

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590097

研究課題名（和文） 脳の発達における PDZ 分子 MAGI-1 の性状機能解析

研究課題名（英文） Biochemical and histological characterization of MAGI-1 in neuronal tissues.

研究代表者

森下 理香 (MORISHITA RIKA)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経制御学部・研究助手

研究者番号：30393135

研究成果の概要（和文）：MAGI-1 を選択的に認識する抗体を作製し、生化学的および組織化学的解析を行い、脳神経組織における発現分布を明らかにした。また、神経突起伸長モデルとして PC12 細胞を用いた解析を行った。その結果、MAGI-1 は p75NGF 受容体 (p75NTR) およびアダプター分子 Shc と結合し、Shc-ERK 経路の活性化を制御することにより、PC12 細胞における NGF 依存的な突起伸長を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Using the antibody that selectively recognize MAGI-1, we performed biochemical and histological characterization of MAGI-1 in neuronal tissues. We also found that MAGI-1 interacts with p75 NGF receptor (p75NTR) and Shc phosphotyrosine binding protein, and regulates the NGF dependent neurite outgrowth of PC12 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	700,000	300,000	1,000,000
2012 年度	1,300,000	300,000	1,600,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経化学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：脳、神経細胞、アダプター分子、神経栄養因子

## 1. 研究開始当初の背景

Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質は、Rho キナーゼや mDia などのエフェクターを介して細胞骨格を制御していることがよく知られている。私共は、Rho とそのエフェクターである Rhotekin によって、セプチンのフィラメント構造が制御されていることを報告していたが、Rhotekin の生理機能に関しては未解明の部分が多かった。そこで、私共は、酵母 two-hybrid 法による Rhotekin 結合タンパク質の探索を行った。その結果、PDZ ドメインを有する PIST および Lin-7 を結合

タンパク質として同定し性状機能解析を行った。Rhotekin 結合タンパク質のスクリーニングの過程で、膜結合性グアニル酸キナーゼ (membrane-associated guanylate kinase with inverted orientation; MAGI) ファミリー分子のひとつである MAGI-1 も陽性クローンとして同定していた。MAGI ファミリー分子は、MAGI-1、MAGI-2/S-SCAM、MAGI-3 の3種類の分子が存在する。これらのうち MAGI-2/S-SCAM は、神経組織特異的な MAGI ファミリー分子とされており、 $\beta$ -カテニンと結合すること、NMDA レセプターと結合するこ

と、NMDA レセプターを介した Rho の活性化に必須であることが示されるなど、神経系組織での機能解析が進んでいた。これに対し MAGI-1 に関しては、上皮細胞のタイトジャンクションに局在することから細胞間接着における機能解析が進められてきたが、神経系組織での機能については未解明の部分が多かった。MAGI-1 を特異的に認識する抗体を用いた生化学的解析により、予備的ではあったが、脳神経組織に MAGI-1 が豊富に存在することを私たちは見いだしていた。そこで、脳神経組織における MAGI-1 の性状機能解析を開始するに至った。

## 2. 研究の目的

### (1) 脳神経組織における MAGI-1 の生化学的、組織化学的性状解析

MAGI ファミリー分子はアミノ酸配列の相同性が高く、各分子種を選択的に認識する特異性の高い抗体が開発されていないため、生化学的、組織化学的な性状については未解明の部分が多い。そこで、MAGI-1 を選択的に認識する抗体を作製し、詳細な性状、機能を明らかにする。

### (2) 神経突起伸長における MAGI-1 の機能解析

初代培養後根神経節細胞における MAGI-1 の局在を蛍光抗体法により解析したところ、神経突起先端部分の成長円錐 (growth cone) で細胞骨格分子アクチンと共局在することがわかった。このことから MAGI-1 が神経突起伸長制御に関わっている可能性が考えられた。そこで神経突起伸長における MAGI-1 の機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 脳神経組織における MAGI-1 の生化学的、組織化学的性状解析

