

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B)一般

研究期間：2008～2010

課題番号：20300111

研究課題名(和文)

神経極性形成を引き起こす新規分子 Shootin1 の分子作用機構と脳内機能の解析

研究課題名(英文)

Mechanism of Neuronal Polarization Mediated by Shootin and Its Roles in the Brain

研究代表者

稲垣 直之 (INAGAKI NAOYUKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：20223216

研究成果の概要(和文)：本研究では、Shootin1が軸索にいかにして濃縮するのかを解析し Shootin1が軸索のWave内のアクチンフィラメントと相互作用することによって軸索先端に輸送されることが解った。また、Shootin1が「クラッチ分子」としてアクチンフィラメントと細胞接着分子L1とを連結することにより軸索伸長のための牽引力を生み出すことがわかった。さらに、Shootin1ノックアウトマウスを作成して解析を行なったところ、大脳皮質、海馬、嗅球、中隔野、脳梁、海馬交連といった脳内の複数の領域で形成不全が認められた。このことから、Shootin1が脳神経系の発達に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the mechanism for shootin1 accumulation in axons, and found that shootin1 is transported to the axonal growth cones by interacting dynamically the actin filaments in the “wave” structures. Accumulation of shootin1 in the growth cones promoted neurite outgrowth by mediating the linkage between actin filaments and L1-CAM, as a “clutch” molecule. Furthermore, to analyze the functions of shootin1 in the brain, we produced shootin1 knockout mice; they showed agenesis in multiple regions in the brain, including the cerebral cortex, hippocampus, septum, olfactory bulb, corpus callosum, and hippocampal commissure. These results suggest that shootin1 plays an important role in neuronal polarization and brain development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経細胞, 極性, 軸索, Shootin1, アクチン, 成長円錐, クラッチ分子

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は1本の軸索と複数の樹状突起を形成して神経極性を獲得する。神経極性は、神経細胞の基本的な機能であるシグナルの入出力や統合に重要な役割を果たすにも関

わらず、その形成の分子機構は長らく不明であった。最近の我々の研究やその後の数多くの報告から、PI 3-kinaseやPAR3/6、GSK-3・、CRMP-2といった分子群の細胞内におけるシグナルの非対称性が神経細胞の極性形成に

寄与することが明らかとなりつつある。しかし、このようなシグナルの細胞内における非対称性がどのような分子メカニズムで生じるかという本質的な問題は大きな謎である。また、脳内においてこれらの分子が実際に神経極性形成に関与しているかに関しても、その多くは依然として不明であった。

我々は、これまでの大規模なプロテオーム解析により、培養神経細胞の極性形成に伴って時間的・空間的な発現の変動が見られる数多くのタンパク質群を同定し、その中に新規の脳特異タンパク質Shootin1を見出した。さらに、タイムラプス顕微鏡を用いた研究から、極性形成の過程でShootin1がWaveと呼ばれる成長円錐によく似たアクチン骨格に富む構造物によって細胞体から神経突起先端の成長円錐まで能動的に輸送され、将来軸索になる神経突起にダイナミックに濃縮されてゆくことがわかった。

そこで我々は、以上の研究成果をさらに発展させて、Shootin1の神経極性形成作用の分子メカニズムおよび脳内における機能を解明するために本申請課題を着想するに至った。

2. 研究の目的

具体的には、まずShootin1が極性形成過程でいかにして将来軸索になる神経突起に濃縮するのか、その分子輸送機構を解析する。Waveは、神経突起のシャフトに沿って細胞体から突起先端に向かって移動するが、Wave内には数多くのアクチン骨格が存在している。また、後述のようにShootin1は成長円錐においてアクチン骨格と結合する。そこでここでは、細胞内1分子計測法を用いてWaveにおけるShootin1とアクチン骨格との相互作用を解析し、Shootin1が極性形成過程で将来軸索になる神経突起にいかにして非対称に濃縮するのか、その分子輸送メカニズムの解明を目指した。

