

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 28 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22890061

研究課題名（和文） 神経細胞の極性形成を制御する分子群のイメージング解析

研究課題名（英文） The imaging analysis of molecules that regulate neuronal polarity

研究代表者

犬束 歩 (INUTSUKA AYUMU)

新潟大学・医歯学総合研究科・研究員

研究者番号：30584776

研究成果の概要（和文）：

本研究では、神経細胞の極性形成を制御している SAD キナーゼの新規下流因子を同定することを目的としてスクリーニングを行い、幾つかの候補分子を得た。そのうち一つのキナーゼに関しては神経突起の形態制御に関与している結果が得られたため BrancK と名付けた。BrancK は中枢神経系において強く発現がみられ、神経突起における微小突起形成時に濃縮が観察された。また、BrancK ノックアウトマウスでは神経分岐数の減少が確認された。

研究成果の概要（英文）：

To identify new downstream elements of SAD kinase which is known to regulate neuronal polarity, we undertook screening and identified several candidate molecules. One of them is strongly enriched in the central nervous system, and we named it BrancK after its function on neurite branching. Elevation of BrancK activity in primary hippocampal neurons promoted neurite branching, and we found that BrancK was enriched at the sites where new microspikes emerged along neurites. Consistent with these findings, BrancK KO mouse showed reduced neurite arborization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：神経極性、イメージング、SAD キナーゼ、細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は神経突起を介して結びつき、情報をやり取りしている。この神経突起は一本の軸索と複数の樹状突起という役割と性質の異なる二種類の突起に分けられる。樹状突起は神経伝達物質を介して受け取った情報を電気信号に変えて細胞体に伝える一方、軸索は他の細胞へと神経伝達物質を放出して情報を伝える。このような方向性を持った情報の流れが、神経細胞がお互いに結びついてネットワークとして機能するには必要不可欠であるが、こうした極性がどのように形成されるのかは近年までほとんど分かっていなかった。

神経細胞の極性形成はこれまで主に海馬神経細胞の初代培養をモデルとして研究が進んできた。1980年代に Banker 博士らのグループが開発したこの手法では、培養下で神経細胞が自律的に神経突起を伸長し、樹状突起と軸索とに分化する様子を観察することができる。こうした系を用いることで、アクチンフィラメントの安定性が低下した神経突起が軸索として選ばれ、その後微小管の伸長が非対称に促されることで軸索・樹状突起の運命が決定される、というモデルが提起されることとなった。2000年代に入ると、細胞内因子としてどういった分子が軸索・樹状突起の分化に関わっているのかに分子生物学的な解析が行われるようになった。これまでに、微小管の重合に関わる CRMP2(Inagaki et al., 2001) や DOCK7(Watabe-Uchida et al., 2006)、また一般的な細胞極性の確立に関わる GSK3 β (Yoshimura et al., 2005)や Par3/Par6(Shi et al., 2003)といったシグナル分子が伸長中の軸索突起と樹状突起との間で不均等に分布しているという報告がなされている。この中のいくつかは神経細胞に過剰発現させると複数の軸索を形成するようになるという結果が得られており、逆に RNAi を用いた機能阻害実験によってもその重要性が示されている。しかし、実際に *in vivo* の神経組織内で不可欠であることが証明されているものは少なく(Wildonger et al., 2008)、ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析ではその必要性に否定的な結果が得られている例も存在している(Rolls et al., 2004)。よって、神経細胞の極性形成にとってどのシグナル経路が他との機能重複なしに普遍的に重要であるのかは未だ解決しているとは言えず、*in vivo* での解析を含めた今後のさらなる研究が必要とされていた。

2. 研究の目的

SAD キナーゼは神経細胞の極性化を *in vivo* で司っていることが遺伝学的に示された数少ない分子の一つである。SAD キナーゼの遺伝子欠損マウスから取られた海馬神経細胞は、どれも同程度の長さの神経突起を持ち、分子マーカの分布パターンを含めて、樹状突起と軸索突起とがうまく分化していないということが報告されている(Kishi et al., 2005)。SAD キナーゼが神経細胞極性化を制御する分子機構については、特定の突起内で上流因子である LKB1 が SAD kinase を活性化することが、軸索突起としての運命を決定づけることが報告されている。また、SAD キナーゼの下流因子の一つとして微小管関連タンパク質である tau が位置することが明らかとなっている。ただし、tau のノックアウトマウスを用いた解析などから生理的に重要な下流因子がまだ他に存在することが疑われている。

本研究課題では SAD キナーゼの新規下流因子をスクリーニングにより同定すること、および SAD キナーゼおよび下流因子群について主にライブイメージングの手法を用いて解析し、神経突起の運命が決定づけられていくメカニズムを明らかにすることを目標とした。FRET を利用したプローブを作製することにより、神経細胞内における SAD キナーゼの活性が時間的・空間的にどのように制御されているかを明らかにし、基質分子やその下流因子の動態と合わせて解析することで、そうした分子群がどのように協調して最終的な細胞形態の変化をもたらしているのかを明らかにしようと試みた。

3. 研究の方法

当初は、SAD キナーゼのリン酸化基質としてホモロジーリサーチによって同定されたアクチン結合分子に関して、神経細胞の極性形成過程における機能を主にイメージングを用いて解析することを予定した。そのためにも、リン酸化による構造変化を分子的基盤とした FRET を利用した SAD キナーゼ活性化状態のプローブの作製を試みた。また、蛍光分子タグをつけた基質候補分子のコンストラクトを作製し、SAD キナーゼ活性化による局在の変化のイメージングを試みた。さらに、SAD キナーゼのダブルノックアウトマウスの神経組織切片に対して、基質分子のリン酸化部位に対する特異的抗体を用いた免疫染色を行い、*in vivo* における基質分子のリン酸化状態を調べた。