#### ①MAGI-1 を選択的に認識する抗体の作製

マルトース結合蛋白質 (MBP) タグのついた MAGI-1 (MBP-MAGI-1) を大腸菌に発現させ、大量培養後、抽出液からアミロースビーズを用いてリコンビナント蛋白質を精製した。これを抗原としてウサギを免疫し抗血清を得た。抗原結合ビーズを用いて抗血清より抗体のアフィニティー精製を行った。一方で、GST タグのついた MAGI-1 の 194 番目から 295 番目のアミノ酸配列を含むリコンビナント蛋白質 (GST-MAGI-1N) を大腸菌から精製し、セファロースビーズに結合した。このセファロースビーズを用いて、前述の抗血清から抗体をアフィニティー精製した。

#### ②ラット組織における MAGI-1 の生化学的性状解析

成獣ラットから組織を取り出し、組織抽出液を作製した。MAGI-1 の発現分布を、特異抗体を用いたウェスタンブロット法により解析

した。また、脳を 12 ヶ所に部位分けし、MAGI-1 の発現を同様に解析した。さらに、遠心分離により大脳分画を行い、MAGI-1 の発現をウェスタンブロット法により解析した。

#### ③ラット神経組織における MAGI-1 の免疫組織化学的解析

成獣ラット脳組織切片および胎仔ラット脊髄組織切片を、抗 MAGI-1 抗体により染色し、MAGI-1 の局在を形態学的に解析した。また、胎生 18.5 日ラットより海馬神経細胞を分離培養し、培養 21 日後に固定し蛍光抗体法により MAGI-1 の局在を解析した。胎生 16.5 日ラットから後根神経節細胞を分離培養し、培養 2 日後に固定し蛍光抗体法により MAGI-1 の局在を解析した。

### (2) 神経突起伸長における MAGI-1 の機能解析

#### ①PC12 細胞の NGF 依存的突起伸長における MAGI-1 の機能解析

GFP を同時に発現する MAGI-1 に対する発現抑制 (ノックダウン) ベクターを PC12 細胞に遺伝子導入し、48 時間培養後 NGF を添加した後に、さらに 48 時間培養した。細胞を固定した後に抗 GFP 抗体により染色し、共焦点レーザー顕微鏡により細胞の蛍光画像を取得した。そして、画像解析ソフトを用いて突起伸長が見られる細胞の割合を算出した。

#### ②MAGI-1 と p75NGF 受容体 (p75NTR) および Shc の結合解析

哺乳動物培養細胞に p75NTR あるいは Shc と MAGI-1 を一過性に共発現させ、免疫沈降法によりこれらの分子が複合体を形成するか検討した。次に、これらの分子の様々な部位を欠失した変異体を培養細胞に発現させ、免疫沈降法により分子内の結合部位を同定した。さらに、リコンビナント蛋白質を用いた試験管内結合実験により、p75NTR および Shc と MAGI-1 が直接結合しうるのか検討した。また、PC12 細胞における MAGI-1 と p75NTR の局在を蛍光抗体法により解析した。

#### ③NGF により活性化される細胞内情報伝達経路における MAGI-1 の機能解析

PC12 細胞に MAGI-1 ノックダウンベクターおよび GFP-Shc あるいは GFP-ERK を一過性に発現させ、NGF 刺激後の GFP-Shc および GFP-ERK のリン酸化をウェスタンブロット法により解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 脳神経組織における MAGI-1 の生化学的、組織化学的性状解析

#### ①MAGI-1 を選択的に認識する抗体の作製

全長 MAGI-1 を抗原として抗血清を得て、抗体のアフィニティー精製を行ったが、この抗体は、すべての MAGI ファミリー分子と反応することがわかった。MAGI-1 を選択的に認識

する抗体を得るため、MAGI-1 分子内の他の MAGI 分子と相同性の低い領域のリコンビナントタンパク質 (GST-MAGI-1N) を作製し、抗血清から抗体のアフィニティー精製を行ったところ、この抗体は、MAGI-1 を選択的に認識することが分かった。

#### ②ラット組織における MAGI-1 の生化学的性状解析

特異抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ、MAGI-1 は大脳皮質、海馬、小脳などの神経組織に多く発現していることが分かった。12カ所の脳部位 (小脳、嗅球、視床下部、中隔、線条体、海馬、新皮質、嗅内皮質、視床、脳幹、上丘、下丘) における MAGI-1 の発現を同様に解析したところ、脳幹を除くすべての脳部位で発現が見られたが、特に嗅球での発現が高いことが分かった。ラット大脳分画を行ったところ、MAGI-1 は、シナプス小胞画分の多く存在することが分かった。

#### ③ラット神経組織における MAGI-1 の免疫組織化学的解析

成獣ラット脳切片を免疫染色し、MAGI-1 の局在を形態学的に解析したところ、小脳のプルキンエ細胞、海馬の錐体細胞、嗅球の糸球体層に比較的多く分布することが分かった。また、ラット胎仔脊髄切片の染色から、MAGI-1 は脊髄後根進入部に強く発現していることが分かった。さらに、初代培養ラット後根神経節細胞における局在を蛍光抗体法により検討したところ、MAGI-1 は、細胞体、神経突起に存在し、神経突起先端部の成長円錐では、部分的ではあるが細胞骨格分子アクチンと共局在していることが分かった。初代培養海馬神経細胞では、神経突起上で部分的ではあったが、MAGI-1 の局在は、シナプスマーカーであるシナプトフィシンと一致していた。

### (2) 神経突起伸長における MAGI-1 の機能解析

#### ①PC12 細胞の NGF 依存的突起伸長における MAGI-1 の機能解析

MAGI-1 が嗅球の糸球体層に局在すること、初代培養ラット脊髄後根神経節細胞の神経突起先端部の成長円錐に局在することなどから、MAGI-1 は神経突起伸長に何らかの機能を果たしていると考えられた。そこで、PC12 細胞を突起伸長モデルとして解析した。

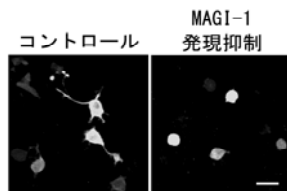


図 1. MAGI-1 の発現抑制による PC12 細胞の突起伸長阻害

その結果、MAGI-1 を発現抑制 (ノックダウン)

した PC12 細胞では、NGF 依存的な突起伸長が抑制されていることがわかった (図 1)。

#### ②MAGI-1 と p75NGF 受容体 (p75NTR) および Shc の結合解析

MAGI-1 による突起伸長制御の分子機構を明らかにするため、NGF により活性化される細胞内情報伝達分子と MAGI-1 の結合について検討した。まず、NGF 受容体である TrkA および p75NTR のアミノ酸配列を調べたところ、p75NTR の C 末端のアミノ酸配列が PDZ 結合配列と一致することを見いだした。実際に結合するか検討するため、哺乳動物培養細胞に MAGI-1 および p75NTR を一過性に発現させ、MAGI-1 に対する抗体により免疫沈降を行ったところ、これらの分子の複合体形成が見られた。次に、MAGI-1 および p75NTR の変異体を培養細胞に発現させ、免疫沈降法により結合部位を解析したところ、MAGI-1 の N 末端側から 1 番目の PDZ ドメインを含む部分と p75NTR の C 末端側が相互作用していることがわかった。リコンビナント蛋白質を用いた試験管内結合実験により、MAGI-1 と p75NTR は直接結合することを明らかにした。また、PC12 細胞の抽出液を用いて免疫沈降を行い、内在性の MAGI-1 と p75NTR の複合体形成を明らかにした。蛍光抗体法により PC12 細胞における MAGI-1 および p75NTR の局在を解析し、細胞辺縁部において両分子は共局在していることがわかった (図 2)。

