

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22240040

研究課題名(和文) 成長円錐の新規分子マーカー群及び関連分子の機能・動態解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the molecular markers of the growth cone

研究代表者

五十嵐 道弘 (IGARASHI, MICHIRO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50193173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,300,000円、(間接経費) 11,490,000円

研究成果の概要(和文)：成長円錐のin vivo機能を解析するため、コンドロイチン硫酸(CS)の合成を抑制するCSGalNAcT1(T1) KOマウスを作製し、脊髄損小モデルを解析したところ、顕著な軸索再生が認められた。その理由は、単にCSが減少しただけでなく、成長円錐機能を促進するヘパラン硫酸(HS)が著明に増加していた。成長円錐のシグナル伝達活性化には、環境因子のCS/HSの量的最適化が必須であることが証明された。また成長円錐を決定する極性決定機構に、GPM6aが必須であることを分子機構とともに証明した。

研究成果の概要(英文)：We produced the CSGalNAcT1 (T1)-KO mice for analyzing the in vivo growth cone functions. By producing the spinal cord injury (SCI) model, we observed that in T1-KO, marked axon regrowth occurred. In these mice, not only chondroitin sulfate (CS), an inhibitor of the growth cone, was decreased, but also heparan sulfate (HS), one of its stimulators, also was up-regulated. We concluded that CS/HS balance is very important for the effective axon regeneration. We also obtained the evidence that GPM6a is involved in the determination of the neuronal polarity.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：成長円錐 神経細胞極性 コンドロイチン硫酸 ヘパラン硫酸 M6a シンタキシン

1. 研究開始当初の背景

成長円錐は発達期の神経細胞の突起先端に形成される運動性に富んだ構造で、正確な神経回路の決定に決定的に重要な役割を果たす。報告者は確立していた成長円錐の単離方法を駆使して、プロテオミクスを行って成長円錐の蛋白質を1,000種類近く同定し、成長円錐に濃縮され、かつRNAiで神経成長が抑制される分子群を17種類同定した。

2. 研究の目的

この成果を踏まえ、神経成長に関する分子群の役割を明確にする目的で、1) KOマウスの作成、2) 系統的な成長円錐内での挙動可視化、3) それらの新規結合分子を探索と、それらの神経成長への寄与証明、の3点から研究を推進することとした。

3. 研究の方法

成長円錐の培養におけるイメージング、in vivo実験系としての軸索再生実験、プロテオミクスおよびリン酸化プロテオミクスによって予想された分子間相互作用およびリン酸化抗体による解析、ノックアウトマウス作成の各技術を駆使して、下記の成果を得た。

4. 研究成果

1) 極性形成機能の解析: プロテオミクスで見出した機能未知の膜蛋白質 GPM6a に着目し、これに結合する低分子量G蛋白質のアダプター蛋白質 M6BP が結合し、さらにこの分子に rap2 が結合する。この結合複合体が極性形成に関与することを証明した。M6a 依存性の極性決定は、ラミニン依存性であり、第二期がほとんど生じず、迅速に極性が決定された極性が決まる際、第一期でも GPM6a はいち早くラミニン依存的に局在化し、極性決定因子 Par3 などよりもはるかに早期に局在化した。また GPM6a-RUFY3-rap2 は成長円錐の先端で共局在化していることを見出した。

2) 成長円錐の小胞動態: 成長円錐小胞の挙動をタイムラプスで明らかにした。その結果、最も頻度の高いものは、成長円錐の先端からアクチンの逆行性の流れに沿った移動であり、アクチン-ミオシンの相互作用によると考えられた。これらの小胞は、エンドゾームの性格を有すると判断された。

3) GAP-43 新規リン酸化と神経成長・再生との関連性: 成長円錐のリン酸化プロテオミクスを行って、GAP-43 のリン酸化部位の特異抗体を作成した。これは成長期の神経軸索をよく認識し、再生軸索を特異的に認識した。リン酸化不活性化マウス(GAP-43)を2種類作成に成功し、これらはリン酸化特異抗体で認識されず、不活性化されていることが確認できた。このうち、1種類のもの神経細胞を培養したところ、神経細胞の軸索長は優位に減少し、異常な出芽なども見られた。

