

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06923

研究課題名（和文）リン脂質ホスファターゼによる神経軸索の細胞骨格制御と側枝形成の分子機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of axon cytoskeletal regulation and collateral formation regulated by lipid phosphate phosphatases

研究代表者

安村 美里（Yasumura, Misato）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20533897

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：皮質脊髄路の神経細胞が橋核に伸ばす側枝をモデルとし、軸索の細胞骨格制御や側枝形成におけるリン脂質ホスファターゼの役割について解析を行った。着目したリン脂質ホスファターゼを皮質脊髄路の神経細胞でノックダウンすると、橋核に伸ばす軸索側枝の形成が阻害されることや、軸索の伸長が著しく阻害されることを明らかにした。また、培養神経細胞を用いた実験から、軸索の枝分かれを制御していると考えられている分子と相互作用することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軸索側枝形成は脳が精緻な神経回路を形成するメカニズムの1つであるが、側枝の形成を促すトリガー分子や細胞骨格の変化を引き起こす分子機構などは未だ十分には解明されていない。リン脂質ホスファターゼが軸索側枝形成に関与していることを示した本研究によって、神経回路形成の仕組みの理解が進むと期待できる。脳は損傷を受けると機能障がいが起こるが、代償機構が働くことで一部の機能は回復する。代償機構を担うのは軸索側枝形成による神経回路の再編成であるので、本研究の成果は、代償機構を向上させ、脳機能を回復させる新たな方法の開発にもつながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the roles of one of lipid phosphate phosphatases in axon cytoskeletal regulation and collateral formation in corticospinal projections, which are collateral projections from corticospinal tract neurons. We found that knockdown of a lipid phosphate phosphatase in the corticospinal tract neurons inhibited the axon collateral formation to the basilar pons, and significantly inhibited axon elongation. We also found that the lipid phosphate phosphatase interacted with molecules regulating axon branch formation.

研究分野：神経科学

キーワード：リン脂質ホスファターゼ 軸索側枝 皮質脊髄路

1. 研究開始当初の背景

神経回路形成のメカニズムのひとつに軸索側枝形成がある。神経細胞は軸索の途中に、側枝を形成し、複数の標的細胞とシナプスを形成する。これにより、神経細胞は複数の神経核に同時に信号を送ることができ、協調的な活動が可能となる。例えば、大脳皮質の運動野から脊髄へと投射する皮質脊髄路の神経軸索は、赤核、橋核、下オリーブ核に軸索側枝を伸ばし(O'Leary and Terashima, *Neuron*, 1988)、手足が複雑な運動を円滑に行うことを可能にしている。タイムラプスイメージングを用いた動態解析から、側枝の出芽は軸索シャフトへのアクチン線維の集積に始まり、複数のフィロポディアを形成した後、そのうちの数本に微小管が進入することで安定化することや、安定化した側枝がその後伸長することが明らかとなっている (Gallo, *Dev Neurobiol*, 2011)。しかしながら、このような軸索の細胞骨格の変化を側枝形成領域で引き起こす分子機構については、報告が非常に少ないため、依然として不明な点が多い。

申請者は、皮質脊髄路起始細胞が橋核に伸ばす側枝形成をモデルに研究を進め、リン脂質ホスファターゼの1つである Lipid phosphate phosphatase related protein (Lppr; Lppr1-Lppr5 の5つのファミリーメンバーが存在) が側枝形成に深く関与していることを見出した。Lppr は、培養細胞や初代培養神経細胞に過剰発現すると、フィロポディアや神経突起の数が顕著に増えることや (Velmans et al., *BMC Neurosci*, 2013; Broggin et al., *Aging*, 2016)、細胞骨格制御因子である RasGRF1 と結合する (Fan et al., *Oncotarget*, 2016) ことが知られている。これらのことから、Lppr は軸索周囲の環境 (橋核に発現する側枝誘導因子など) に応答して細胞骨格を制御し、皮質脊髄路起始細胞が橋核で側枝を伸ばす過程に働いていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、皮質脊髄路の軸索が橋核へと伸ばす側枝をモデルに、Lppr の細胞外領域に結合するリガンド分子や、下流で働くシグナル経路を同定することで、側枝形成時に軸索の細胞骨格を制御する分子機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) Lppr の突起形成能の評価

HEK293T 細胞に Lppr1-Lppr5 をそれぞれ過剰発現し、細胞体周囲に形成される突起の数を定量し、Lppr の突起形成能を評価する。

(2) 皮質脊髄路起始細胞での Lppr の発現確認

皮質脊髄路起始細胞特異的に GFP を発現するマウス (Tg(Fezf2-EGFP)CO61Gsat/Mmnc) の大脳皮質神経細胞から、FACS を用いて皮質脊髄路起始細胞を分離し、RT-PCR 法で Lppr の発現を確認する。さらに、*in situ* hybridization 法でも Lppr の発現を確認する。

(3) 皮質脊髄路起始細胞が橋核に伸ばす側枝形成への Lppr の関与の検討

皮質脊髄路起始細胞が産生される胎生 12.5 日目に子宮内電気穿孔法で shRNA ベクターと tdTomato の発現ベクターを導入し、Lppr のノックダウンが橋核への側枝形成に影響を及ぼすかを検討する。

(4) Lppr の下流で働く細胞骨格を制御するシグナルカスケードの同定

大脳皮質の培養神経細胞に Lppr と細胞骨格制御に関わる分子を共発現させ、側枝形成部位で共局在するものがあるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) Lppr の突起形成能の評価

Lppr は培養細胞に過剰発現させると、細胞体の周囲に多数の突起を形成することが知られている。5つのファミリーメンバー (Lppr1-Lppr5) それぞれを HEK293T 細胞に発現させ、細胞体

周囲に形成される、細胞体の単位長あたりの突起数を計測したところ、Lppr4 が最も高い突起形成能を有することが明らかとなった。この結果をもとに、以降の実験では主に Lppr4 について解析を進めた。

(2) 皮質脊髄路起始細胞での Lppr の発現確認

皮質脊髄路起始細胞特異的に GFP を発現するマウス (Tg(Fezf2-EGFP)CO61Gsat/Mmnc) の大脳皮質をパインで処理した後、FACS を用いて皮質脊髄路起始細胞を分離した。この細胞から mRNA を抽出し RT-PCR を行ったところ、皮質脊髄路起始細胞が橋核に側枝を形成する時期に、Lppr4 は皮質脊髄路起始細胞に発現していることが明らかとなった。また、Lppr4 以外のファミリーメンバーも同時期に皮質脊髄路起始細胞に発現していた。Lppr4 の mRNA が側枝形成時期に皮質脊髄路起始細胞に発現していることは、*in situ* hybridization 法によっても確認できた。皮質脊髄路起始細胞が局在する大脳皮質第 5b 層は Ctip2 に対する抗体を用いた免疫染色によって同定した。

Lppr4 に対する市販の抗体をいくつか試したが、免疫組織化学染色に使用できる抗体がなかったため、皮質脊髄路起始細胞での Lppr4 タンパク質の発現や局在を調べることが出来なかった。今後、ゲノム編集法を用いて Lppr 遺伝子にタグを組み込み、タグ特異的抗体で免疫染色を行うことで、内在性の Lppr4 の細胞内局在が明らかにできると考える。

(3) 皮質脊髄路起始細胞が橋核に伸ばす側枝形成への Lppr の関与の検討

皮質脊髄路起始細胞が産生される胎生 12.5 日目に子宮内電気穿孔法で Lppr4 に対する shRNA ベクターと、神経細胞標識用の tdTomato 発現ベクターを導入した後、生後 2 日目で脳切片を作製し、橋核に伸びる軸索側枝を観察した。コントロールの shRNA を導入した場合に比べ、皮質脊髄路起始細胞で Lppr4 をノックダウンすると、軸索側枝形成が阻害されていることが明らかとなった。さらに、Lppr4 をノックダウンすると、tdTomato でラベルされた神経細胞の数に対する皮質脊髄路の蛍光強度が、コントロールと比較して著しく低くなっており、Lppr4 は側枝形成だけでなく、皮質脊髄路の軸索伸長にも関与していることが示唆された。同様の方法を用いて、Lppr4 以外のファミリーメンバーも皮質脊髄路起始細胞でそれぞれノックダウンしたところ、Lppr4 のように軸索伸長に顕著な異常が見られるものはなかったが、側枝形成に影響が出るものがあった。さらに、Lppr1-Lppr5 を全てノックダウンすると、軸索伸長の異常は見られなかったが、橋核への軸索側枝形成が著しく阻害されることが明らかとなった。これらの結果は、Lppr1-Lppr5 が軸索伸長や側枝形成において、共通の役割と異なる役割を持っていることを示唆しており、今後解析を進めていくことで、それぞれの役割を明らかにできると考える。

(4) Lppr4 の下流で働く細胞骨格を制御するシグナルカスケードの同定

Lppr4 が関わる細胞骨格制御のシグナル経路について検討を行った。Lppr3 が PTEN の働きを阻害することで PIP3 を安定化し、軸索のブランチ形成を促進するということが知られているので (Brosig et al., *Cell Rep*, 2019)、Lppr4 も同様のメカニズムで細胞骨格を制御するかを検討した。初めに、Lppr4 は PTEN と結合するのかわを pull-down 法で確認したところ、Lppr3 と比較すると弱いですが、PTEN と結合した。次に、大脳皮質の培養神経細胞に、Lppr4 と、PIP3 に強く結合する Grp1 の PH ドメインを共発現させたところ、軸索上にできるブランチの付け根付近で両者は共局在しており、Lppr4 は PIP3 と共局在することが明らかとなった。これらの結果は、Lppr4 は Lppr3 と同様のメカニズムで細胞骨格を制御していることを示唆している。