次に、Shootin1が持つ軸索形成作用の分子機構を解析した。また、免疫沈降実験から、Shootin1が細胞接着タンパク質L1-CAMと相互作用することを証明しており、Shootin1の1分子計測実験から、Shootin1が軸索先端の成長円錐においてアクチン骨格とダイナミックに結合と解離を繰り返すことを見出している。そこで、Shootin1がこれらの分子と相互作用することによって、いかにして突起の伸長を引き起こして軸索の形成を誘導するのかを分子レベル解析した。またリン酸化によるShootin1の機能調節も解析した。

また、脳内の神経細胞におけるShootin1の機能を明らかにするために、Shootin1ノックアウトマウスを作成し、ノックアウトマウスの脳神経系の異常および組織学的変異を解析した。

以上の一連の研究を通じて、Shootin1が神経極性形成過程でいかにして非対称シグナルを形成して軸索の形成を誘導するのかを分子レベルで解明し、さらに脳内におけるShootin1の機能が明らかとすることを目指した。

3. 研究の方法

実験材料として、胎生18日のラット海馬より調製した培養神経細胞を用いた。ラット培養海馬神経細胞は軸索と樹状突起がよく発達しており、また比較的均一な細胞が得られるため、神経軸索の研究に適している。海馬神経細胞への遺伝子導入はNucleofector (amaxa)を用いた。RNAiによる遺伝子発現の抑制はBLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (Invitrogen)を用いて行った。レーザーピンセットを用いた実験は、上口らの手法 (*J. Neurosci.* 21, 9194, 2001)で行った。また、EGFP-shootin1の細胞内1分子計測は、渡邊らの手法 (*Science* 295, 1083, 2002)を用いた。抗体を用いた細胞染色とイムノブロットは、以前報告した手法 (*Nat. Neurosci.* 4, 781, 2001)に従った。

4. 研究成果

[Shootin1の神経軸索への濃縮機構の解析]
本研究ではまず、Shootin1が神経軸索へいかにして濃縮するのかその分子機構の解析を行なった。Waveは、神経突起のシャフトに沿って細胞体から突起先端に向かって移動するが、Wave内には数多くのアクチン骨格が存在している。そこで、細胞内1分子解析によって、Shootin1とアクチンフィラメントとの相互作用したところ、Shootin1がWave内のアクチンフィラメントと相互作用することがあきらかとなった。また、アクチンフィラメントの重合をサイトカラシンで阻害するとShootin1の神経軸索への濃縮が阻害された。

以上の結果から、Shootin1がWave内のアクチンフィラメントと相互作用することによって神経突起先端に輸送されることが示唆された。

[Shootin1が持つ軸索形成作用の分子機構の解析]

これまでの研究で、Shootin1が神経軸索先端の成長円錐に濃縮して存在し、また、Shootin1の成長円錐への濃縮は軸索の伸長を引き起こすことがわかった。そこでShootin1がどのような分子メカニズムで軸索を伸長させるのかを解析した。成長円錐にはアクチンフィラメントが豊富に存在し、そのダイナミクスが軸索の伸長とガイダンスに関与すると考えられている。成長円錐

におけるShootin1とアクチンフィラメントの局在を調べたところ、Shootin1は培養海馬神経細胞成長円錐にあるフィロポディアやラメリポディアにおいて、アクチンフィラメントに沿って局在することがわかった。

我々は、これまでの研究により、Shootin1が細胞接着タンパク質L1-CAMと相互作用することを証明しており、Shootin1の1分子計測実験から、Shootin1が軸索先端の成長円錐においてアクチン骨格とダイナミックに結合と解離を繰り返すことを見出している。L1は軸索成長円錐においてアクチンフィラメントの逆行性移動と連結していることが報告されている(*J. Neurosci.* **21**, 9194, 2001)。そこで、レーザーピンセットを用いてL1でコートされた直径1・mのマイクロビーズを成長円錐の上のせ、マイクロビーズの動きを見ることで成長円錐の上のL1の動きを計測した。コントロールの神経細胞では、既に報告されているようにL1は成長円錐上を逆行性に移動した。一方、RNAiによるShootin1の発現の抑制を行った場合は、成長円錐上でのL1の逆行性の動きが遅くなった。また、Shootin1のN端を欠失させた変異体であるデルタNを発現させた場合も、Shootin1のアクチンフィラメントとの相互作用がブロックされて成長円錐上のL1の動きが遅くなった。一方、Shootin1を過剰に発現させた場合は、成長円錐上のL1の動きが早くなった。以上の結果から、Shootin1が成長円錐でアクチンフィラメントの逆行性移動とL1とを連結させることにより、細胞膜上のL1を逆行性に移動させることが結論された。