4) 軸索成長・再生の in vivo モデル作成: CSGaINAcT1KO マウスの圧坐モデルに基づく脊髄損傷を作成した。この系では、きわめて効率的に損傷が修復され、組織解析でも優位に神経末端の回復が認められた。コンドロイ

チン硫酸(CS)とヘパラン硫酸(HS)の量的な最適化が起こっていることを証明した。

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29件)

1. Namba, T., Kibe, Y., Funahashi, Y., Nakamuta, S., Takano, T., Ueno, T., Shimada, A., Kozawa, S., Okamoto, M., Shimoda, Y., Oda, K., Wada, Y., Masuda, T., Sakakibara, A., Igarashi, M., Miyata, T., Faivre-Sarrailh, C., Takeuchi, K., *Kaibuchi, K. (2014) Pioneering axons regulate neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Neuron* 81: 814-829. 査読: 有

2. Nagaoka, T., Ohashi, R., Inutsuka, A., Sakai, S., Fujisawa, N., Yokoyama, M., Huang, YH., Igarashi, M., *Kishi, M. (2014) The Wnt/Planar Cell Polarity Pathway Component Vangl2 Induces Synapse Formation through Direct Control of N-Cadherin. *Cell Rep.* 6: 916-927. 査読: 有

3. Onouchi T, *Kobayashi K, Sakai K, Shimomura A, Smits R, Sumi-Ichinose C, Kurosumi M, Takao K, Nomura R, Iizuka-Kogo A, Suzuki H, Kondo K, Akiyama T, Miyakawa T, Fodde R, *Senda T. Targeted deletion of the C-terminus of the mouse adenomatous polyposis coli tumor suppressor results in neurologic phenotypes related to schizophrenia. *Molecular Brain* 2014, 7:21. 査読: 有

4. Shoji H, Takao K, Hattori S, *Miyakawa T. Contextual and cued fear conditioning test using a video analyzing system in mice. *Journal of Visualized Experiments* 2014;(85)e50871. 査読: 有

5. Koshimizu H, Takao K, Matozaki T, *Ohnishi H, *Miyakawa T. Comprehensive Behavioral Analysis of Cluster of Differentiation 47 Knockout Mice. *PLoS One* 9(2): e89584. (2014) 査読: 有

6. Kobayashi M, Nakatani T, Koda T, Matsumoto K, Ozaki R, Mochida N, Takao K, Miyakawa T, *Matsuoka I. Absence of BRINP1 in mice causes increase of hippocampal neurogenesis and behavioral alterations relevant to human psychiatric disorders. *Molecular Brain* 2014; 7: 12. 査読: 有

7. Takao K, Kobayashi K, Hagihara H, Ohira K, Shoji H, Hattori S, Koshimizu H, Umemori J, Toyama K, Nakamura H.K, Kuroiwa M, Maeda J, Atsuzawa K, Esaki K, Yamaguchi S, Furuya S, Takagi T, Walton N.M, Hayashi N, Suzuki H, Higuchi M, Usuda N, Suhara T, Nishi A, Matsumoto M, Ishii S, *Miyakawa T. Deficiency of schnurri-2, an MHC enhancer

binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 38(8):1409-25 (2014) 査読：有

8. Uemura, S., Nagaoka, T., Yokoyama, M., Igarashi, M., *Kishi, M. (2013) A simple and highly efficient method to identify the integration site of a transgene in the animal genome. *Neurosci. Res.* pii: S0168-0102(13)00267-8. 査読：有

9. Watanabe, Y., Katayama, N., Takeuchi, K., Togano, T., Itoh, R., Sato, M., Yamazaki, M., Abe, M., Sato, T., Oda, K., Yokoyama, M., Takao, K., Fukaya, M., Miyakawa, T., Watanabe, M., Sakimura, K., Manabe, T., *Igarashi, M. (2013) Point mutation in syntaxin-1A causes abnormal vesicle recycling, behaviors, and short term plasticity. *J. Biol. Chem.* 288: 34906-34919. 査読：有

10. Takeuchi, K., Yoshioka, N., Higa Onaga, S., Watanabe, Y., Miyata, S., Wada, Y., Kudo, C., Okada, M., Ohko, K., Oda, K., Sato, T., Yokoyama, M., Matsushita, N., Nakamura, M., Okano, H., Sakimura, K., Kawano, H., Kitagawa, H., *Igarashi, M. (2013) Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. *Nat. Commun.* 4:2740. 査読：有

