

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
研究期間：2006～2008
課題番号：19300131
研究課題名 (和文) 新規軸索ガイダンス分子 LOTUS/CEP68 の生物学的解析
研究課題名 (英文) Biological analysis of a novel axon guidance molecule, LOTUS/cep68
研究代表者 竹居 光太郎
所属：横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：40202163

研究成果の概要：神経回路網形成を司る新しい生体物質 LOTUS を発見し、その物質の機能に関する解析を行った。LOTUS の結合分子として Nogo 受容体 (NgR1) を同定した。LOTUS と NgR1 の結合は、嗅覚情報を担う神経回路網の 2 次投射路である嗅索と呼ばれる神経束を形成するのに重要な役割を担うことが判明した。更にこの結合は、細胞同士の接着を誘起し、網膜神経節細胞や脊髄後根神経節細胞といった神経細胞の神経突起伸長を促したり、神経再生阻害因子である Nogo と NgR1 の結合を阻害したりすることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2008 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,800,000	2,340,000	19,240,000

研究分野：神経生物学

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：軸索ガイダンス、新規分子、細胞接着、神経突起伸長

1. 研究開始当初の背景

(1) 新規軸索ガイダンス分子 LOTUS の発見：申請者らは、独自に開発した新しい機能的スクリーニング法によって、嗅覚 2 次投射路である嗅索 (Lateral Olfactory Tract: LOT) の軸索束化を担う新規分子 LOTUS を発見した。ゲノムデータベースから、この分子には α -integrin が有する接着に関連する FG-GAP リピートを有する特徴があった。C 末端近傍には膜貫通領域があるが、我々は HEK293 細胞に強制発現した時の培養上清にもこの分子が検出されることから、分泌型と細胞膜貫通型の 2 種が存在すると考えた。CEP68 は軟骨細胞のマーカー分子であることが報告

(Steck, et al.,2001) されている以外、機能を含めて全く未知の分子である。

(2) LOTUS と結合する分子の同定：アルカリフォスファターゼ (AP) との融合タンパク質 AP-LOTUS を作製し、胎生 13 日目のマウス終脳の結合部位 (結合分子の存在部位) を検討したところ、AP-LOTUS は LOT とその周辺領域を含む広い範囲に結合していた。そこで申請者らは、LOT 発現遺伝子ライブラリーを用いて Nogo-66 受容体 (Nogo receptor-1:NgR1) を同定した。LOTUS と NgR1 との結合の IC_{50} はおよそ 7nM であった。

(3) LOTUS の発現部位：in situ hybridization 法によって LOTUS の mRNA 発現部位を解析

したところ、胎生 12~16 日目のマウスの嗅球中腹側部、LOT の内側領域、大脳皮質 subplate 層、海馬錐体細胞層などに特異的な発現が見られた。その他、網膜神経節などにも発現が認められた。

2. 研究の目的

本研究では、LOTUS の遺伝子欠損マウスを作製し、LOT 形成に関わる機能などの LOTUS の生物学的機能を解析する。また、培養神経細胞を用いた解析を行い、LOTUS の細胞レベルにおける分子機能についても解明する。

(1) LOTUS の遺伝子欠損マウスによる解析：ゲノムデータベース上では LOTUS の相同分子が見当たらないことから、単一遺伝子欠損による表現型の出現が期待される。理研 CDB との共同研究で LOTUS 遺伝子欠損マウスを作製し、胎生 12~16 日目のマウス胎仔脳における LOT 形成に関わる機能、及び他の発現部位における組織学的異常の有無を詳細に解析する。

(2) LOTUS の細胞機能解析：LOTUS 発現部位に存在する神経細胞（嗅球細胞や網膜神経節細胞など）の初代培養系を作製し、LOTUS を培養皿底面にコートした場合や LOTUS を培養上清に添加した場合における神経突起伸長活性を解析する。一方、LOTUS の NgR1 との結合部位を分子生物学的手法で LOTUS 変異体を作製して検討する