最後に、Shootin1によるアクチンフィラメントとL1の連結の軸索伸長に対する影響を調べた。前述のように、RNAiによりShootin1の発現を抑制する、もしくはデルタNを発現させてShootin1のアクチンフィラメントとの相互作用がブロックした場合、Shootin1によるアクチンフィラメントとL1との相互作用を抑制することができる。培養海馬神経細胞にこの処理を行った場合、コントロールの神経細胞に比べての軸索の伸長が有意に抑制された。逆に培養海馬神経細胞にShootin1を過剰に発現させてShootin1によるアクチンフィラメントとL1との相互作用を強めた場合は、神経突起の伸長が有意に促進された。

以上の結果から、Shootin1が「クラッチ分子」としてアクチンフィラメントと細胞接着分子L1とを連結することにより軸索伸長のための牽引力を生み出すことが示唆された。

[Shootin1とアクチンフィラメントとの

相互作用を介在する新たな「クラッチ分子」の探索]

さらに、Shootin1とアクチンフィラメントとの相互作用を介在する第2の「クラッチ分子」の探索を行った。免疫沈降法を用いて、種々のアクチンフィラメント結合タンパク質をスクリーニングしCortactinを同定した。CortactinはShootin1と直接結合し、また内在性のCortactinとShootin1も結合することがわかった。CortactinとShootin1は軸索先端でアクチンフィラメントと共局在し、細胞内1分子計測による解析の結果、両分子ともアクチンフィラメントと相互作用することが解った。さらに、In vitro actin sedimentation assayを行った結果、Shootin1とアクチンフィラメントは直接結合しないがCortactin存在下で両分子が結合することがわかった。

以上の結果から、CortactinがShootin1とアクチンフィラメントとの相互作用を介在する第2の「クラッチ分子」として機能する可能性が示唆された。

[Netrin-1刺激によるShootin1のリン酸化の解析]

軸索伸長速度の調節機構に関して、軸索誘引分子Netrin-1に着目して解析を行なった。その結果、Shootin1が誘引性軸索ガイダンス分子Netrin-1の下流でリン酸化酵素PAK1によりリン酸化を受けることが解った。また、PAK1によりリン酸化を受けたShootin1は、突起伸長作用が増強することも解った。

このことから、Shootin1が細胞外Netrin-1の影響を受けて軸索を形成する方向性を決める興味深い可能性が示唆された。

[Shootin1ノックアウトマウスの作製と解析]

脳内の神経細胞におけるShootin1の機能を明らかにするために、Shootin1ノックアウトマウスを作成し、ノックアウトマウスの脳神経系の異常および組織学的変異を解析した。その結果、大脳皮質、海馬、嗅球、中隔野、脳梁、海馬交連といった脳内の複数の領域で形成不全が認められた。

以上のことから、Shootin1が脳神経系の発達に重要な役割を果たすことが示唆された。

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) Inagaki, N., Toriyama, M. and Sakumura, Y., Systems biology of symmetry-breaking during neuronal polarity formation, *Dev. Neurobiol.* **71**,