<引用文献>

- O'Leary DD and Terashima T. *Neuron* 1988, 1(10):901-910. doi:10.1016/0896-6273(88)90147-x.
- Gallo G. *Dev Neurobiol* 2011, 71(3):201-220. doi:10.1002/dneu.20852.
- Velmans T et al., *BMC Neurosci* 2013, 14:36. doi:10.1186/1471-2202-14-36.
- Broggini T et al., *Aging* 2016, 8(10) :2463-2487. doi:10.18632.aging.101066.
- Fan Z et al., *Oncotarget* 2016, 7(18):26692-26708. doi:10.18632/oncotarget.8592.
- Brosig A et al., *Cell Rep* 2019, 29:2028-2040.e8. doi:10.1016/j.celrep.2019.10.039.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Uemura T, Suzuki-Kouyama E, Kawase S, Kurihara T, Yasumura M, Yoshida T, Fukai S, Yamazaki M, Fei P, Abe M, Watanabe M, Sakimura K, Mishina M, Tabuchi K	4. 巻 39
2. 論文標題 Neurexins play a crucial role in cerebellar granule cell survival by organizing autocrine machinery for neurotrophins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110624	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 Yasumura M, Hagiwara A, Hida Y, Ohtsuka T	4. 巻 26
2. 論文標題 Planar cell polarity protein Vangl2 and its interacting protein Ap2m1 regulate dendritic branching in cortical neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 987-998
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12899	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 Iguchi T, Oka Y, Yasumura M, Omi M, Kuroda K, Yagi H, Xie M-J, Taniguchi M, Bastmeyer M, Sato M	4. 巻 41
2. 論文標題 Mutually repulsive EphA7-EfnA5 organize region-to-region corticopontine projection by inhibiting collateral extension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4795-4808
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0367-20.2021	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 該当する
1. 著者名 Yoshimi K, Oka Y, Miyasaka Y, Kotani Y, Yasumura M, Uno Y, Hattori K, Tanigawa A, Sato M, Oya M, Nakamura K, Matsushita N, Kobayashi K, Mashimo T	4. 巻 140
2. 論文標題 Combi-CRISPR: combination of NHEJ and HDR provides efficient and precise plasmid-based knock-ins in mice and rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hum Genet	6. 最初と最後の頁 277-287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00439-020-02198-4	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasumura M, Hagiwara A, Hida Y, Ohtsuka T
2. 発表標題 Planar cell polarity protein Vangl2 interacts with Ap2m1 to regulate dendritic morphology in cortical neurons
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会 / 第1回CJK国際会議（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasumura M, Iguchi T, Sato M
2. 発表標題 Axon collateral formation by receptor protein tyrosine phosphatase and heparan sulfate proteoglycans
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Iguchi T, Oka Y, Yasumura M, Omi M, Taniguchi M, Sato M
2. 発表標題 Mutually repulsive EphA7-EfnA5 signaling organize region-to-region corticopontine projection by inhibiting axon collateral extension
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子 伊織、滋野 修一、安村 美里、Sampathkumar V、Kasthuri N、岡 雄一郎、佐藤 真
2. 発表標題 APEX電子タグを用いた大脳皮質領野をつなぐ回路発達
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安村美里、猪口徳一、谷口学、Mai Quynh Nguyen、佐藤真
2. 発表標題 リン脂質フォスファターゼを介した軸索側枝形成の分子機構
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安村 美里, 猪口 徳一, Nguyen Quynh Mai, 佐藤 真
2. 発表標題 受容体型チロシンフォスファターゼによる軸索側枝形成の分子機構の解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 美春, 猪口 徳一, 安村 美里, 岡 雄一郎, 佐藤 真
2. 発表標題 神経活動が神経回路側枝形成に関連する受容体型 PTPファミリー分子のスプライシングに与える影響について
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mai Q Nguyen, Tokuchi Iguchi, Misato Yasumura, Makoto Sato
2. 発表標題 LAR-RPTPs dimer formation: a potential key-step in the receptors activation control
3. 学会等名 第42回日本神経学会大会/第62回日本神経化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三田村耕平、猪口徳一、安村美里、岡雄一郎、黒田一樹、謝敏カク、Ruwaida Elhanbaly、深澤有吾、佐藤真
2. 発表標題 FIB-SEMを用いたPSD陽性樹状突起スパイン形態の解析
3. 学会等名 第95回 日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oka Yuichiro, Tiong Sheena Y.X., Yahaya Murtala Hamza, Sasaki, Tatsuya, Doi Miyuki, Yasumura Misato, Taniguchi Manabu, Sato Makoto.
2. 発表標題 An early subplate marker Kcnab1 is expressed in cortico-cortical projection neurons in layer 6b in the mouse neocortex.
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院医学系研究科 解剖学講座（神経機能形態学） http://www.anat2.med.osaka-u.ac.jp/

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
研究協力者	猪口 徳一 (Iguchi Tokuichi)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	谷口 学 (Taniguchi Manabu)		
研究協力者	岡 雄一郎 (Oka Yuichiro)		
研究協力者	佐藤 真 (Sato Makoto)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関