11. Ando, K., Kudo, Y., Aoyagi, K., Ishikawa, R., Igarashi, M., *Takahashi, M. (2013) Calmodulin-dependent regulation of neurotransmitter release differs in subsets of neuronal cells. *Brain Res* 1535: 1-13. 査読：有

12. Yamashita N, Takahashi A, Takao K, Yamamoto T, Kolattukudy P, Miyakawa T, *Goshima Y. Mice lacking collapsin response mediator protein 1 manifest hyperactivity, impaired learning and memory, and impaired prepulse inhibition. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7:216 (2013) 査読：有

13. Paemka L, Mahajan V.B, Skeie J.M, Sowers L.P, Ehaideb S.N, Gonzalez-Alegre P, Sasaoka T, Tao H, Miyagi A, Ueno N, Takao K, Miyakawa T, Wu S, Darbro B.W, Ferguson P.J, Pieper A.A, Britt J.K, Wemmie J.A, Rudd D.S, Wassink T, El-Shanti H, Mefford H.C, Carvill G.L, Manak J.R, *Bassuk A.G. PRICKLE1 interaction with SYNAPSIN I reveals a role in autism spectrum disorders. *PLoS One*, 3;8(12): e80737 (2013) 査読：有

14. Ageta-Ishihara N, Yamakado H, Morita T, Hattori S, Takao K, Miyakawa T,

Takahashi R, *Kinoshita M. Chronic overload of SEPT4, a parkin substrate that aggregates in Parkinson's disease, causes behavioral alterations but not neurodegeneration in mice. *Molecular Brain*, 6:35 (2013) 査読：有

15. Hagihara H, Takao K, Walton N, Matsumoto M, *Miyakawa T. Immature dentate gyrus: an endophenotype of neuropsychiatric disorders. *Neural Plasticity*(2013) :318596 査読：有

16. Umemori J, Takao K, Koshimizu H, Hattori S, Furuse T, Wakana S, *Miyakawa T. ENU-mutagenesis mice with a non-synonymous mutation in Grin1 exhibit abnormal anxiety-like behaviors, impaired fear memory, and decreased acoustic startle response. *BMC Research Notes*, 6(1):203 (2013) 査読：有

17. Ohira K, Kobayashi K, Toyama K, Nakamura H.K, Shoji H, Takao K, Takeuchi R, Yamaguchi S, Kataoka M, Otsuka S, Takahashi M, *Miyakawa T. Synaptosomal-associated protein 25 mutation induces immaturity of the dentate granule cells of adult mice. *Molecular Brain*, 2013, 6:12 査読：有

18. Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, Kataoka Y, Azuma M, Hayasaka K, Amamoto M, Tominaga K, Wynshaw-Boris A, Wanibuchi H, Oka Y, Sato M, Kato M, *Hirotsumea S. Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Scientific Reports*, 3:1224 (2013) 査読：有

19. Lee H.U, Yamazaki Y, *Tanaka K.F, Furuya K, Sokabe M, Hida H, Takao K, Miyakawa T, Fujii S, *Ikenaka K. Increased astrocytic ATP release results in enhanced excitability of the hippocampus. *Glia*, 22427 (2013) 査読：有

20. Suzuki K, Zhou J, Sato T, Takao K, Miyakawa T, Oyake M, Yamada M, Takahashi H, Takahashi Y, Goto J, *Tsuji S. DRPLA transgenic mouse substrains carrying single copy of full-length mutant human DRPLA gene with variable sizes of expanded CAG repeats exhibit CAG repeat length- and age-dependent changes in behavioral abnormalities and gene expression profiles. *Neurobiology of Disease*, 46(2):336-350 (2012) 査読：有

21. Komine Y, Takao K, Miyakawa T, *Yamamori T. Behavioral abnormalities observed in Zfhx2-deficient mice. *PLoS ONE*, 7(12)e53114 (2012) 査読：有

22. Nagura H, Ishikawa Y, Kobayashi K, Takao K, Tanaka T, Nishikawa K, Tamura H,

Shiosaka S, Suzuki H, Miyakawa T, Fujiyoshi Y, *Doi T. Impaired synaptic clustering of postsynaptic density proteins and altered signal transmission in hippocampal neurons, and disrupted learning behavior in PDZ1 and PDZ2 ligand binding-deficient PSD-95 knockin mice. *Molecular Brain*, 5:43 (2012) 査読：有

23. Hattori S, Takao K, Tanda K, Toyama K, Shintani N, Baba A, Hashimoto H, *Miyakawa T. Comprehensive behavioral analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) knockout mice. *Frontier of Behavioral Neuroscience*, 6:58 (2012), 査読：有

24. Oyamatsu, H., Koga, D., *Igarashi, M., *Shibata, M., *Ushiki, T. (2012) Morphological assessment of early axonal regeneration in end-to-side nerve coaptation models. *J. Plast. Surg. Hand. Surg.* 46: 299-307. 査読：有

25. *五十嵐 道弘 (2012) 成長円錐の蛋白質構成から見たその機能的分子基盤. *生化学* 84: 753-766 (日本生化学会依頼総説) 査読：有

26. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, Tsukita S: Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* 585(4):606-612 (2011). 査読：有

27. Lu J, Nozumi M, Takeuchi K, Abe H, *Igarashi M: Expression and function of neuronal growth-associated proteins (nGAPs) in PC12 cells. *Neurosci Res.* 70(1):85-90 (2011). 査読：有

28. Watanabe Y, Takeuchi K, Higa Onaga S, Sato M, Tsujita M, Abe M, Natsume R, Li M, Furuichi T, Saeki M, Izumikawa T, Hasegawa A, Yokoyama M, Ikegawa S, Sakimura K, Amizuka N, Kitagawa H, *Igarashi M: Chondroitin sulfate N-Acetylgalactosaminyltransferase-1 is required for normal cartilage development. *Biochem J* 427: 47-55 (2010). 査読：有

29. Kobayashi T, *Terajima K, Nozumi M, Igarashi M, Akazawa K: A stochastic model of neuronal growth cone guidance regulated by multiple sensors. *J Theor Biol* 266: 712-722 (2010). 査読：有

[学会発表](計 61 件)

1. 武内恒成、吉岡望、岡田正康、五十嵐道弘 : CSGalNAct1, an Enzyme Required for Chondroitin Sulfate Synthesis, is Critical to Recovery from Neural Injury. *Neuroscience2013*, 2013.11.10、San Diego Convention Center

2. 武内恒成、五十嵐道弘 : Abnormal brain

development/maturation in mice lacking in chondroitin sulfate-synthesizing enzymes. *ECMNET(European cooperation in science and technology)*.2013.9.11、Hotel Remes (ポーランド)

3. 吉岡望、武内恒成、五十嵐道弘 : Brain development/ maturation in mice lacking in chondroitin sulfate synthesizing enzymes. 25th 国際神経化学学会(ISN)/米国神経化学学会(ASN)サテライトミーティング(ISN2013 Glial Satellite)、2013.4.19 Hotel El Castellano(メキシコ)

4. 武内恒成、吉岡望、比嘉進、川野仁、五十嵐道弘 : グリコサミノグリカン発現制御による神経再生・発生。第 118 回日本解剖学会総会(招待講演) 2013.3.28~3.30、香川国際会議場

5. 五十嵐道弘 : Proteomic Analysis Revolves the Growth Cone Resear 日本脳科学情報交換セミナー(招待講演) 2012.10.10~10.12、New Orleans Hilton(米国)

6. 五十嵐道弘 : 神経成長・再生を調整する分子群の役割。神経科学・構造生物学融合研究会(招待講演) 2012.10.4~10.5、大阪大学蛋白質研究所)

7. 五十嵐道弘 : リン酸化プロテオミクスの威力とそれに基づく新しい世界観。包括脳夏のワークショップ(招待講演) 2012.7.21~7.25、仙台国際会議場

8. 五十嵐道弘 : プロテオグリカン合成系の調節と神経損傷の修復機構。第 19 回プロテオグリカンフォーラム(招待講演)、2012.2.11、東京医科歯科大学(東京)

9. 五十嵐道弘 : 網羅的アプローチによる新しい神経科学の世界観。第 1 回群馬シナプトインフォマティクス研究会(招待講演)、2012.2.3、群馬大学刀城会館(群馬)