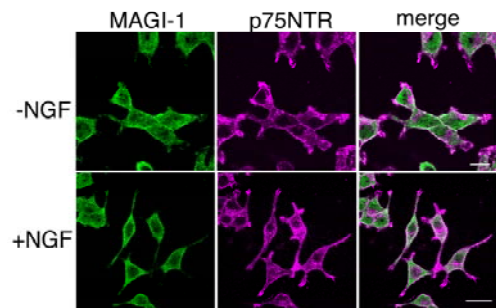


図 2. PC12 細胞における MAGI-1 および p75NTR の局在

一方、NGF 受容体の直下では Shc というアダプター分子が情報伝達を制御していることが知られている。Shc の分子内にはグリシン/プロリンリッチモチーフが存在することから、この部位が MAGI-1 の WW ドメインと相互作用する可能性が考えられた。そこで、p75NTR との結合と同様に Shc と MAGI-1 の結合を解析したところ、両分子は直接結合することが明らかとなった。

#### ③NGF により活性化される細胞内情報伝達経路における MAGI-1 の機能解析

NGF は受容体と結合し、Shc の活性化 (リン酸化) から Ras-Raf-ERK という一連の細胞内情報伝達経路の活性化を引き起こし、突起伸

長を誘導することが知られている。そこで、NGFにより活性化される細胞内情報伝達経路におけるMAGI-1の機能について解析した。PC12細胞の、NGFによるShcのリン酸化におけるMAGI-1の機能を明らかにするため、ノックダウン実験を行った。その結果、MAGI-1をノックダウンした細胞ではShcのリン酸化が抑制されていることを見いだした。また、ERKの活性化(リン酸化)もMAGI-1をノックダウンした細胞では抑制されていることがわかった。

これらの結果から、MAGI-1はp75NTR、Shcと結合し、NGFによるShc-ERK経路の活性化を調節することにより、突起伸長を制御すると考えられた。

#### 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)

- ①Yamauchi M, Sudo K, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Murai T, Kajita K, Ishizuka T, Nagata K. (2013) Localization of multidomain adaptor proteins, p140Cap and vinexin, in the pancreatic islet of a spontaneous diabetes mellitus model, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Med Mol Morphol.* 46:41-48. doi:10.1007/s00795-013-008-1. (査読有)
- ②Mizutani Y, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Kanoh H, Seishima M, Nagata KI. (2013) Possible role of a septin, SEPT1, in spreading in squamous cell carcinoma DJM-1 cells. *Biol Chem.* 394:281-290. doi:10.1515/hsz-2012-0258. (査読有)
- ③Ito H, Morishita R, Sudo K, Nishimura YV, Inaguma Y, Iwamoto I, Nagata KI. (2012) Biochemical and morphological characterization of MAGI-1 in neuronal tissue. *J Neurosci Res.* 90:1776-1781. doi:10.1002/jnr.23074. (査読有)
- ④Murase K, Ito H, Kanoh H, Sudo K, Iwamoto I, Morishita R, Soubeyran P, Seishima M, Nagata K. (2012) Cell biological characterization of a multidomain adaptor protein, ArgBP2, in epithelial NMuMG cells, and identification of a novel short isoform. *Med Mol Morphol.* 45:22-28. doi:10.1007/s00795-010-0537-9. (査読有)
- ⑤Kojima D, Mori S, Torii M, Wada A,

Morishita R, Fukada Y. (2011) UV-sensitive photoreceptor protein OPN5 in humans and mice. *PLoS One.* 6: e26388. doi:10.1371/journal.pone.0026388. (査読有)

- ⑥Ito H, Morishita R, Shinoda T, Iwamoto I, Sudo K, Okamoto K, Nagata KI. (2010) Dysbindin-1, WAVE2 and Abi-1 form a complex that regulates dendritic spine formation. *Mol Psychiatry* 15:976-986. doi:10.1038/mp.2010.69. (査読有)
  - ⑦Shinoda T, Ito H, Sudo K, Iwamoto I, Morishita R, Nagata KI. (2010) Septin 14 is involved in cortical neuronal migration via interaction with Septin 4. *Mol Biol Cell.* 21:1324-1334. doi:10.1091/mbc.E09-10-0869. (査読有)
- [学会発表] (計13件)
- ①永田浩一, 稲熊 裕, 西村嘉晃, 伊東秀記, 鈴木基正, 浜田奈々子, 水野 誠, 岩本郁子, 森下理香, 熊谷俊幸. SIL1, a causative gene of Marinesco-Sjogren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. 米国細胞生物学会(モスコーンセンター、サンフランシスコ、米国) 2012. 12. 17.
  - ②伊東秀記, 森下理香, 岩本郁子, 永田浩一. Dysbindin-1と結合する分子の探索と性状機能解析. 日本生化学会(福岡国際会議場、福岡) 2012. 12. 15.
  - ③伊東秀記, 森下理香, 岩本郁子, 永田浩一. MAGI-1 controls the NGF-activated signal pathway and regulates neurite extension. 日本神経化学会 神戸国際会議場、神戸) 2012. 9. 30.
  - ④伊東秀記, 森下理香, 岩本郁子, 永田浩一. 神経系組織におけるMAGI-1の性状機能解析. 日本臨床分子形態学会(高知市文化プラザかるぼーと、高知) 2012. 9. 29.
  - ⑤永田浩一, 水谷陽子, 伊東秀記, 岩本郁子, 森下理香, 加納宏行, 清島真理子. セプチン SEPT1は有棘細胞癌DJM-1細胞の接着に関与する. 日本臨床分子形態学会(高知市文化プラザかるぼーと、高知) 2012. 9. 28.
  - ⑥伊東秀記, 森下理香, 西村嘉晃, 篠田友靖, 岩本郁子, 永田浩一. Functional analysis of dysbindin, a schizophrenia risk factor, in dendritic spine formation. 米国細胞生物学会(コロラドコンベンションセンター、デンバー、米国) 2011. 12. 6.

- ⑦伊東秀記, 森下理香, 西村嘉晃, 篠田友靖, 岩本郁子, 須藤香織, 永田浩一. 神経突起伸長におけるMAGI-1の機能解析. 日本生化学会大会(京都国際会館、京都) 2011.9.23.
- ⑧村瀬香奈, 伊東秀記, 加納宏行, 須藤香織, 岩本郁子, 森下理香, 清島真理子, 永田浩一. 上皮細胞の極性形成・維持におけるアダプター蛋白質ArgBP2の役割. 日本臨床分子学会(大阪医科大学、大阪) 2011.9.9.
- ⑨伊東秀記, 森下理香, 篠田友靖, 岩本郁子, 須藤香織, 岡本賢一, 永田浩一. Dysbindin-1, a schizophrenia risk factor, regulates dendritic spine formation: Evidence supporting neurodevelopmental hypothesis. 米国細胞生物学会(ペンシルバニアコンベンションセンター、フィラデルフィア、米国) 2010.12.14.
- ⑩篠田友靖, 伊東秀記, 須藤香織, 岩本郁子, 森下理香, 貝淵弘三, 永田浩一. Molecular mechanism of Septin-mediated migration of cortical neurons. BMB2010(神戸国際会議場、神戸) 2010.12.8.
- ⑪伊東秀記, 森下理香, 篠田友靖, 須藤香織, 岩本郁子, 永田浩一. Biochemical and histological characterization of MAGI-1 in rat nervous tissues. BMB2010(神戸国際会議場) 2010.12.7.
- ⑫篠田友靖, 伊東秀記, 須藤香織, 岩本郁子, 森下理香, 永田浩一. Septinの脳皮質形成における機能およびその分子メカニズム. Neuro2010(神戸) 2010.9.3.
- ⑬伊東秀記, 森下理香, 篠田友靖, 須藤香織, 岩本郁子, 永田浩一. Dysbindin-1はWAVE2/Abi-1複合体形成を介して神経細胞の樹状突起形態を制御する. Neuro2010(神戸) 2010.9.2.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年月日:  
 国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所

<http://www.inst-hsc.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森下理香 (MORISHITA RIKA)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経制御学部・研究助手

研究者番号: 30393135

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし