

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06580

研究課題名（和文）神経突起伸長因子LOTUSの受容体同定と分子メカニズム解析

研究課題名（英文）Analysis of the molecular mechanism underlying a promoting effect of LOTUS on neurite outgrowth

研究代表者

栗原 裕司（KURIHARA, Yuji）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：00634552

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：LOTUSが神経突起伸長作用を有し、この作用が未同定のLOTUS結合分子によって媒介されることを発見した。新たなLOTUS結合分子のスクリーニングにより、神経突起伸長に関わる様々な膜タンパク質を同定した。これらの膜タンパク質のノックダウン実験を実施した結果、とある細胞間接着因子のノックダウンがLOTUSによる突起伸長作用を抑制することを見出した。さらに、当該細胞間接着因子とLOTUSとの結合を阻害すると、LOTUSによる神経突起伸長作用が抑制されることも判明した。以上の研究成果により、LOTUSは当該細胞間接着因子との相互作用を介して神経突起を伸長させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、LOTUSが結合する新たな分子として細胞間接着因子を同定し、この細胞間接着因子との結合によってLOTUSは神経突起を伸長させることが明らかとなった。この成果は、神経突起伸長に関わる分子メカニズムを新たに解明しただけでなく、既に報告されているLOTUSの神経再生促進効果に関する新規の分子メカニズムを提唱するものだと考えられる。このことは神経再生を必要とする社会的ニーズに応える重要な知見となり得る。

研究成果の概要（英文）：In this study, I analyzed the molecular mechanism by which LOTUS promotes neurite outgrowth. I found that LOTUS has a promoting effect on neurite outgrowth and the promoting effect is mediated by unidentified LOTUS-binding protein(s). By screening new LOTUS-binding protein(s), I identified some transmembrane proteins which are associated with neurite outgrowth. In gene knockdown experiment of these proteins, I found that the promoting effect of LOTUS on neurites is suppressed in the cells reducing the expression of a certain cell adhesion molecule. Furthermore, inhibition of an interaction between LOTUS and the cell adhesion molecule attenuated the promoting effect of LOTUS on neurite outgrowth. These data suggest LOTUS promotes neurite outgrowth through its interaction with the cell adhesion molecule.

研究分野：神経薬理学

キーワード：神経科学 薬理学 突起伸長 神経再生

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳や脊髄の外傷性損傷あるいは神経変性疾患などによる神経機能喪失に対する機能再建は今日極めて重要な課題である。神経機能再建を目指した再生医学研究の一つに、中枢神経系に存在する神経突起伸長を阻害する因子(神経再生阻害因子)の機能抑制を目指した研究がある。神経再生阻害因子の代表格として、Nogo、Myelin-associated glycoprotein (MAG)、Oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp)、B lymphocyte stimulator (BLyS) および Chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) の5種が挙げられる。これら5種の因子は、共通の受容体である Nogo receptor-1 (NgR1) に結合することによって、神経細胞の突起伸長を阻害することが知られている。このことから、NgR1 は損傷や障害を受けた中枢神経系の再生を妨害する主要因の一つであると考えられている。

研究代表者は、新規分子 Lateral olfactory tract usher substance (LOTUS) を発見し、LOTUS は NgR1 に結合し、5種全ての NgR1 リガンド分子(神経再生阻害因子)の作用を抑制することを明らかにした。また、研究代表者は、LOTUS の C 末側の2領域(UA/EC)が NgR1 に対する結合領域かつ拮抗作用領域であることを明らかにした。しかしながら、NgR1 拮抗作用以外の LOTUS の機能は全くの未知である。

2. 研究の目的

研究代表者は、精製 LOTUS 基質上にマウス網膜神経節細胞を培養したところ、神経突起の伸長が促進されることを発見し、この作用は NgR1 以外の未同定の LOTUS 結合分子によって媒介されることも見出した。本研究は、LOTUS の神経突起伸長作用を媒介する神経細胞側に発現する相互作用分子を探索・同定し、その同定分子を介した LOTUS の神経突起伸長作用の分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

LOTUS による神経突起伸長作用に関わる LOTUS 相互作用分子を探索・同定し、その相互作用分子を介した LOTUS の分子メカニズムを解明するために、以下の実験を実施した。

