子と ATN-1 との関係について検討したところ、ATN-1 は ALP-1 と結合することが酵母ツーハイブリッド法により示唆された。しかし、*atn-1* 変異体で見られた神経軸索再生低下の表現型は活性化型 MLC-4 によっては抑圧できなかった。これらのことから、ATN-1 は ALP-1 と結合するものの、その神経軸索再生における作用点はミオシンの下流、または別経路上であることが示唆された。

以上の結果から、アクトミオシン系の細胞骨格タンパク質およびその制御因子が軸索切断後の成長円錐形成において重要な役割を持つことが明らかとなった。また、これらの因子の多くが発生過程における軸索伸長過程には関与しないことが観察されたことから、軸索切断後の成長円錐の再形成は、通常の発生過程で行われる成長円錐形成とは異なるメカニズムによると推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 査読有 (計 2 件)

- ① UNC-16/JIP3 regulates early events in synaptic vesicle protein trafficking via LRK-1/LRRK2 and AP complexes

Bikash Choudhary , Madhushree Kamak , Neena Ratnakaran, Jitendra Kumar, Anjali Awasthi, Chun Li, Ken Nguyen, Kunihiro Matsumoto, Naoki Hisamoto, Sandhya P. Koushika.

***PLOS Genetics* 13(11), e1007100 (2017).**

- ② Chaperone complex BAG2-HSC70 regulates localization of *Caenorhabditis elegans* leucine-rich repeat kinase LRK-1 to the Golgi.

Fukuzono T, Pastuhov SI, Fukushima O, Li C, Hattori A, Iemura S, Natsume T, Shibuya H, Hanafusa H, Matsumoto K, Hisamoto N.

***Genes Cells* 21(4), doi: 10.1111/gtc.12338. (2016)**

〔学会発表〕 (計 1 件)

7th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, Beijing, China , 2016/6/25~2016/6/28 ポスター発表

Cyclic AMP and an Ets transcription factor are required for the transcriptional induction of *svh-2* by axon severing

Chun Li¹, Naoki Hisamoto¹, Kunihiro Matsumoto¹

¹ Div. of Biol. Sci., Grad. School of Sci., Nagoya Univ., Japan

〔図書〕 (計 0 件)

〔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：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。