- 584-493 (2011). 査読有
- 2) Akashi, K., Yoshida, K., Kuwano, M., Kajikawa, M., Yoshimura, K., Hoshiyasu, S., Inagaki, N., Yokota, A., Dynamic changes in the leaf proteome of a C3 xerophyte, *Citrullus lanatus* (wild watermelon), in response to water deficit/watermelon), in response to water deficit, *Planta*, in press (2011). 査読有
 - 3) 鳥山道則、作村諭一、稲垣直之、神経細胞が突起の長さを検知する仕組みと神経細胞の対称性の破れ、*遺伝* 65、80-86 (2011). 査読無
 - 4) Toriyama, M., Sakumura, Y., Shimada, T., Ishii, S. and Inagaki, N., A diffusion-based neurite length sensing mechanism involved in neuronal symmetry-breaking, *Mol. Syst. Biol.* 6, 394 (2010). 査読有
 - 5) Yamatani, H., Kawasaki T., Mita S., Inagaki N. Hirata T., Proteomic analysis of temporal changes in axonal proteins during maturation, *Dev. Neurobiol.*, 70, 523-537 (2010). 査読有
 - 6) 鳥山道則、稲垣直之、ニューロンにはアクソンは1本しかないのか?、*Clinical Neuroscience* 28, 113 (2010). 査読無
 - 7) Shimada T., Toriyama M., Uemura K., Kamiguchi H., Sugiura T., Watanabe N. Inagaki N., Shootin1 interacts with actin retrograde flow and L1-CAM to promote axon outgrowth, *J. Cell Biol.* 181, 817-829 (2008). 査読有
- [学会発表] (計 15 件)
- 1) Toriyama, M., Sakumura, Y., Shimada, T., Ishii, S. and Inagaki, N., Neuronal symmetry-breaking by a positive feedback loop involving neurite length-dependent shootin1 accumulation, The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, 2010年12月14日, Philadelphia, USA.
 - 2) 稲垣直之、Generation of mechanical force for axon outgrowth by the molecular clutch mechanism、ワークショップ「細胞が感じる力と生みだす力」、第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会、2010年12月11日、神戸
 - 3) 久保佑亮、鳥山道則、稲垣直之、軸索伸長を引き起こすクラッチメカニズムの分子ネットワークの解析、第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会、2010年12月8日、神戸。
 - 4) Sakumura, Y., Toriyama, M., Inagaki, N., Multimodal feedback control for neuronal morphological polarization, The 33rd annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuro2010), 2010年9月4日、神戸。
 - 5) Shibata, H.S., Katsuta, K., Toriyama, M., Kanemura, S., Horinouchi, K. and Inagaki, N., Shootin2 : a candidate for a clutch molecule involved in the migration of ganglionic eminence-derived inhibitory neurons, The 33rd annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuro2010), 2010年9月4日、神戸。
 - 6) Nakazawa H., Sada, T., Mori, T., Fukuda, M., and Inagaki, N., Rab33a interacts with singar1 and promotes axon formation, 第62回日本細胞生物学会大会、2010年5月19日、大阪。
 - 7) 稲垣直之、神経細胞の対称性の破れに関与するポジティブフィードバックループ、シンポジウム「フィードバックループと形づくり」、第82回日本生化学会大会、2009年10月24日、神戸。
 - 8) 中澤瞳、佐田忠行、森達也、福田光則、稲垣直之、神経極性の安定化に関与する新規分子Singar1の作用機構の解析、第82回日本生化学会大会、2009年10月24日、神戸。
 - 9) 鳥山道則、島田忠之、上口裕之、杉浦忠男、渡邊直樹、稲垣直之、クラッチ分子Shootin1による神経突起伸長機構の解析、第32回日本神経科学大会、2009年9月16日、名古屋。
 - 10) 稲垣直之、プロテオミクスと数理解析から見てきた神経細胞が極性を獲得する仕組み、モーニングレクチャー、第56回日本生化学会近畿支部会、2009年7月18日、大阪。
 - 11) 鳥山道則、作村諭一、島田忠之、石井信、稲垣直之、Shootin1による神経突起長の計測と神経突起伸長の促進は神経極性形成を誘導する、第61回日本細胞生物学会大会、2009年6月2日、名古屋。
 - 12) 稲垣直之、Shootin1を介した神経細胞の非対称性獲得、シンポジウム「システム生物学による機能解剖学」第114回日本解剖学会総会、2009年3月28日、岡山。
 - 13) Inagaki, N., A neurite-length sensing system involved in neuronal symmetry breaking, 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会シンポジウム「神経細胞と極性」、2008年12月11日、神戸。
 - 14) 鳥山道則、作村諭一、島田忠之、石井信