(1) LOTUS と相互作用する分子の同定；

研究代表者は、レチノイン酸処理したマウス神経芽細胞腫由来の細胞株 Neuro2A に対して、精製 LOTUS タンパク質が結合すること、および精製 LOTUS 基質上で神経突起が伸長することを明らかにした。このことは LOTUS による神経突起伸長作用を媒介する LOTUS 相互作用分子が Neuro2A 細胞にも発現している可能性を示唆する。そこで、Neuro2A 細胞を用いて LOTUS による神経突起伸長作用に関わる LOTUS 相互作用分子のスクリーニングを実施した。Neuro2A 細胞に streptavidin-binding protein (SBP) タグ融合の LOTUS (SBP-LOTUS) を強制発現させ、細胞を可溶化した。ストレプトアビジン樹脂を用いて、細胞可溶化液から LOTUS と相互作用する分子を精製し、この精製産物を SDS-PAGE により分離し、SYPRO Ruby 染色を行った。検出されたバンドを各々切出すことによって得られたゲル片からの抽出物を液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置で解析した。この解析結果が示した LOTUS と相互作用する候補分子の中から膜タンパク質を選別し、pull-down 実験により LOTUS 相互作用分子を同定した。

(2) LOTUS による神経突起伸長作用を媒介する相互作用分子の同定；

(1)で同定した LOTUS 相互作用分子が Neuro2A 細胞およびマウス網膜神経節細胞に発現しているか否か、および LOTUS による神経突起伸長作用を媒介するか否かについて検討した。Neuro2A 細胞に対して当該 LOTUS 相互作用分子を RNAi 法によりノックダウンさせ、当該 LOTUS 相互作用分子の発現を解析するとともに、使用した siRNA のノックダウン効果を解析した。さらに、精製 LOTUS 基質上に培養した Neuro2A 細胞に対して、当該 LOTUS 相互作用分子を RNAi 法によりノックダウンさせ、Neuro2A 細胞の突起を観察した。また一方で、マウス網膜神経節細胞における当該 LOTUS 相互作用分子の発現を RT-PCR 法で解析した。さらに、当該 LOTUS 相互作用分子の精製タンパク質と精製 LOTUS タンパク質を予め反応させた溶液をコートした培養皿にマウス網膜神経節細胞を培養して、その神経突起を観察した。

4. 研究成果

(1) LOTUS と相互作用する分子の同定；

SBP-LOTUS を強制発現させた Neuro2A の細胞可溶化液からの LOTUS 相互作用分子の精製産物を液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置で解析した結果、LOTUS と相互作用する候補分子として種々の細胞間接着分子、トランスポーター、タンパク分解酵素、上皮成長因子ファミリータンパク質および免疫系に関連するタンパク質などが示された。これらの候補分子から膜タンパク質を選別し、SBP-LOTUS および HA タグ融合の細胞間接着因子の両者を強制発現させた COS7 細胞に対するストレプトアビジン樹脂を用いた沈降産物中に HA タグ融合の細胞間接着因子が検

出された。これらの結果から、LOTUS はこの細胞間接着因子と相互作用することが明らかとなった。

(2) LOTUS による神経突起伸長作用を媒介する相互作用分子の同定；

Neuro2A 細胞における当該細胞間接着因子の発現を解析したところ、当該細胞間接着因子の mRNA が発現していることが明らかとなった。また、Neuro2A 細胞に対して当該細胞間接着因子の siRNA をトランスフェクションしたところ、当該細胞間接着因子の発現量が減少したことから、使用した当該細胞間接着因子の siRNA がノックダウン効果を発揮することが示された。さらに、精製 LOTUS 基質上に培養した Neuro2A 細胞に対して、当該細胞間接着因子の siRNA をトランスフェクションして、Neuro2A 細胞の突起を観察した。コントロールの siRNA トランスフェクション細胞と比較して、当該細胞間接着因子の siRNA トランスフェクション細胞の突起の長さが短いことが示された。また一方で、マウス網膜神経節細胞における当該細胞間接着因子の発現を解析したところ、当該細胞間接着因子の mRNA が発現していることが明らかとなった。さらに、当該細胞間接着因子の精製タンパク質と精製 LOTUS タンパク質を予め反応させた溶液をコートした培養皿にマウス網膜神経節細胞を培養して、その神経突起を観察した。当該細胞間接着因子の精製タンパク質と反応させない精製 LOTUS タンパク質単独の溶液で観察される培養マウス網膜神経節細胞の突起長と比較して、当該細胞間接着因子の精製タンパク質と反応させた精製 LOTUS タンパク質溶液では培養マウス網膜神経節細胞の突起長が短いことが示された。これらの結果から、Neuro2A 細胞およびマウス網膜神経節細胞において当該細胞間接着因子が LOTUS による神経突起伸長作用を媒介することが明らかとなった。

以上(1)および(2)の研究成果により、LOTUS は細胞間接着因子との相互作用を介して神経突起を伸長させることが判明した。現在、本研究成果を纏めた論文を投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawaguchi Yuki, Matsubayashi Junpei, Kawakami Yutaka, Nishida Ryohei, Kurihara Yuji, Takei Kohtarō	4. 巻 28
2. 論文標題 LOTUS suppresses amyloid -induced dendritic spine elimination through the blockade of amyloid binding to PirB	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Medicine	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） 10.1186/s10020-022-00581-7	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------