

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24年 5月 14日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770192

研究課題名（和文）

神経突起形成とリモデリングにおけるセプチン細胞骨格の解析

研究課題名（英文）

The role of the septin cytoskeleton in neurite outgrowth and remodeling

研究代表者

上田 奈津実（石原奈津実）(AGETA-ISHIHARA NATSUMI)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：60547561

研究成果の概要（和文）：

哺乳類胎生期から生後発達期にかけての脳組織でみられる神経細胞の移動や突起伸展においては微小管およびアクチン細胞骨格系が中心的役割を果たす。これらの細胞現象には神経系に大量に発現するセプチン細胞骨格系の関与も示唆されているが、その詳細やメカニズムは不明である。そこで本研究では、マウス神経回路形成過程におけるセプチン機能を探索した。高密度分散培養した大脳皮質ニューロンから必須サブユニット SEPT7 を RNAi で欠乏させたところ、軸索と樹状突起の伸展が同程度（約 30%）阻害された。類似の所見は大脳皮質体性感覚野ニューロン軸索の対側への投射の阻害として *in vivo* で再現された。以上から、軸索・樹状突起に共通するセプチン要求性の伸展機構の存在が示唆された。微小管は軸索や樹状突起を構成する重要な細胞骨格分子であることから、SEPT7 欠乏ニューロンにおける微小管の状態を検討した。結果、SEPT7 欠乏ニューロンにアセチル化された alpha-チューブリンが過剰蓄積していることを見出した。本研究により、セプチンがチューブリンのアセチル化を制御して微小管再編成を保障するメカニズムを見出した（投稿中）。

研究成果の概要（英文）：

Neurite outgrowth is a vital process for neural network formation in which microtubules and actin filaments play major roles. Previous studies with nematode mutants and cultured mammalian neurons revealed that another class of nucleotide-binding protein polymers of septins is also required for neurite outgrowth, besides their implications in mammalian neuronal migration, spine morphogenesis, synaptic transmission, and neuropsychiatric disorders. However, due to the functional redundancy among septin family and their pleiotropic roles, the mechanism of action remains unclear. In this study, we focused on the role of septins in neurite elongation: We cultured neurons from mouse embryonic cerebral cortex and depleted the pivotal subunit SEPT7 by expressing shRNA. Quantitative morphometric analysis demonstrated that SEPT7 depletion inhibited the elongation of both axons and dendrites equally by ~30%. To test the physiological relevance of the SEPT7-depletion phenotype found *in vitro*. We found that the axon extension and branching was significantly diminished in SEPT7-depleted pyramidal neurons. Since microtubule is the common and critical architectural determinant of axon and dendrite, we examined the status of microtubule organization. Intriguingly, septin-depleted neurons contained significantly more acetylated alpha-tubulin, indicating hyperstabilization of microtubules. In this study, we found a novel molecular mechanism connecting septins and microtubule during neurite elongation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、細胞生物学

キーワード：細胞骨格・運動、神経細胞形態形成

1. 研究開始当初の背景

細胞骨格系は細胞分裂・細胞運動・形態形成・物質輸送などの生命現象を支える構造基盤である。細胞骨格系を構成する重合性蛋白質にはアクチン、チューブリン、中間径フィラメント、セプチンなどがある。進化的に保存された細胞骨格系自己集合性蛋白質の代表格はアクチンとチューブリンである。一方で、非コンベンショナルな自己集合性蛋白質に分類される細胞骨格系がセプチンである。2009年5月より申請者が助教として所属する木下研究室はセプチン系を中心に細胞骨格系の研究を行っている (Curr Opin Cell Biol 2006, 2008 など)。これまでに、マウスでは13種類の遺伝子由来するセプチンが多様な組み合わせでヘテロオリゴマーを形成すること、微小管、アクチンと相互作用して種々の細胞現象に関与することなどを示してきた。セプチンを最も大量に発現する組織は脳であり、神経やグリアでの機能が当該分野の焦点といえる。しかし、セプチン系の多機能性と機能重複のために、これまでに作製された遺伝子破壊マウスの多くは胎生初期に致死となるか軽微な異常しか示さず、神経系のセプチン細胞骨格の生理機能は不明である。

申請者は大脳皮質ニューロン初代培養系を用いた神経突起(軸索・樹状突起)形成の定量解析系を行う一方、*in vivo*でも胎生期大脳皮質ニューロンの対側皮質への投射を解析した (Ageta-Ishihara et al., J Neurosci 2009) (Takemoto-Kimura*, Ageta-Ishihara* (*equal contribution) et al., Neuron 2007)。

本研究ではこれらの経験を生かし、神経細胞形態の定量評価系を駆使して、神経細胞の突起形成過程におけるセプチンに着目し、アクチンや微小管との相互作用を探索する。

2. 研究の目的

本研究において、申請者はニューロンの形態計測系を駆使して神経細胞の分化過程における細胞骨格系(セプチン、アクチン、微

小管)の相互作用を探索することを目的とした。初代培養系 (*in vitro*) とマウス個体レベルの実験系 (*in vivo*) を相補的に組み合わせ以下のプロジェクトを遂行することにより、発生期における細胞骨格間の協調作用や制御機構を生理的なコンテキストで理解することを目指した。

プロジェクト:

発生過程の神経突起形成における3系統の細胞骨格系の相互作用の解析

- (1)-(2) 神経突起形成におけるセプチンの役割
- (3) 微小管・アクチン制御におけるセプチンの役割

3. 研究の方法

(1) 13種類のセプチン遺伝子のほとんどが発生過程の脳で発現するが、神経突起形成における各サブユニットの役割は不明である。そこでセプチン複合体の必須サブユニット SEPT7 に対して作製した shRNA+GFP 共発現ベクターを電気穿孔法にて導入し、マウス大脳皮質ニューロンの神経突起形成をセプチンが制御するか否かを評価する。

(2) (1)の実験を *in vivo* で再現・検証するため、申請者の先行論文と同様の方法で子宮内電気穿孔法を用いて16日胚の大脳皮質II-III層の錐体ニューロンのセプチンを欠乏させ、対側皮質への軸索投射を定量解析する。

(3) 微小管にはセプチンを含む多様な関連蛋白質群が会合し、構成蛋白質チューブリンもアセチル化やポリグルタミン酸化などの化学的修飾を受けている。微小管の修飾・制御におけるセプチンの役割を探索するため、セプチンを欠失・欠乏・過剰発現した場合の神経突起内微小管の状態を、関連蛋白質群や修飾微小管の抗体を用いて検討する。

4. 研究成果

(1)セプチン複合体の必須サブユニット SEPT7 に対して作製した shRNA+GFP 共発現ベクターをマウス大脳皮質ニューロンに導入し、マウス大脳皮質ニューロンの神経突起形成を評価した。結果、SEPT7 の欠乏によって、軸索ならびに樹状突起伸展が有意に阻害されることを見出した。

(2)(1)の実験を *in vivo* で再現した結果、セプチンを欠乏させたニューロンの対側皮質への軸索投射が有意に阻害されることを見出した。

(3)微小管の修飾・制御におけるセプチンの役割を探索した結果、SEPT7 欠乏ニューロンにアセチル化された alpha-チューブリンが過剰蓄積していることを見出した。本研究により、セプチンがチューブリンのアセチル化を制御して微小管再編成を保障するメカニズムを見出した。

以上の結果は現在論文投稿中である。

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)

- ①Takemoto-Kimura S, Suzuki K*, Kamiyo S*, Ageta-Ishihara N* (*equal contribution), Fujii H*, Okuno H, Bito H, Differential roles for CaM kinases in mediating excitation-morphogenesis coupling during formation and maturation of neuronal circuits, *European Journal of Neuroscience*, 査読有、32、2010、224-230

[学会発表] (計 18 件)

- ①Ageta-Ishihara N, Kinoshita M, Septin-dependent microtubule control during mammalian neurite outgrowth, The American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2011 年 12 月 14 日、Denver
- ②Ageta-Ishihara N, Kinoshita M, Septin-dependent microtubule regulation for developmental neurite outgrowth, 第 2 回神経科学と構造生物学の融合、シンポジウム、2011 年 11 月 22 日、岡崎
- ③Ageta-Ishihara N, Kinoshita M, Septin-dependent microtubule regulation required for axon and

dendrite elongation, The American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2011 年 11 月 13 日、Washington, DC

- ④Ageta-Ishihara N, Kinoshita M, Septin-mediated microtubule regulation during neurite extension, 第 54 回日本神経化学会大会、シンポジウム、2011 年 9 月 26 日、金沢
- ⑤Ageta-Ishihara N, Kinoshita M, Probing the septin-dependent microtubule regulations during neurite outgrowth, EMBO Workshop 「Function and structure of septins, filament-forming GTP-binding Proteins」、2011 年 3 月 7-8 日、St. Goar
- ⑥Ageta-Ishihara N, Tomonaga T, Yamazaki M, Abe M, Morita T, Kurita H, Itohara S, Watanabe M, Sakimura K, Kinoshita M, Dissection of the mammalian CDC42-septin pathway with a CDC42 effector protein, ASCB 50th Annual Meeting, 2010 年 12 月 11 日、Philadelphia
- ⑦Ageta-Ishihara N, Tomonaga T, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Morita T, Kurita H, Itohara S, Watanabe M, Sakimura K, Kinoshita M, Probing the physiological role of a novel CDC42 effector protein, BMB2010, 2010 年 12 月 8 日、神戸
- ⑧Ageta-Ishihara N, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Tomonaga T, Kurita H, Morita T, Hagiwara A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Kinoshita M, Functional analysis of the septin cytoskeleton and its regulator Cdc42ep4 in Purkinje cell and Bergmann glia, 第 29 回内藤コンファレンス「グリアワールドから見た脳」、2010 年 10 月 6 日、神奈川
- ⑨Ageta-Ishihara N, Hagiwara A, Kurita H, Morita T, Tomonaga T, Fukazawa Y, Shigemoto R, Kinoshita M, Exploring functions of the septin cytoskeleton in the formation and remodeling of neuroglial network, Neuro2010, 2010 年 9 月 2 日、神戸
- [図書] (計 1 件)
- ①上田(石原)奈津実、木下専、セプチン、神経科学辞典、査読有、2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田(石原) 奈津実

(AGETA-ISHIHARA NATSUMI)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：60547561

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし