

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700448

研究課題名（和文） 脳内における方向性を持った軸索形成機構の解析

研究課題名（英文） Mechanism of oriented-axon outgrowth in developmental brain

研究代表者

鳥山 道則 (TORIYAMA MICHINORI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号：90457151

研究成果の概要（和文）：

本研究では、軸索伸長に必要とされる駆動力発生の分子メカニズムの解明を行った。その結果、軸索ガイダンス分子 Netrin-1 はリン酸化酵素 Pak1 を通じ、クラッチ分子である Shootin1 のリン酸化修飾を促進する。このリン酸化により Shootin1 はアクチン繊維の逆行性移動に伴う運動エネルギーを細胞接着分子および細胞外基質に伝達することで、軸索伸長に必要となる駆動力の発生を制御する。以上の結果から化学シグナルを運動エネルギーに変換する分子機構の一端が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Here we show that shootin1 is located at a critical interface, transducing a chemical signal into traction forces for axon outgrowth. We found that a netrin-1 positively regulates Pak1-mediated shootin1 phosphorylation. This phosphorylation enhanced the interaction between shootin1 and F-actin retrograde flow, thereby promoting F-actin-substrate coupling, force generation, and axon outgrowth. These results suggest that dynamic actin-substrate coupling can transduce chemical signals into mechanical forces to control cellular motility and provide a molecular-level description of how this transduction may occur.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経化学・総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：脳・神経、発生・分化、神経科学、細胞極性、軸索ガイダンス、軸索伸長、shootin1、netrin-1

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は、軸索を伸長し他の細胞とシナプスを形成し、神経回路を形成することで脳の活動に必要な情報ネットワークを構築する。軸索が標的細胞と正しくネットワークを形成するためには、軸索の伸長方向が厳密に制御されていなければならない。先行研究により軸索伸長を制御する軸索ガイダンス分子、およびそれらに対する受容体分子が同定されていた。軸索伸長およびその方向決定に

は、軸索先端に存在する成長円錐において、駆動力の発生が必要となることが近年示唆されてきた。しかしながら、神経回路網形成時において、軸索ガイダンス分子がいかにして軸索伸長に必要な駆動力の発生およびその制御を行うかについては定かではない。

2. 研究の目的

本研究では、軸索ガイダンス分子による軸索

伸長の分子メカニズムについて、成長円錐で発生する駆動力について焦点を絞り解析を行った。研究代表者はすでに、神経細胞で特異的に発現するクラッチ分子 *shootin1* を同定している。クラッチ分子 *shootin1* は成長円錐に存在するアクチン繊維と細胞接着分子とを連結する分子であり、アクチン繊維の逆行性移動により生じる運動エネルギーを細胞接着分子へと伝達することで、軸索伸長に関与することを明らかにした、(Toriyama et al., *J Cell Biol* 175:147-157, 2006、Shimada et al., *J Cell Biol* 181: 817-829, 2008)。そこで、軸索ガイダンス分子によりクラッチ分子 *shootin1* の活性制御を行うことで軸索伸長の制御を行う可能性が高いと考え、その分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

[ラット海馬神経細胞の初代培養および遺伝子導入]

胎生 18 日目のラットより海馬神経細胞を調整し L1 コーティングを施した glass coverslip, ポリアクリルアミドゲル上に培養した。Netrin-1 刺激は終濃度 300 ng/ml で行い、コントロールには同濃度 BSA を用いた。軸索および成長円錐の糸状仮足の長さは、細胞を固定後免疫染色を行った。細胞内に遺伝子を導入する際には Nucleofector (Lonza) を用いた。RNAi による遺伝子発現の抑制は BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (Invitrogen) を用いて行った。

[細胞内 1 分子計測法]

EGFP-*Shootin1* および mRFP-actin の細胞内 1 分子計測は、渡邊らの手法 (Watanabe et al., *Science* 295: 1083-1086, 2002) を用いて行った。得られた Timelapse 画像から kymograph を作成することで *Shootin1* およびアクチン繊維の逆行性移動の速度を解析した。

[Traction force microscope 法]

成長円錐で発生する力の解析には Traction force microscope 法を用いた (Chan et al., *Science* 322: 1687-1691, 2008)。蛍光マイクロビーズを含むポリアクリルアミドゲル上に神経細胞を培養し、培養開始 1~2 日後に共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。成長円錐直下における蛍光ビーズの移動度およびその方向について解析することで、成長円錐で発生する力の大きさと方向を計測した。

4. 研究成果

[Netrin-1 刺激による *shootin1* のリン酸化]

培養海馬神経細胞を Netrin-1 で刺激すると、*Shootin1* の Ser101 および Ser249 の有意なリン酸化の上昇が認められた (図 1)。このリン酸化の上昇は Pak1 および Pak1 の活性化分子である Cdc42, Rac1 の dominant negative 体の過剰発現により著しく抑制された。この結果から軸索ガイダンス分子 Netrin-1 の刺激により Rho family GTPase である Cdc42 および Rac1 の活性化を誘導することでリン酸化酵素 Pak1 を活性化し *Shootin1* のリン酸化修飾を行ったと考えられる。

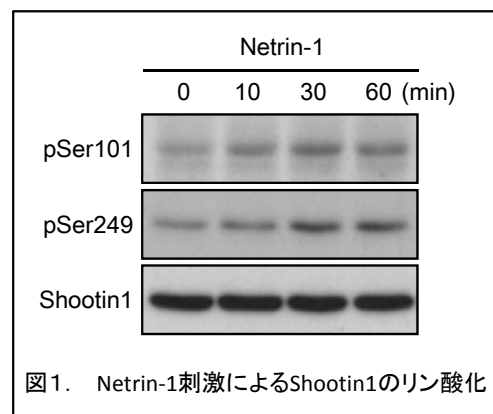


図1. Netrin-1刺激によるShootin1のリン酸化

[リン酸化 *shootin1* の細胞内局在およびアクチン繊維との相互作用]

リン酸化 *shootin1* は成長円錐に存在する糸状仮足および葉状仮足に強く局在することを細胞免疫染色法から明らかにした。また、Pak1 の dominant negative 体を過剰発現した神経細胞では *shootin1* の成長円錐への局在化が有意に抑制された。このことから、*shootin1* のリン酸化修飾は *shootin1* の成長円錐への局在に必要であると考えられる。成長円錐辺縁部の糸状仮足および葉状仮足はアクチン繊維が豊富に存在する構造体である。*Shootin1* がリン酸化によりこれらのアクチン繊維と相互作用する可能性が高いと考え、一分子計測法により *shootin1* とアクチン繊維との相互作用について解析した。その結果 *shootin1* の蛍光スペックルの移動速度はアクチン繊維の逆行性移動の速度とほぼ同じであった。

[Netrin-1 刺激による力の発生]

Traction force microscope 法により成長円錐で発生する力の発生を解析したところ、Netrin-1 刺激により有意に力の発生が上昇することが明らかになった。この力の発生は、*shootin1* の発現抑制細胞や Pak1 の dominant negative 体を発現した細胞では顕著に抑制された。このことから成長円錐における力の発生には *shootin1* のリン酸化修飾が必要であると考えられる。

[Netrin-1 刺激による糸状仮足および軸索の伸長]

さらに、Netrin-1 刺激は成長円錐の糸状仮足および軸索の伸長を正に制御する活性を有する。これらの変化は成長円錐で発生する力が関与することが考えられてきたが、Shootin1 の発現抑制細胞や Pak1 の Dominant negative 体を発現した細胞では顕著に抑制された(図 2)。このことから、細胞の形態変化を生み出す力の発生は shootin1 のリン酸化修飾により制御されていることが明らかになった。

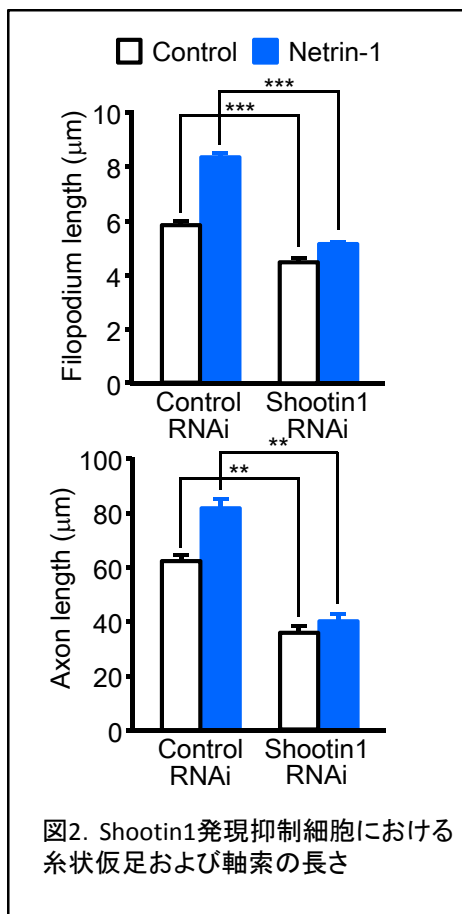


図2. Shootin1発現抑制細胞における糸状仮足および軸索の長さ

以上の結果から、リン酸化酵素 Pak1 による shootin1 のリン酸化が、軸索を正しい場所にナビゲーションするために化学的な誘引信号(軸索ガイダンス分子)を駆動力に変換することが明らかとなった[図 1]。

神経が正しい場所へ軸索を伸ばす分子の仕組みの解明は、神経再生の治療法開発にとって基盤となる知見である。今回の発見は、この機構の中で、キーポイントとなる化学的な誘引信号を駆動力に変換する仕組みの一端を明らかにした。さらに、このようなナビゲーションの仕組みは、発生に伴う生体内の細胞移動や、免疫細胞の移動やがん細胞の浸潤など他の細胞にも存在する可能性が示

唆されており、発生学に加えて免疫学やがん研究などの医学研究の加速も期待できる。

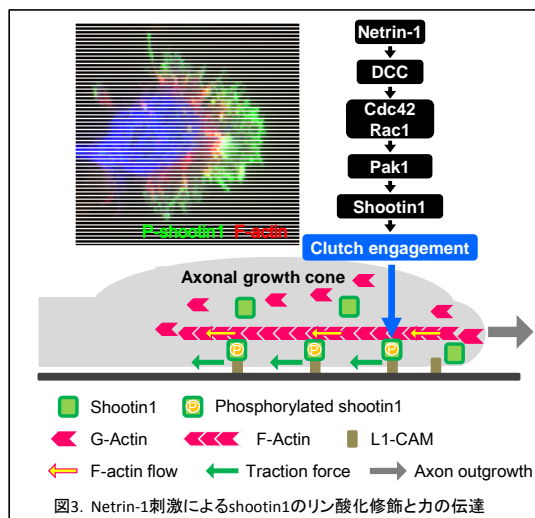


図3. Netrin-1刺激によるshootin1のリン酸化修飾と力の伝達

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 5 件)

- ① Toriyama M, Kozawa S, Sakumura Y. and Inagaki N. Conversion of a signal into forces for axon outgrowth through Pak1-mediated shootin1 phosphorylation, *Current Biology* 23, 529-534 (2013). 査読有
- ② Nakazawa H, Sada T, Toriyama M, Tago K, Sugiura T, Fukuda M and Inagaki N. Rab33a mediates anterograde vesicular transport for membrane exocytosis and axon outgrowth. *J. Neurosci.* 32, 12712-12725. (2012). 査読有
- ③ Toriyama M, Mizuno N, Fukami T, Iguchi T, Toriyama M, Tago K, and Itoh H. Phosphorylation of doublecortin by protein kinase A orchestrates microtubule and actin dynamics to promote neuronal progenitor cell migration. *J Biol Chem.* 287, 12691-12702, (2012). 査読有
- ④ 吉田 互, 鳥山道則, 稲垣直之, プロテオミクスを基礎にした神経細胞が非対称性を獲得する機構の解析, *生物物理化学* 56 : 31 (2012) 査読無
- ⑤ Hirano Y, Hatano T, Takahashi A, Toriyama M, Inagaki N, Hakoshima T. Structural basis of cargo recognition by the myosin-X MyTH4-FERM domain, *EMBO J.* 30,

2734-2747. (2011). 査読有

〔学会発表〕(計2件)

① Toriyama M, Inagaki, N. Netrin-1 Regulates Pak1-mediated Phosphorylation of Shootin1: Modulation of Clutch Activity of Shootin1 for Axon Outgrowth, 2011 The American Society for Cell Biology Annual Meeting, 920, Denver, USA, (2011)

② Toriyama M, Inagaki, N., Netrin-1 Regulates Pak1-mediated Phosphorylation of Shootin1: Modulation of Clutch Activity of Shootin1 for Axon Outgrowth, Exciting Biology Series "Cellular development: biology at the interface", P62, Kobe, Japan, (2011)

〔その他〕

ホームページ等

http://nippon.naist.jp/inagaki_g/

メディア発表

1) 日刊工業新聞 (2013年3月1日)

奈良先端大、軸索が伸長し神経細胞と結合する仕組み解明

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥山 道則 (TORIYAMA MICHINORI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号：90457151