

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570245

研究課題名(和文) 神経回路形成における Slit シグナリングの分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of Slit-Robo signaling in the formation of neural circuits

研究代表者

河田 純一 (Kawada, Junichi)

九州大学・先端医療イノベーションセンター・准教授

研究者番号：00312207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：発生過程で伸長中の軸索が、ガイダンス分子に対する応答性を正しい場所・タイミングで切り替える分子基盤を研究した。腹側正中線は、神経系全体の発生に影響を及ぼしつつ、軸索に対し重要な中間標的として機能する。軸索は、正中線を通り超えるか、超えないかの、二者選択を迫られ、超える場合は一度きりである。一度きりの正中線交叉の基盤となるのが、反発性ガイダンス分子Slitに対する軸索応答性のスイッチと想定される。本研究では、Arf低分子量G蛋白質、特にArf6とその活性化因子群が、Slit応答性スイッチを正負に制御する仕組みを解明した。この仕組みが一度きりの正中線交叉を保証すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied how developing axons change responses to guidance cues, such as the repellent Slit, at the right time and place. The ventral midline is an important structure for axon guidance and also regulates the formation of neural circuits. At the midline, growing axons have to choose between two alternatives: to cross the midline or not to cross it at all. Because the midline is a repulsive barrier against most axons, commissural axons require a special strategy to cross the midline. It has been thought that a midline switch in axonal response to the repellent Slit underlies midline crossing by commissural axons. In this study, we found that functionally distinct signaling pathways composed of an Arf family GTPase and its activators Arf-GEFs (guanine exchange nucleotide factors) negatively and positively regulate this switch before and after axon midline crossing, respectively. This mechanism seems to ensure that commissural axons cross the midline only once.

研究分野：神経発生学

キーワード：Slit-Robo 軸索ガイダンス 脊髄感覚神経 正中線 エンドサイトーシス リサイクリング Arf6低分子量G蛋白質

1. 研究開始当初の背景

1990年代以降、感覚系投射地図形成機構の研究は飛躍的に進展した。その気運の中、申請者は、眼の前後軸を決定し、視蓋上の視神経投射地図形成を支配するマスター遺伝子産物として2つの forkhead 転写因子を発見した(Yuasa et al. Nature 1996)。投射地図に代表される、複雑でありながら秩序正しい神経回路パターンがどのように形成されるのか、という問題は多くの研究者の興味を引き付けてきた。発生期に、ある場所から伸び出した軸索の多くは、遠く離れたゴールに向けて長旅をしなければならない。軸索は旅の途中で幾多の中間標的に出会い、その度に次の進行方向を決める行程を繰り返すことになる。その過程をよく見ると、中間標的は軸索が自分の方に向かうように誘因性ガイダンス分子と、辿り着いた軸索をすぐ追い出せるように反発性ガイダンス分子の両方を提示している。一方、軸索は中間標的に到達するまでは、誘引活性にのみ反応する状態にあり、反発活性には無反応である。ところが到達した途端、軸索は誘引活性に無反応となり、反発活性に対する応答性を獲得することで、次の中間標的に向けて旅を続ける。タイミングよく不可逆的に作動する軸索応答性スイッチを支える分子基盤はまだわかっていないが、その時間依存的な仕組みが、複雑な回路パターンを作り出す大きな要因と想定されて来た。

腹側正中線は、ヒトを含む左右対称動物で基本的な構造であり、かつ神経系全体の発生を支配する重要な中間標的である。脳・脊髄の投射性介在ニューロンである交連ニューロンの軸索は、腹側正中線を一度だけ交叉する。そのため、軸索反応性スイッチの研究に適したモデル系である。反発性分子 Slit と Robo 受容体は、軸索が正中線交叉するかしないかを決定する役目を持つことが、ショウジョウバエと脊椎動物の研究で証明され、多くの分野で注目を集めた。しかし、正中線交叉時に、軸索がどのようにして、タイミングよく Slit 反応性を off から on に切替えるのかは不明のままである。