3. 研究の方法

(1) LOTUS 遺伝子欠損マウスの作製：LOTUS/CEP68 の遺伝子座はマウス染色体第 XIX 染色体 C3 に位置する。開始メチオンを含むゲノム領域約 10Kbp をクローニングして塩基配列を確認した後、Neo 耐性遺伝子カセットを Exon-1 領域に組み込み、また末端にはジフテリア毒素遺伝子を組み込んで非相同組み換えを排除する。この組み換えベクターを ES 細胞に導入して G418 存在下で培養し、組み換えクローンをサザンブロットにより選別し、8 細胞期の ICR マウス胚に組み換え ES 細胞を注入してキメラマウスを作製する。交配によりヘテロマウスを得て、C57/BL6 交雑交配を 8~10 世代に渡って行い、遺伝的背景を C57/BL6 系統にする。遺伝子欠損マウスの作製には、8~10 ヶ月程度の時間を要するので、ヘテロ及びホモ個体における解析は次年度で行う。変異マウスでは胎生致死であったり、生後発育不全によって成体での解析や継代維持に困難を来したりする場合があるので、系統維持はヘテロ個体で行い、ヘテロ個体の交配によってホモ個体を得る。ホモ個体が胎生致死の場合は、胎生期における解析のみ行う。ターゲティングベクターの作製からキメラマウスの作製までの変異マウス

作製過程は、共同研究者（中村）及び変異マウス作製の専門家の外部研究協力者（理研 CDB）との共同作業で行う。動物の交雑交配や系統維持は、横浜市立大学医学部実験動物センター内で法令と学内規範に準拠して行う。

(2) LOTUS の発現解析：嗅索 LOT はマウス胎生 12 日目から 14 日目の 2 日間でその大半が形成される。胎生 12~14 日目のマウス脳の前顎断および水平断連続切片を作製し、LOTUS および NgR1 について、*in situ* hybridization 法によって mRNA 発現部位を検出して詳しく解析し、遺伝子欠損マウスにおける解析対象を精査する。

(3) LOTUS における NgR1 の結合部位の同定：lotus 遺伝子の各ドメイン配列を N 末端または C 末端から順次削除した削除変異体 (LOTUS Δ) にアルカリフォスファターゼ (AP) を融合した融合タンパク質 (AP-LOTUS Δ) を作製する。NgR1 を強制発現させた COS7 細胞に AP-LOTUS Δ を添加し、AP 染色によって LOTUS における NGR1 との受容体結合部位を同定する。

(4) LOTUS の細胞機能解析：LOTUS は嗅球神経細胞、大脳皮質 subplate 層細胞、海馬錐体細胞、網膜神経節細胞などでも発現している。そこで、最初に嗅球神経と網膜神経節細胞の初代培養細胞を作製し、NgR1 の発現を免疫細胞化学的に確認した後、精製 LOTUS を培養皿底面にコートして基質として作用させた場合や、精製 LOTUS を培養上清に添加して浮遊性リガンドとして作用させた場合における神経突起伸長活性を解析する。また、同時に神経成長円錐の運動性や形態変化などについても解析し、神経回路網形成機構における役割について細胞レベルで考察する。

4. 研究成果

(1) LOT 形成における LOTUS・NgR1 結合の機能：免疫組織化学法によって LOTUS と NgR1 は共に嗅球から軸索が投射し始めるマウスの胎生 12 日目では投射予定領域（投射ルート）に発現し、LOT 投射が完了する胎生 14 日目では LOT 上に発現していた。マウス終脳器官培養系において LOTUS や NgR1 を前出の分子機能阻害技術 SELT-FALI 法で機能阻害したり、各々のドミナントネガティブ体を作製して作用させたりすると、どの場合も LOT の神経束がばらばらになる脱束化現象が見られた（図 1）。これらのことから、軸索上に発現する両者の結合が LOT の神経束形成に重要であることが明らかになった（論文投稿準備中）。NgR1 は神経突起伸長阻害因子の共通する受容体であるにもかかわらず、LOTUS との分子間相互作用では LOT 形成に促進的に寄与する。LOTUS は、既知の NgR1 のリガンド分子の機能とは全く異なる生理機能を発揮し、神

