

平成22年5月28日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20700339

研究課題名(和文) 反発因子セマホリンによるレドックスシグナリングの分子機構

研究課題名(英文) Redox signaling in Semaphorin-mediated axon guidance

研究代表者

稲留 涼子 (INATOME RYOKO)

東京薬科大学・生命科学部・研究員

研究者番号：90408691

研究成果の概要(和文)：

神経回路形成過程において神経軸索はセマホリンなどの反発因子やネトリンなどの誘因因子にナビゲートされながら、最終的に標的細胞とシナプスを形成する。しかしながら、その分子機構についてはいまだ不明な点が多い。申請者は神経回路形成の分子機構について解析した結果、神経発生に関与する新規タンパク質(CRAM, CRAG, M-septin, MITOL)の同定に成功した。これらの分子群の機能は未だ不明な点が多いが、その重要性は様々な実験結果より示唆されている。本研究においてこれらの分子の機能解析を行い、神経回路形成におけるレドックスシグナリングという新しいシグナル伝達機構の一端を明らかにした。さらに、これらの研究成果を基に神経変性疾患の病態の解明および遺伝子治療法を開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：

During neural circuit formation repulsive and attractive factors such as semaphorins and netrin play a crucial role in axon guidance. However, their intracellular mechanisms are largely unknown. We have previously identified several novel proteins named CRAM, CRAG, M-septin, MITOL, which were involved in semaphoring-mediated signaling. Although exact roles of these molecules in neural development remained unclarified, these proteins were suggested to be involved in redox signaling via reactive oxygen species (ROS). Indeed, we observed the nuclear translocation and activation of CRAG in response to ROS generated by semaphorin stimulation. This fact suggested a novel concept that axon guidance signaling is redox reaction. Further studies may make clear the molecular mechanism of redox signaling in neural development. In addition, these studies may shed light on the mechanisms and develop new therapy for neuronal degenerative disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：細胞内情報伝達

## 1. 研究開始当初の背景

神経回路形成過程において、神経軸索は、セマホリンなどの反発因子やネトリンなどの誘因因子にナビゲートされながら、最終的に標的細胞とシナプスを形成する。セマホリンは酸化還元酵素である MICAL を活性化して活性酸素種を産生する可能性が示され、軸索ガイダンスのシグナル伝達機構においてレドックス反応が関与するという新しい概念が提唱されたがその実態は不明であった。申請者らが発見した CRAG が活性酸素種によって活性化して核移行し、核内においてストレス応答を伝達することより、CRAG をレドックス反応の実態分子として位置づけることができ、今後の解析において軸索ガイダンスと核ダイナミズムの融合という独創的な展開が期待できる。さらに、CRAG を用いたモデルマウスでの遺伝子治療の成功は、今後、アルツハイマー病、パーキンソン病などの社会的に重要性の高い疾患治療への応用が期待できる。

## 2. 研究の目的

申請者はセマホリンのシグナル伝達に関与する CRMP がジヒドロピリミジナーゼと高い相同性を持つユニークなシグナル伝達分子であることに着目して解析を始めた。その結果、新規 CRMP ファミリー分子 CRAM を同定し、さらに CRAM に結合する新しい分子を複数同定してセマホリンを介するシグナル伝達機構の一端を明らかにした。特に新規 GTPase, CRAG は活性酸素種により活性化して核内にシグナルを伝えることを示唆した。このことより、セマホリンを介するシグナル伝達機構がレドックス反応を中心としたストレス応答である可能性を強く示した。とりわけ、CRAG による核内転写制御機構は神経回路形成における新しい制御機構が発見できることが期待できる。またモデルマウスの実験から CRAG は神経変性疾患のひとつであるポリグルタミン病の遺伝子治療に応用できる可能性が示されている。さらに、ミトコンドリアの機能を制御する M-septin および MITOL

の発見は新しい分野の開拓が期待できる。このように神経回路形成の研究をもとに疾患治療やミトコンドリア生物学に新しい視点を提供するものである。

## 3. 研究の方法

CRAM と CRAG の機能解析により神経回路形成におけるレドックスシグナリングを明らかにし、M-septin の機能解析によりミトコンドリアダイナミクスの解明を目指す。具体的には下記の4つのプロジェクトに重点をおいた。

