

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07107

研究課題名（和文）分岐軸索内における区画標識としてのチューブリン修飾の機能解明

研究課題名（英文）Function of tubulin modification as a signal to discriminate compartments in axons

研究代表者

小西 慶幸 (Konishi, Yoshiyuki)

福井大学・学術研究院工学系部門・教授

研究者番号：00382838

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は光遺伝学的にチューブリンの修飾酵素の活性を制御することで、特定の部位における修飾の機能を解析することを可能とすることを目的とした。チューブリンの脱チロシン化酵素として同定されたVASH1、および酵素活性に必要なサブユニットであるSVBPとの結合を、光スイッチ分子により操作する手法を検討し、光依存的にSVBP-VASH1複合体を長時間細胞膜へトラップすることに成功した。さらに軸索内の部位特異的な修飾の制御機構や、修飾に依存した軸索の形態制御機能について新たな知見を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軸索の分岐形態の調節は適切な神経回路の構築や可塑性において非常に重要であるが、神経細胞が特定の枝を識別し、伸長・退縮を調節する機構は解明されていない。本研究により得られた手法や知見は、チューブリン分子の翻訳後修飾を介した細胞内の空間的な識別機構の理解に大きく貢献すると考えられる。このことは、神経回路の形成や可塑性についての統合的理解に繋がるのみならず、軸索機能の破綻を介する神経老化や神経変性疾患について、新たな側面から病態の進行機序の理解に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to control the activity of tubulin-modifying enzyme optogenetically, and to analyze the function of the modification at a specific site in axons. We investigated a method of manipulating the binding of VASH1, a detyrosinating enzyme of tubulin, and SVBP, a regulatory subunit required for enzymatic activity, by an optical switch molecule. We succeeded in trapping in the cell membrane for a long time by photo-illumination. Furthermore, we reported new findings on the mechanism of site-specific modification of axons and the function of axon morphology control that depends on modifications.

研究分野：神経科学

キーワード：軸索 微小管 チューブリン 翻訳後修飾 光スイッチ

## 1. 研究開始当初の背景

認知や学習といった高次脳機能には異なる情報の統合が必要である。神経細胞は軸索の分岐を形成することで複数の領域への信号伝達を可能にする(Gibson and Ma, Development 2011)。分岐軸索パターンが発達期に再構築されることが適切な回路形成に非常に重要である。近年、二光子顕微鏡を用いたイメージングにより、発達期に加えて成体においても様々な脳内部位で分岐軸索の形態が頻繁に変化することが観察され、可塑性における役割が注目されている(Portera-Cailliau et al., PLoS Biol 2005, Hua et al., Nature 2005, Stettler et al., Neuron 2006, Nishiyama et al., Neuron 2007)。しかし、その制御機構の究明はまだこれからの段階であり、軸索の形成やガイダンスなどの分野に比べて大きく理解が遅れている。重要なことに、軸索の形態は一方の枝の退縮と同時に他方が伸長するなど、枝という区画に依存して制御される。これは単離培養した神経細胞においても観察され、細胞自律的な制御機構が大きく寄与していると考えられる。このような制御機構を理解するためには、軸索内の区画を認識する機構の解明が必要であるが、その知見は非常に限られている。

微小管は軸索形態の調節・維持に必須の構造体であり、その構成タンパク質であるチューブリンは多様な翻訳後修飾を受けることが古くから知られてきた。一方で、チューブリン修飾の神経細胞における機能について十分な理解がなされていなかったが、近年修飾に関わる酵素の同定が進み、国内外でその重要性が注目されている(Janke et al., Science 2005, Ikegami et al., JBC 2006, Creppe et al., Cell 2009, Akella et al., Nature 2010)。申請者はこれまでの研究で、軸索の伸長制御(Konishi et al., Science 2004)など、神経回路の構築に関わる細胞内分子機構を明らかにしてきた。研究の過程で、細胞の部位に依存した形態制御に興味を持ち、位置情報を担う分子の候補としてチューブリンの修飾に着目してきた。新規チューブリン修飾酵素の同定や機能解析(Kimura et al., JBC 2010, Konno et al., JCS 2016)に関わると共に、軸索と樹状突起における修飾の違いがキネシンを介した輸送極性を制御し、神経極性の維持に関わることを報告した(Konishi and Setou, Nat Neurosci 2009)。さらに軸索内にも同様な区画化機構が存在すれば、枝などの特定の軸索部位に依存した形態制御が説明できると考え研究を進め、分岐軸索内でキネシンが不均一に分配されることで、枝の末端の退縮の違いが生じることを発見した(Seno et al., JCS 2016)。キネシンによって認識される脱チロシン化およびアセチル化チューブリンの割合は微小管のターンオーバーに依存して枝によって異なり、これらの修飾が区画標識として機能する可能性が示唆された。しかし、これまでの研究では実際にこれらのチューブリン修飾が軸索内の区画標識として機能することを証明するには至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、チューブリン修飾が軸索内の区画標識として機能することを証明し、分岐軸索の形態を調節する細胞内のシステムを明らかにすることを目指す。このためには、チューブリン修飾を特定の枝のみで操作する手法が必要である。これまで神経細胞への毒性などの問題から実験が困難であったが、最近の技術の進歩により実現が可能になったと考えられる。本研究では、チューブリン修飾が枝の識別に関わる区画標識として機能することを明らかにすることを