経発生のみならず神経再生医療技術へ応用する可能性が示された。

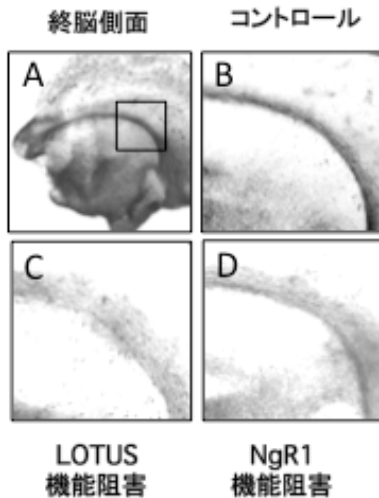


図1 SELT-FALI法によるLOTUSとNgR1の機能阻害

胎生12日目のマウス終脳側面には免疫染色によって可視化されたLOTが神経束として観られる(A)。終脳器官培養系においてSELT-FALI法でLOTUSおよびNgR1を各々機能阻害した時、コントロール(B)に比して明らかなLOTの脱束化現象(LOTの幅がバラバラに広がった現象)が見られた(C、D)。B～DはA画像内

(2) LOTUSの神経突起伸長促進作用：マウスL細胞にLOTUSとNgR1を各々強制発現させて混合培養すると、これらの細胞間において細胞間接着が誘起された。また、培養皿底面にコートした精製LOTUS上にNgR1の発現が確認された網膜神経節細胞Retinal Ganglion Cell (RGC)を培養して神経突起伸長について検討したところ、RGCはLOTUS上で劇的な突起伸長を示した(図2、特許出願1)。また、LOTUSのNgR1との結合領域だけを精製して培養皿底面にコートした場合も同様にRGCの顕著な神経突起伸長活性が認められた(特許出願3)。培養皿底面にコートした精製LOTUSをFALI法によって特異的に不活性化するとRGCの神経突起伸長は完全に抑制され、GPIアンカー型分子を細胞膜から除く酵素処理を行っても同様に神経突起伸長は完全に抑制された。これらのことから、LOTUSはNgR1との結合による接着機能を介して突起伸長促進作用を示すと考えられた。この実験結果は、よく知られているNgR1を介する神経突起伸長阻害作用とは全く正反対の作用を示しており、LOTUSはNgR1と細胞間結合(Trans-結合)することで神経突起伸長を促進することが判明した。

(3) 神経再生阻害因子との機能的関連：LOTUSは中枢神経系の神経再生を困難にする主要原因を担うNgR1と結合して神経突起伸長を促進する。LOTUSのNgR1の結合はミエリン

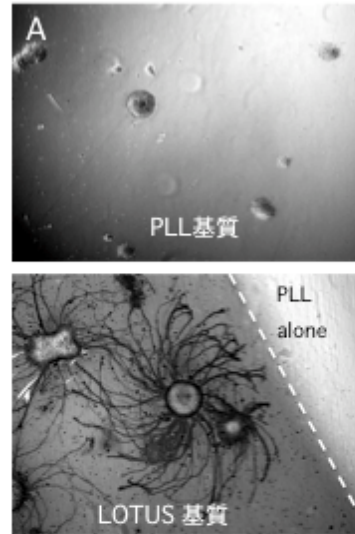


図2 網膜神経節細胞におけるLOTUSの神経突起伸長作用

胎生13日目の培養マウス網膜神経節(RGC)細胞は、(A) ポリ-L-リジン(PLL)を基質とした場合は全く突起形成が認められなかったのに対し、(B) LOTUS(25nM)を基質とした場合は顕著な突起伸長作用を示した。LOTUSがコートされている培養皿底面は呈色反応で黒く染色されている。