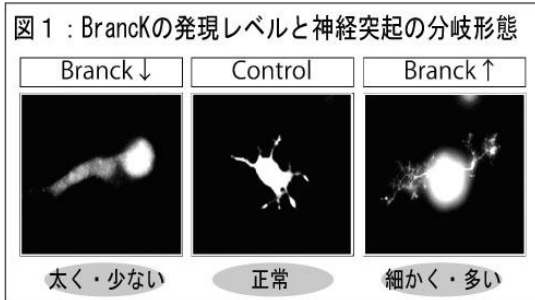
しかし、こうした手法ではポジティブな結果が得られなかったため、Yeast-2-hybrid システムを用いたスクリーニングを行い、SAK キナーゼの下流因子候補について再度洗い

直しを行った。そうして得られた候補分子の一つには神経突起の分岐数を増加させる働きがみられたので、**in situ hybridization**による生体内での局在を調べた。また、蛍光タグを付けたコンストラクトを発現させ、神経突起の分岐形成過程における細胞内局在を調べた。次に、海馬初代培養神経細胞において過剰発現およびRNAiによる発現抑制を行い、神経突起形態に対する影響をみた。さらに、ノックアウトマウスの作成を行い、**Whole-mount immunostaining**で末梢神経の走行を、**Golgi**染色で中枢神経系の神経突起形状を解析した。

4. 研究成果

本研究では神経細胞の極性形成を制御していることが知られているSADキナーゼについて、1. その時間的・空間的活性化状態を示すようなFRETプローブを作成すること、2. いまだ明らかとなっていないSADキナーゼの下流因子を同定すること、の2点を目標として実験を行った。1番の目標については、YFPのC末の長さや各ドメイン間のスペーサーの長さを変化させた様々なCFP-SADキナーゼ-YFPのコンストラクトを作成してFRET効率をアッセイしたが、残念ながら良好な結果を得ることはできなかった。しかし、2番の目標については、Yeast-2-hybridシステムを用いたスクリーニングによって幾つかの新規候補分子が得られ、そのうちの一つに関しては神経突起の形態制御に関与している結果が得られたためBrancKと名付けた。

BrancKはこうして同定された神経突起の分岐制御因子である。BrancKを神経株細胞であるNeuro2aに強制発現させると非常に細かく分岐の激しい神経突起が誘導される一方で、shRNAによる発現抑制では太くて短い異様な形態を有する細胞が発生する(図1参照)。

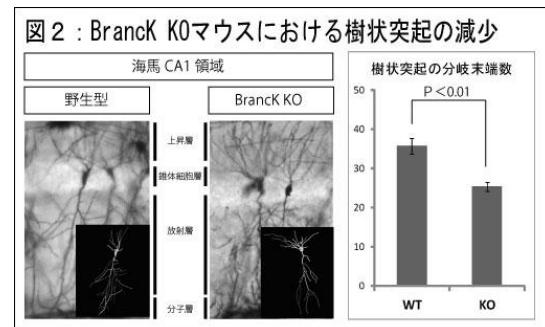


BrancKは神経細胞の極性形成に関与している可能性がある。神経系に強く発現するセリン・スレオニンキナーゼであるSADキナーゼは未分化な神経突起が軸索と樹状突起とに分化する機構に深く関与している(Kishi et al., 2005; Science)。申請者らはその基

質分子候補で神経突起伸長にも関わる分子としてアクチン骨格の制御因子であるSlingshot1や微小管の制御因子であるSteerin1などを同定しているが(Inutsuka et al., 2012; Niigata Medical Journal)、BrancKはこのSADキナーゼの下流因子候補に含まれているからである。

- 申請者らはこれまでの実験によって、
- ・BrancKが発生過程において神経系全体に強く発現していること
 - ・マウス海馬初代培養神経細胞においてBrancKの過剰発現が神経突起本数を増加させること
 - ・BrancK KOマウスから得られた海馬初代培養神経細胞では神経突起の本数が減少していること
 - ・BrancK KOマウスでは腹部末梢神経および海馬CA1の神経突起の分岐数が減少していること(図2参照)
 - ・BrancKが神経細胞に生じるフィロポディア状の微細突起を増加させること
 - ・蛍光タグ付きのBrancKがそうした微細突起の形成部位に濃縮すること
 - ・接着分子であるラミニンはフィロポディア増加をもたらすが、BrancK KOマウスから得られた海馬初代培養神経細胞ではそのような応答が大きく減少していること

といった結果を得た。これらの実験結果を通して、BrancKが発生過程における神経突起の分岐形態を制御していることを申請者は明らかとした。



これらの内容は既に学会で発表し(Inutsuka et al., 2011; Cold Spring Harbor Conference Asia)、現在論文投稿準備中である。

- #### 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)

①Ayumu Inutsuka, Masashi Kishi
“ SAD kinases regulate neuronal
polarization through Slingshot1 protein
phosphatase”
Niigata Medical Journal
Peer Review: Yes
volume 126 (2), 2012 (in press)

[学会発表] (計 1 件)

①Ayumu Inutsuka, Shun Uemura, Manabu Abe,
Kenji Sakimura, Minesuke, Yokoyama
Michihiro Igarashi, Masashi Kishi
“ Branch-A novel regulator of neurite
branching”
Poster, Cold Spring Harbor Conference Asia,
Suzhou, 18th Oct 2011, #31

6. 研究組織

(1) 研究代表者

犬東 歩 (INUTSUKA AYUMU)
新潟大学・医歯学総合研究科・研究員
研究者番号：30584776

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岸 将史 (KISHI MASASHI)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：60573938