目的とする。そのため、次のような研究を行う。神経細胞の初代培養において光遺伝学の技術を用いてチューブリン修飾酵素の活性を軸索の特定の枝で操作する。また、チューブリン修飾と軸索輸送、および軸索形態との関係を解析する。

### 3. 研究の方法

外来性の遺伝子導入によりチューブリン修飾を軸索の特定部位で操作するために、まず内在性の酵素の影響を除去することを試みた。これまで RNAi によるノックダウン等を用いてきたが残存する酵素の影響が無視できない状態であった。そこで CRISPR/Cas9 による遺伝子編集技術により内在性酵素を欠失させることを計画した。当初、TTL,  $\alpha$ TAT1, HDAC6 を標的とすることを想定したが、研究開始後、不明であったチューブリンの脱チロシン化酵素として Vasohibin1/2 (VASH1/2) および活性に必要なサブユニット、SVBP が同定された (Nieuwenhuis et al., Science 2017, Aillaud et al., Science 2017)。このため TTL および VASH/SVBP を標的として研究をすすめた。標的に対するガイド RNA (gRNA) をデザインし、gRNA および Cas9 ヌクレアーゼを発現する pX330 プラスミドに組み、細胞に導入した。

また、光操作を可能とするコンストラクトの作製を進めた。青色光の照射に依存してタンパク質相互作用の制御が可能な光スイッチ分子とチューブリン修飾酵素を融合することを計画した。特に VASH1/2 の活性には SVBP が必要であることから、この手法に適していると判断し、光スイッチ分子を用いて細胞膜に SVBP をトラップすることで VASH の活性を調節することを試みた。光スイッチとして用いられる分子として Phototropin1 の Lov2 ドメインをはじめ複数報告されているが、解離速度が速いものではタンパク質相互作用の維持のために継続的な光照射が必要であり、比較的遅い現象を対象にした本研究には不向きである。このため、解離速度が比較的遅く、実績もある Cryptochrome 2 (CRY2) とその結合因子 CIB を利用した。SVBP を CRY2 および蛍光タンパク質 mCherry と融合したコンストラクトを作製した。光照射依存的に CRY2 と結合する CIBn を細胞膜に局在させ、青色光を細胞に照射することで、SVBP/VASH の局在変化を解析するとともに、微小管の修飾について解析を行った。これらの実験に加え、軸索の枝ごとに異なるチューブリンのチロシン化/脱チロシン化の違いが生じる機構を解明するため、モデルを用いたシミュレーションと実験結果の比較解析を行った。また、それらの下流で枝の伸長・退縮が生じる機構をアクチンの制御因子 Arp2/3 に着目して解析を行った。

### 4. 研究成果

チューブリンのチロシン化酵素 TTL および脱チロシン化酵素の活性化サブユニット VASH の gRNA および Cas9 ヌクレアーゼを発現するプラスミドを構築した。また、pCAG-EGXXFP ベクター (Mashiko et al., Sci Rep 2013) に gRNA の標的配列を含む TTL および SVBP のゲノム配列を挿入し、レポーターを作製した。ゲノム編集によりレポーター内のゲノム配列が切断され、組み替えにより EGFP が発現する。これにより、ゲノム編集が起こった細胞を検出できる。293T 細胞にコンストラクトを導入したところ、gRNA 依存的に顕著な EGFP のシグナル増加が検出された。次にマウスから調整した小脳顆粒細胞を用いて同様の実験を行なった。神経細胞は生後 5 日のマウス小脳から取得し、調整後エレクトロポレーションによりベクターの導入を行った。

しかし、293T 細胞とことなり EGFP のシグナルはわずかに観察される程度であった。また、チロシン化チューブリンおよび脱チロシン化チューブリンに対する抗体を用いた免疫染色で、顕著なチロシン化チューブリンの低下は検出されなかった。これは分化後の神経細胞での組替えの低下が原因ではないかと考えられる。同様のシステムにより胎児期の前駆細胞に導入することで神経細胞において高確率（70-80%）の欠失が報告されている (Shinmyo et al., Sci Rep 2016)。この際、導入された前駆細胞はしばらく未分化の状態を維持するのに対し、我々の培養系では24時間のうちに殆どの細胞が分裂能を失う。今後、培養後数日間分裂を維持することで、効率をあげる手法を開発できると考える。

光照射により微小管の修飾を制御するため、VASH1 の活性に必要なサブユニットである SVBP を光スイッチ分子である CRY2 および蛍光タンパク質 mCherry と融合した。光照射依存的に CRY2 と結合する CIBN を細胞膜に局在させ、青色光を細胞に照射することで、SVBP を細胞膜にトラップできることを確認した。さらに、mTagBFP2 と融合した VASH1 を同時に細胞に発現させた。CRY2-mCherry-SVBP と mTagBFP2-VASH1 を発現した細胞は脱チロシン化チューブリンの割合が高いことから、CRY2-mCherry-SVBP は VASH1 と機能的な複合体を形成することが示された。光照射前後での局在を解析した結果、SVBP と共に細胞膜へ移行する様子が観察され、約 70% の VASH1 を細胞膜にトラップできることを確認した。さらに照射条件を検討し、6 分間隔でパルス照射することで1時間以上連続してトラップが可能であることを示した。さらに長時間の制御を可能にするために照射時間を伸ばすことを試みたが、細胞への毒性から良好な結果を得るにはいたっていない。このため、照射光源を LED に帰るとともに、解離の遅くなる変異を CRY2 導入することで、より長時間の制御を可能にする系の構築を進めている。

これらの実験と並行して、軸索内での枝に依存したチロシン化/脱チロシン化微小管の違いがどのようにして生じるかについて、モデルを持った解析を行った。軸索内の微小管の動的不安定生により、それぞれの枝において微小管の制御が異なることは必須ではなく、枝長に依存して微小管の安定化に差が生じることで、枝ごとの違いを説明できることを示した。実際、拡大顕微鏡方により、分岐点付近の微小管の修飾状態を観察結果により、我々の結果が妥当であることが示唆された。これら一連の機構の下流で、退縮を制御する機構として、アクチンの重合制御に着目し、Arp2/3複合体が、軸索の枝の退縮に必要であることを示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Inami Yoshihiro, Omura Mitsuru, Kubota Kenta, Konishi Yoshiyuki	4. 巻 1690
2. 論文標題 Inhibition of glycogen synthase kinase-3 reduces extension of the axonal leading process by destabilizing microtubules in cerebellar granule neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 51 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.04.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小西 慶幸	4. 巻 69
2. 論文標題 増大特集 タンパク質・核酸の分子修飾 .細胞質/オルガネラでの分子修飾 微小管 チロシン化,脱チロシン化	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 476 ~ 477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.11477/mf.2425200886">https://doi.org/10.11477/mf.2425200886</a>	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ikeno T, Konishi Y	4. 巻 14
2. 論文標題 Arp2/3 Is Required for Axonal Arbor Terminal Retraction in Cerebellar Granule Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochemical Journal	6. 最初と最後の頁 32-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1134/S1819712420010109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Konishi Y..	4. 巻 32
2. 論文標題 Mechanisms of differential branch growth control in the single axonal arbor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Forma	6. 最初と最後の頁 S25-S28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5047/forma.2017.s005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikeno T, Konishi Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Differential retraction of axonal arbor terminals mediated by microtubule and kinesin motor.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Commun Integr Biol.	6. 最初と最後の頁 e1288771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19420889.2017.1288771	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 小西 慶幸
2. 発表標題 チューブリンコードを介した神経細胞の形態制御とその攪乱
3. 学会等名 第6回北陸エビジェネティクス研究会. 10月30-31日, 福井市
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西 慶幸
2. 発表標題 軸索におけるミトコンドリアの配置制御
3. 学会等名 北陸合同バイオシンポジウム. 10月26-27日, あわら市
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikuma Hori, Nozomu Matsumoto, Seiji Miyake, Yoshiyuki Konishi
2. 発表標題 Distribution regularity of mitochondria and en passant presynaptic sites along axon in cerebellar granule neurons
3. 学会等名 Neuroscience 2019. 10月19-23日, Chicago, IL. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikuma Hori, Nozomu Matsumoto, Seiji Miyake, Yoshiyuki Konishi
2. 発表標題 Distribution regularity of mitochondria and en passant presynaptic sites along axon in cerebellar granule neurons
3. 学会等名 16th Asian society for mitochondrial research and medicine. 10月3-5日, Fukuoka (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上拓馬、小西慶幸
2. 発表標題 神経軸索内におけるCRY2-CIBNの相互作用を介した空間時間的な脱チロシン化のコントロール
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会. 9月11-14日, 福井
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今中千秋、葛西真里菜、島田聡史、小西慶幸
2. 発表標題 分岐軸索枝間における微小管の安定性に違いが生じる機構
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会. 9月11-14日, 福井
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikuma Hori, Nozomu Matsumoto, Seiji Miyake, Yoshiyuki Konishi
2. 発表標題 Distribution regularity of mitochondria and en passant presynaptic sites along axon in cerebellar granule neurons
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会. 9月11-14日, 福井
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平井真大、葛西祐介、小西慶幸
2. 発表標題 3-ニトロチロシンによる軸索退縮のメカニズム
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会. 9月11-14日, 福井
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野坂達哉、稲見吉祐、新谷哲郎、内藤里奈、小西慶幸
2. 発表標題 シナプスを介した小脳顆粒細胞の同期現象の解析
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会. 9月11-14日, 福井
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西 慶幸、堀 生実、松本 望、三宅 誠司
2. 発表標題 軸索内の停止型ミトコンドリアの時間的・空間的制御
3. 学会等名 Neuro2019. 7月25-28日, 新潟
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 拓馬、小西 慶幸
2. 発表標題 神経細胞内におけるCRY2-CIBN相互作用を利用した空間時間的な脱チロシン化のコントロール
3. 学会等名 Neuro2019. 7月25-28日, 新潟
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今中 千秋、伊藤 詩野、葛西 真里菜、島田 聡史、小西 慶幸
2. 発表標題 分岐軸索枝間における枝の長さに依存した微小管の安定化は軸索輸送及び形態調節に寄与する
3. 学会等名 Neuro2019. 7月25-28日, 新潟
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀 生実, 松本 望, 三宅 誠司, 小西 慶幸
2. 発表標題 軸索内におけるミトコンドリアとプレシナプスの分布規則性
3. 学会等名 第7回日本バイオマテリアル学会北陸信越ブロック若手研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Konishi, N. Matsumoto, I. Hori, C. Imanaka, S. Miyake
2. 発表標題 Region dependent regulatory mechanisms for the maintenance of axonal arbor structure
3. 学会等名 12th International Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Konishi
2. 発表標題 Intracellular molecular systems regulating the branched axonal structure
3. 学会等名 Basic and Translational Research for Brain Disease Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 望, 堀 生実, 三宅 誠司, 小西 慶幸
2. 発表標題 軸索内におけるミトコンドリアの一様の分布の制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小西 慶幸
2. 発表標題 軸索の維持に関わる細胞自律的機構
3. 学会等名 第58回 北陸実験動物研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀 生実, 松本 望, 三宅 誠司, 小西 慶幸
2. 発表標題 軸索内におけるミトコンドリアの分布規則性
3. 学会等名 第61回日本神経化学会大会・第40回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今中 千秋, 葛西 真里菜, 島田 聡史, 小西 慶幸
2. 発表標題 軸索枝間の競合をもたらす微小管制御モデル
3. 学会等名 第61回日本神経化学会大会・第40回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平井 真大, 葛西 祐介, 坪田 雅英, 小西 慶幸
2. 発表標題 3-ニトロチロシンによる軸索退縮のメカニズム
3. 学会等名 第61回日本神経化学会大会・第40回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小西慶幸、葛西真里菜、島田聡、池野 龍輝、瀬野 岳史
2. 発表標題 分岐軸索における微小管を介した枝間差の形成機構
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Konishi, N. Matsumoto, I. Hori, S. Miyake
2. 発表標題 Temporal and spatial regulation of stationary mitochondria in axon
3. 学会等名 11th International Symposium on Nanomedicine（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本望、堀生実、三宅誠司、小西 慶幸
2. 発表標題 神経軸索内におけるミトコンドリアの動態と分布様式の解析
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 稲見吉祐、小西慶幸、久保田健太、大村充
2. 発表標題 小脳顆粒細胞におけるGSK-3阻害が軸索に与える影響
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井大学研究者総覧 <a href="http://t-profile.ad.u-fukui.ac.jp/search/index.html?pn=p1">http://t-profile.ad.u-fukui.ac.jp/search/index.html?pn=p1</a> 分子細胞神経科学研究室ホームページ <a href="https://sites.google.com/site/konishilabneuron/home">https://sites.google.com/site/konishilabneuron/home</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考