膜に存在する神経突起伸長阻害因子(神経再生阻害因子:Nogo-66, MAG, Omgp)の阻害作用に影響を与えるであろうか。COS7細胞においてLOTUSをNgR1と共に発現させたところ、驚くべきことに、Nogo-66またはMAGのNgR1との結合をほぼ完全に抑制した(図3)。COS7細胞に共発現したLOTUSとNgR1は細胞膜上で互いにCis-結合していることが確かめられたので、LOTUSとNgR1の同一細胞上でのCis-結合が、Nogo-66やMAGの結合を阻害すると考えられた。

次に、これらNogo-66やMAGといった神経再生阻害因子による作用をLOTUSの共発現によって抑制することができるかを検討した。神経再生阻害因子は後根神経節Dorsal Root Ganglion (DRG)細胞の成長円錐(伸長する神経突起先端に存在する構造)をコラプス(崩壊・退縮)させることがよく知られているので、DRG細胞にLOTUSを強制発現させてNogo-66による成長円錐のコラプス応答を調べた。LOTUSが発現するDRG細胞ではNogo-66による成長円錐のコラプス応答は強く抑制されていた(図4)。

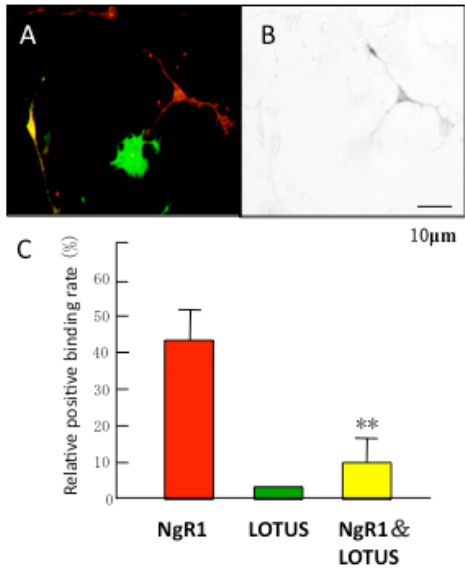


図3 LOTUS・NgR1共発現によるNogo-66結合阻害

COS7細胞にLOTUSおよびNgR1を共発現するとNogo-66のNgR1への結合が阻害された。(A) COS細胞におけるLOTUS(緑色), NgR1(赤色)およびLOTUS・NgR1共発現細胞(黄色)の発現を免疫染色で示す。(B) AP融合Nogo-66(AP-Ng66)のNgR1に対する結合はAPの呈色反応(黒色)で示す。NgR1単独発現細胞(赤色)ではAP-Ng66は結合しているが、LOTUS単独発現細胞(緑色)とLOTUS・NgR1共発現細胞(黄色)ではAP-Ng66は結合していない。(C) AP-Ng66の結合度の定量解析結果。