10. 武内恒成、比嘉進、工藤千佳、渡邊裕美、五十嵐道弘 : Mice lacking in an enzyme involved in chondroitin sulfate synthesis shows better recovery from spinal cord injury. Annual Meeting of Society for Neuroscience,2011.11.14、ワシントン D.C. コンベンションセンター(アメリカ合衆国)

11. 五十嵐道弘 : 神経科学でプロテオミクスをどう使うか-成長円錐研究の実例-。第 33 回神経組織の培養研究会(招待講演)、2011.10.28、東京医科大学(東京)

12. Michihiro Igarashi, Kosei Takeuchi : Lacking in an enzyme synthesizing chondroitin sulfate CSGal NAct1 improves axon regeneration. CSHL Asia meeting "Assembly,Plasticity,Dysf unction and Repair of Neural Circuits", 2011.10.18、CSHL Asia Conference Center(中国・蘇州)

13. 五十嵐道弘 : Searching for functional molecules in growth cones. 第 54 回日本神経化学学会大会(招待講演) 2011.9.27 瑠璃光(石川)

14. Kosei Takeuchi, Susumu Higa, Hitoshi Kawano, Michihiro Igarashi: Brain development abnormality and axon regeneration in the mice lacking in the enzymes synthesizing chondroitin sulfate. 8th international meeting, 2011.7.16、フィレンツェ

15. Nozumi M, Kato K, Igarashi M.: Neuronal growth-associated protein (nGAPs) regulate growth cone morphology. IBRO 8th international meeting, 2011.7.16、フィレンツェ

16. 武内恒成、本多敦子、峯田克彦、五十嵐道弘: テトラスパニン Ma6 関連タンパク質による単一神経突起伸長の制御メカニズム。第63回日本細胞生物学会大会(招待講演) 2011.6.27~29、北海道大学

17. Igarashi M, Nozumi M: Proteomics Reveals Novel Sets of Proteins Involved in Axonal Growth. EMBO meeting Cell Biology of the Neuron, 2011.5.7、フォデーレビーチホテル(ギリシア・イラクリオン)

18. Nozumi M et al. (4人中4番目): Newly identified neuronal growth-associated proteins (nGAPs) using proteomics. American Society for Cell Biology, 2010.12.14、フィラデルフィア

19. Higa S. et al. (4人中4番目): Brain development abnormality in the mice lacking in the enzymes synthesizing chondroitin sulfate. SFN2010(米国神経科学会) 2010.11.13~17、サンディエゴ

20. Igarashi M: How to use the proteomic results for the growth cone research. Cold Spring Harbor Symposium, 2010.9.21~25、コールドスプリングハーバー(アメリカ合衆国)

21. Takeuchi K. et al. (4人中4番目): Functional analyses of mice lacking an enzyme for chondroitin sulfate synthesis. 7th Forum of European Neurosciences, 2010.7.3~7、アムステルダム

22. Watanabe Y, Igarashi M: Syntaxin-1A(R151G) knock-in mice that cannot be associated with CaMK show the impaired vesicle recycling after stimulation. Synapse Symposium 2010(FENS Satellite symposium), 2010.7.1~3、アムステルダム

23. Igarashi M.: The novel neuronal growth-associated proteins revealed by the proteomic analysis of the growth cone. 1st NeuroTalk Symposium. 2010.6.25、シンガポール共和国

24. Jia L et al. (4人中4番目): Proteomic analysis of the growth cone reveals the novel molecular markers nGAPs. Cold Spring Harbor Asia Conference, 2010.4.12~17、蘇州(中国)

[産業財産権]

出願状況(計1件)
名称: 抗 Gap43 抗体
発明者: Michihiro Igarashi, Kosei TAKEUCHI, Motohiro NOZUMI, Asami KAWASAKI
権利者: 国立大学法人新潟大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2012/077163
出願年月日: 2013年4月25日
国内外の別: 国内

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2>

6. 研究組織

- (1) 研究者代表 五十嵐 道弘
(Igarashi Michihiro)
(新潟大学・医歯学系・教授)
研究者番号: 50193173
- (2) 研究分担者 高雄 啓三
(Takao Keizou) (24 - 25年度)
(生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・特任准教授)
研究者番号: 80420397