- (1) セマホリンシグナル伝達機構における CRAM および Fes/Fps の役割
    - ・CRAM および Fes/Fps による微小管動態の調節機構を明らかにする。
  - (2) CRAG による核内シグナル伝達機構と神経回路形成における役割
    - ・CRAG による転写抑制機構についてジーンチップ解析を行う
    - ・神経回路形成における役割については、CRAG 欠損マウスを作製する。
  - (3) CRAG による神経変性疾患の遺伝子治療開発
    - ・病態モデルマウスを用いて様々な角度から解析する
  - (4) M-Septin によるミトコンドリアのユビキチン化とその生理的意義
- また Filopodia 形成における必須の役割が示唆されているので、分子メカニズムを明らかにする。

## 4. 研究成果

(CRAM プロジェクト)

CRAM によるセマホリンシグナルの抑制機構を解析した。紫外線照射などによる ROS の発生に反応して、CRAM 自身が酸化され、ユビキチン化されていることを見いだした。CRAM が ROS のスクベンジャーとして機能して微小管を保護していることが示され、神経突起形成のメカニズムに関与していることが示唆された。CRAM のリン酸化による機能調節機構については今後進めたい。

(CRAG プロジェクト)

CRAG によるレドックスシグナルについて核内転写制御機構を解析した結果、CRAG により活性化される 2 種類の転写因子が同定された。今後、この転写因子によって発現調節される遺伝子群が明らかになることが期待できる。また、活性酸素によりダイレクトに CRAG が酸化され、核移行することが明らかとなった。さらに、酸化されるシステイン残基が同定された。今後、CRAG のリン酸化による調節機構についても興味深い。CRAG による PML body のユビキチン化を誘導するユビキチンリガーゼについて、RBCK1 と Parkin との関連性について解析した結果、CRAG は RBCK1、Parkin 結合して PML body に移行することが明らかとなった。

(M-septin プロジェクト)

培養細胞に紫外線を照射して、ミトコンドリアの機能低下とミトコンドリアセプチンのミトコンドリア移行との相関性を調べた結果、ミトコンドリアセプチンは破壊され、ユビキチン化したミトコンドリアに特異的に集積していることが示された。さらに、ミトコンドリアセプチンが傷害ミトコンドリアの compartment (仕切り) に関与していることが示唆された。M-septin の結合分子を酵母のツーハイブリッド法を用いて検索した。その結果、興味深いタンパク質がいくつか同定された。今後、それらの会合の生理的意義について解析したい。

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 1 件)

- (1) Yonashiro, R., Sugiura, A., Miyachi, M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R., Ogata, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., and Yanagi, S.

Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced ROS generation. *Mol. Biol. Cell* 20(21), 4524-4530 (2009)

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 杉田智子、福田敏史、稲留涼子、柳 茂：新規 DISC1 結合蛋白質 CAMDI による大脳皮質神経細胞移動の制御機構の解析 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009, 12/10, 横浜
- (2) 福田敏史、杉田智子、稲留涼子、柳 茂：新規 DISC1 結合蛋白質 CAMDI による中心体成熟と神経細胞移動の制御 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009, 12/10, 横浜
- (3) 窪田有花、長島 駿、楊 立偉、柳澤香菜、井上晴満、角 千春、稲留涼子、福田敏史、柳 茂：新規 GTPase タンパク CRAG による公算機構の解明 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009, 12/9, 横浜
- (4) Yanagi, S., Kozaki, T., Kaneko, G., Sugiura, A., and Inatome, R. Ubiquitination and oxidation of damaged mitochondria by mitochondrial-septin The 7th Annual Conference of the Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, 2008, 12/21, Kagoshima, Japan
- (5) 長島 駿、窪田有花、寅嶋 崇、平井宏和、稲留涼子、福田敏史、柳 茂：CRAG によるポリグルタミン病原因タンパクの分解機構 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 2008, 12/11, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲留 涼子 (INATOME RYOKO)  
東京薬科大学・生命科学部・研究員  
研究者番号：90408691

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：