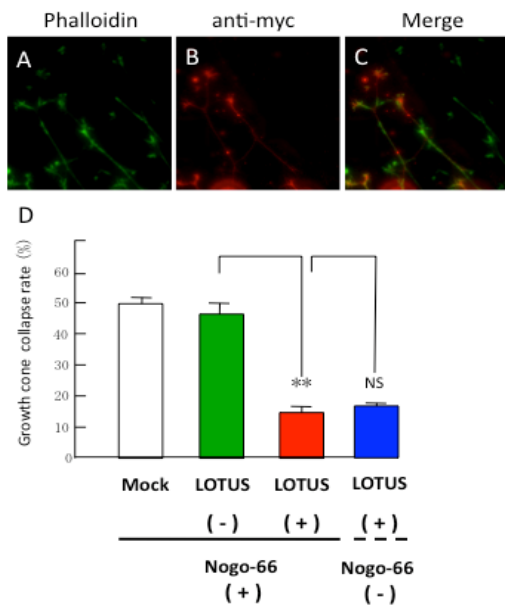


図4 LOTUS強制発現の成長円錐崩壊反応への効果

鶏卵胚DRGニューロンにLOTUSを強制発現させた時のNogo-66(Ng66)のによる成長円錐コラプス反応。卵胚生13日目の鶏卵胚DRGニューロンにはNgR1が発現し、Ng66によって成長円錐コラプス反応が起こることが知られている。この細胞におけるLOTUSの発現は低い。この細胞にLOTUSを強制発現した。(A) PhalloidinによってF-アクチン繊維を可視化して成長円錐の形態を観察した(緑色)。(B) mycタグ付きのLOTUSの発現を抗myc抗体で検出した(赤色)。(C) 重ね画像によってLOTUS発現細胞の成長円錐を識別した。(D) 観察した全細胞数に対するコラプス応答を示した細胞の数の割合で定量化した。LOTUSを強制発現するとNg66による成長円錐のコラプス応答はNg66を投与していないレベルに抑制された。

これらの結果は、LOTUS と NgR1 の *Cis*-結

合はNogo-66などの神経再生阻害因子による神経突起伸長阻害作用をブロックすることを明瞭に示している。内因性の生体物質がNgR1を負に機能制御した例は全く知られていない。因に、前述のように、精製LOTUSを培養基質として培養皿底面にコートしてDRG細胞を培養すると、RGCと同様に顕著な神経突起伸長作用が示された。現在、RGCにおいても同様の実験を実施し、神経再生阻害因子に対する機能制御の可能性を検討している。

以上のように、LOTUSは神経再生阻害因子の受容体NgR1と1)細胞間で*Trans*-結合することで神経突起伸長を促進し、2)同一細胞上で*Cis*-結合することで神経再生阻害因子による神経突起伸長阻害作用をブロックする(図5)。このような2面的機能を有するという意味においてもLOTUSは特徴的な生体物質である。これらの機能は双方とも神経再生を促進することに奏効することから、近未来的に神経再生医療技術に応用する研究展開が大いに期待される。

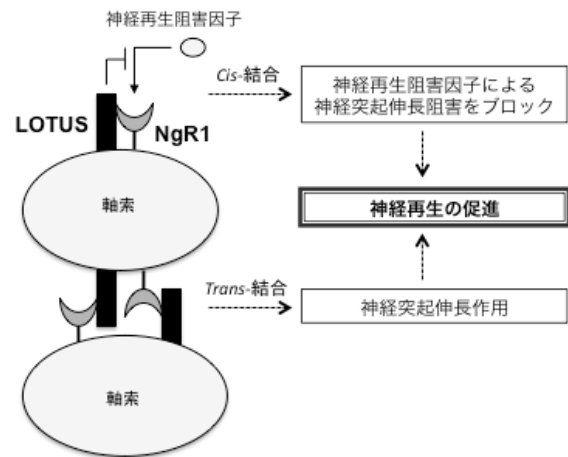


図5 LOTUSによる神経再生医療戦略

ミエリン膜上に発現するNogo, MAG, Omp1は神経細胞上のNogo-66受容体(NgR1)に結合したLOTUS(*Cis*-結合)によってNgR1への結合が阻害され、神経再生に促進効果をもたらす。一方、神経細胞間におけるLOTUS・NgR1の結合(*Trans*-結合)によって神経突起伸長が誘起される。双方とも相乗的に神経再生に対して促進効果をもたらすと期待される。

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7件)

- (1) Iketani, M., Imaizumi, C., Nakamura, F., Jeromin, A., Mikoshiba, K., Goshima, Y., and Takei, K. Regulation of neurite outgrowth mediated by neuronal calcium sensor-1 and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in nerve growth cones. *Neuroscience*, 163(3):