、稲垣直之、Shootin1による神経突起計測および神経突起伸長の促進は神経極性形成を誘導する、第31回 日本分子生物学会・第81回 日本生化学会合同大会、2008年12月10日、神戸。

- 15) 島田忠之、鳥山道則、上口裕之、杉浦忠男、渡邊直樹、稲垣直之、Shootin1は成長円錐のアクチンフィラメント求心性流動と細胞接着分子L1-CAMとを連結することによって神経軸索伸長を促進する、第60回日本細胞生物学会大会ミニシンポジウム「細胞突起の形成と発達のメカニズム」、2008年6月29日、横浜。

〔図書〕(計1件)

- 16) Mori T., Inagaki N., Kamiguchi H., Neuronal Process Outgrowth, In Lajtha F. W., Mikoshiba, K. (eds): Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, Springer-Verlag, 2009, pp40-44.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計1件)

名称: 神経成長円錐局在分子Shootin1もしくはそのスプライシングバリエーションを利用した神経軸索の形成・伸長と神経再生への応用
発明者: 稲垣直之、島田忠之、鳥山道則、小原收、長瀬隆弘

権利者: 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学、財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

種類: 特許

番号: 特許第4592352号

取得年月日: 2010年08月24日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページアドレス

http://nippon.naist.jp/inagaki_g/

メディア発表

- 1) 朝日新聞(2008年6月3日朝刊29面) 神経成長にクラッチ役 軸索伸びる仕組み解明 奈良先端大。
- 2) 読売新聞(2008年6月3日朝刊2面) 神経細胞軸索成長タンパク質を確認 奈良先端大学院大。
- 3) 毎日新聞(2008年6月3日朝刊3面) 神経伸ばす第三「分子」奈良先端科技大タンパク質解明。
- 4) 産経新聞(2008年6月3日朝刊25面) 「神経成長に作用」タンパク質を確認 奈良先端科学技術大学院。
- 5) 日経産業新聞(2008年6月3日朝刊10

面) 神経伸ばす調節役 奈良先端大などタンパク質特定。

- 6) 日刊工業新聞(2008年6月3日朝刊24面) 神経のクラッチ役解明 たんぱく質「シューテイン」細胞伸びに関与 奈良先端科技大。
- 7) 奈良新聞(2008年6月3日朝刊13面) 神経のクラッチ発見 先端大、伸縮の仕組み解明 再生医療へ応用期待。
- 8) 京都新聞(2008年6月3日朝刊25面) 神経成長速める物質 奈良先端科学技術大学院大 ラットで解明。
- 9) 化学工業日報(2008年6月5日朝刊11面) 神経細胞再生治療法開発などに期待 奈良先端科技大が神経を伸ばすしくみ解明。
- 10) 朝日新聞(2010年8月3日12面) 「対称性の破れ」数式化 神経細胞の成長分析 奈良先端大。
- 11) 読売新聞(2010年8月2日13面) 神経細胞の突起 伸びるのは「偶然」。
- 12) 毎日新聞(2010年8月10日19面) 「非対称に成長」仕組み解明 奈良先端大ラット実験。
- 13) 産経新聞(2010年7月28日31面) 脳神経細胞の形成 奈良先端大が解明
- 14) 科学新聞(2010年7月30日1面) 生物の「対称性の破れ」仕組みを神経細胞で解明 奈良先端大。
- 15) 日本経済産業新聞(2010年7月29日12面) 神経細胞の成長課程 非対称の仕組み解明 奈良先端大 再生医療に応用も。
- 16) 日刊工業新聞(2010年7月28日27面) 神経細胞軸索伸長の仕組み解明 奈良先端大 再生医療へ応用。
- 17) NHK奈良「かんさいニュース1番」(2008年6月3日) 神経細胞の速度調節のタンパク質判明 奈良先端科学技術大学院大学。
- 18) NHK関西「ニュース」(2008年6月10日) 神経細胞の速度調節のタンパク質判明 奈良先端科学技術大学院大学。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 直之 (INAGAKI NAOYUKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号: 20223216

(2) 研究分担者

島田 忠之 (SHIMADA TADAYUKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号: 80379552