- 743-752 (2009). 査読有.
- (2) Fuchikawa, T., Nakamura, F., Fukuda, N., Takei, K., and Goshima, Y. Protein tyrosine phosphate SHP2 is involved in Semaphorin 4D-induced axon repulsion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, in press (2009). 査読有.
 - (3) Arie, Y., Iketani, M., Takamatsu, K., Mikoshiba, K., Goshima, Y., and Takei, K. Developmental changes in the regulation of calcium-dependent neurite outgrowth. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359: 11-15 (2009). 査読有.
 - (4) 竹居光太郎, 光照射による分子機能阻害法: 開発適用の歴史と新たな幕開け, 蛋白質核酸酵素 53 (3): 284-291 (2009 共立出版). 査読無.
 - (5) Abe, T. K., Honda, T., Takei, K., Mikoshiba, K., Hoffman-Kim, D., Jay, D. G., and Kuwano, R Dynactin is essential for growth cone advance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372: 418-422 (2008). 査読有.
 - (6) Yamashita, N., Morita, A., Uchida, Y., Nakamura, F., Usui, H., Ohshima, T., Taniguchi, M., Honnorat, J., Thomasset, N., Takei, K., Takahashi, T., Kolattukudy, P., and Goshima, Y. Regulation of spine development by semaphorin3A through cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of collapsing response mediator protein 1. *J. Neuroscience*, 27: 12546-12554 (2007). 査読有.
 - (7) Iizuka, A., Sengoku, K., Iketani, M., Nakamura, F., Sato, Y., Matsushita, M., Nairn, A. C., Takamatsu, K., Goshima, Y., and Takei, K. Calcium-induced synergistic inhibition of a translational factor eEF2 in nerve growth cones. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353: 244-250 (2007). 査読有.
- [学会発表] (計 17 件)
- (1) 竹居光太郎, 光による分子ターゲティング法: その簡便法の開発と適用. 日本顕微鏡学会バイオメディカルニューロマイクロスコプ分科会 特別講演, 2009 年 3 月 17 日, 東京.
 - (2) 池谷真澄, 有江裕子, 山口めぐみ, 栗原裕司, 五嶋良郎, 竹居光太郎, 新規軸索ガイダンス分子 LOTUS の Nogo 受容体を介する細胞機能. 第 30 回神経組織培養研究会, 2009 年 3 月 14 日, 湯河原.
 - (3) Sato, Y., Yamaguchi, M., Arie, Y., Iketani, M., Kurihara, Y., Sato, Y., Goshima, Y., and Takei, K., Discovery of LOTUS, a novel molecule axon guidance molecule. 生理研研究会 「神経系の発生・分化・再生に関する研究の新展開」 (第 3 回神経発生討論会). 2009 年 3 月 12 日, 岡崎.
 - (4) Yamaguchi, M., Sato, Y., Iketani, M., Arie, Y., Kurihara, Y., Nakamura, F., Kawasaki, T., Hirata, T., Goshima, Y., and Takei, K., Lateral olfactory formation by LOTUS, a novel molecule axon guidance molecule. 生理研研究会 神経系の発生・分化・再生に関する研究の新展開 (第 3 回神経発生討論会). 2009 年 3 月 12 日, 岡崎.
 - (5) Kurihara, Y., Arie, Y., Yamaguchi, M., Iketani, M., Sato, Y., Nakamura, F., Kawasaki, T., Hirata, T., Goshima, Y., and Takei, K., Promotion of neurite outgrowth mediated by LOTUS, a novel axon guidance molecule, and Nogo-66 receptor. 生理研研究会 神経系の発生・分化・再生に関する研究の新展開 (第 3 回神経発生討論会). 2009 年 3 月 12 日, 岡崎.
 - (6) Iketani, M., Yamaguchi, M., Arie, Y., Kurihara, Y., Yamashita, N., Sato, Y., Goshima, Y., and Takei, K., Expression pattern of LOTUS, a novel axon guidance molecule in developing mouse brain. 生理研研究会 神経系の発生・分化・再生に関する研究の新展開 (第 3 回神経発生討論会). 2009 年 3 月 12 日, 岡崎.
 - (7) 池谷真澄, 山口めぐみ, 有江裕子, 五嶋良郎, 竹居光太郎, 嗅索形成における新規軸索ガイダンス分子 LOTUS の機能解析. 2008 年度生理研研究会 シナプス研究会, 2008 年 12 月 4 日, 岡崎.
 - (8) 竹居光太郎, 光照射による分子機能阻害法: 簡便法の開発と適用. 第 49 回日本組織化学会総会全国学会, 招待講演, 2008 年 10 月 6 日, 長崎.
 - (9) 山口めぐみ, 佐藤泰史, 池谷真澄, 有江裕子, 五嶋良郎, 竹居光太郎 (2008) 終脳器官培養系における嗅索形成を司る新規機能分子の解析. 第 29 回神経組織培養研究会, 2008 年 9 月 20 日, 東京.
 - (10) Iketani, M., Sato, Y., Yamaguchi, M., Arie, Y., Kaneko-Sekiguchi, H., Nakamura, F., Goshima, Y., and Takei, K., Expression pattern of LOTUS, a novel molecule serving for neural circuit formation. 第 51 回日本神経化学会大会. 2008 年 9 月 13 日, 富山.

- (11) Sato, Y., Yamaguchi, M., Iketani, M., Arie, Y., Nakamura, F., Kawasaki, T., Hirata, T., Goshima, Y., and Takei, K., Identification of LOTUS, a novel molecule serving for neural circuit formation. 第51回日本神経化学会大会. 2008年9月13日, 富山.
- (12) Arie, Y., Yamaguchi, M., Sato, Y., Iketani, M., Kaneko-Sekiguchi, H., Nakamura, F., Mizuki, N., Goshima, Y. and Takei, K., Characterization of LOTUS, novel molecule serving for neural circuit formation, with Nogo-66 receptor. 第51回日本神経化学会大会. 2008年9月13日, 富山.
- (13) Yamaguchi, M., Sato, Y., Ikeani, M., Arie, Y., Kaneko-Sekiguchi, H., Nakamura, F., Goshima, Y., and Takei, K. (2008) Functional analysis of the receptor for LOTUS, a novel molecule serving for neural circuit formation. 第51回日本神経化学会大会. 2008年9月13日, 富山.
- (14) Takei, K., Yamaguchi, M., Sato, Y., Iketani, M., Arie, Y., and Goshima, Y., Functional screen combining fluorophore-assisted light inactivation and organotypic cultures of the developing brain. 第51回日本神経化学会大会. 2008年9月12日, 富山.
- (15) Sato, Y., Yamaguchi, M., Iketani, M., Arie, Y., Nakamura, F., Kawasaki, T., Hirata, T., Goshima, Y. and Takei, K., Identification and functional analysis of a novel axon guidance molecule involved in lateral olfactory tract formation. 第60回日本細胞生物学会, 招待講演, 2008年6月29日, 横浜.
- (16) 竹居光太郎, 局所タンパク合成による成長円錐の運動制御. 第112回日本解剖学会総会全国学会, 招待講演, 2007年3月27日, 大阪.
- (17) 竹居光太郎, 培養細胞における時空間的・選択的分子機能阻害法の適用とその応用. 第26回神経組織培養研究会. 招待講演. 2007年3月3日, 東京.

〔産業財産権〕

○ 出願状況 (計3件)

- (1) 特許出願: 神経突起伸長制御タンパク質, 公立大学法人横浜市立大学 (権利者), 竹居光太郎, 佐藤泰史, 五嶋良郎, 中村史雄 (発明者), 特願 2007-027615, 2007年2月7日, 国内出願.
- (2) 実用新案: 細胞培養基板, クラレ, 公立大学法人横浜市立大学 (権利者), 鶴田仁

- 志, 田崎剛, 竹居光太郎 (考案者), 第3140874号, 2008年3月19日, 国内登録.
- (3) 特許出願: 神経突起伸長促進剤, 公立大学法人横浜市立大学 (権利者), 竹居光太郎, 五嶋良郎, 中村史雄 (発明者), 特願 2009-036140, 2009年2月19日, 国内出願.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹居光太郎

横浜市大・医・准教授
40202163 (研究者番号)

(2) 研究分担者

中村史雄

横浜市大・医・准教授
10262023 (研究者番号)

(3) 連携研究者

五嶋良郎

横浜市大・医・教授
00153750 (研究者番号)