申請者は、長年の懸案であった、Slit 応答性の活性化を培養系で再現することに成功した。また Robo1(Slit 反発活性を伝達する Robo) と結合する脱ユビキチン化酵素 USP33 が、Slit 反応性の獲得と正中線交叉に必要であることを示した(Yuasa-Kawada et al. Nat. Neurosci. 2009)。更に神経細胞だけでなく、乳がん細胞においても Slit シグナル経路が機能し、USP33 依存的に運動性を抑制した(Yuasa-Kawada et al. PNAS 2009)。これらの結果から、USP33 が Slit シグナル経路で重要な役割を果たすこと、またこの機構が生物学的に広く保存されていることが判った。申請者はこの方向の解析を進め、タイミングよく Slit 応答性を活性化する仕組みの本体が、Slit の感作反応である可能性に気

付いた。通常のリガンド - 受容体反応の場合、リガンド刺激により脱感作反応が起こり、このような感作型のシグナル経路はまだ知られていない。本研究では、Slit による感作反応の分子基盤の解明を目指すとともに、Slit シグナル経路の仕組みを詳しく調べ、その原理に迫ることを計画した。Slit-Robo は神経ガイダンスの他、血管形成、形態形成全般、がん抑制においても重要であり、生体内で細胞運動を制御する目的で、将来広く臨床応用される可能性がある。Slit シグナル経路の理解を深めることで、新しい治療戦略の足掛りが得られるはずである。

2. 研究の目的

軸索が Slit 応答性をタイミングよく獲得する仕組みの解明を目指し、以下の3つの項目を明らかにしたい。

1) 感作反応の証明 : Slit が、Slit 自身に対する軸索反応性を、正中線交叉時に活性化する可能性を見出した。これはユニークな感作反応であり、発生期に機能する同様の反応はまだ知られていない。予備実験より、Robo 輸送が分解経路からリサイクリング経路へ切替わることが判明し、それが鍵となりそうである。Slit 刺激下では、Robo1 の細胞内への取り込みとリサイクリングが連動して作動し、細胞内輸送サイクルがぐるぐる回転することで、感作反応が起こるという仕組みを証明したい。

2) srGAP - ミオシン系の相互作用の意義 : 申請者のグループは、Slit-Robo 経路の下流シグナル伝達分子として srGAP を発見した(Wong et al. Cell 2001)。srGAP は Rho GAP ドメインの他、生体膜変形装置と想定される F-BAR ドメインを併せ持つ多機能分子である。F-BAR ドメインはアクチン細胞骨格調節分子群に広く保存され、細胞膜の変形とアクチンダイナミクスを連動させる役割を持つと考えられて来たが、どのようにアクチン系と協調的に細胞膜変形を起こすか、不明であった。最近、申請者らは酵母 two-hybrid スクリーニングから、srGAP と結合する分子として、ミオシン様の分子を同定した。この分子が Slit の感作反応を制御する可能性があり、検討を行う。また、Slit シグナルを受けて、srGAP-ミオシン系のユニットが細胞膜変形とアクチン系再構築を協調的に進行させる仕組みと意義を解明できれば、成長円錐・細胞の運動方向決定や形態形成の原理を、より深いレベルで理解できる可能性がある。

3) Ankrd 蛋白質の機能 : 申請者らは別の Robo1 結合分子として、新規な Ankrd アンキリンリピートドメイン蛋白質を同定した。その機能を解明したい。このファミリーの多くのメンバー(50個以上存在する)の機能はまだ不明であるが、幾つかが発生過程のシグナル伝達で重要な役割を果たすことが判明しつつある。エンドソーム上で細胞内シグナル伝達のプラットフォームを構築するか、細

胞質から核へ Slit シグナルを伝達する役割を想定する。その後の核シグナリングが感作反応に寄与するか調べる。また、Slit シグナル経路と類似する、生物学に重要なシグナル経路に、このファミリーの別のメンバー群が存在することも、申請者は確認している。シグナリング回路間で保存されたユニークな原理を探る上で、重要なヒントが得られそうである。

3. 研究の方法

1. Slit シグナル経路が Robo1 受容体輸送経路の切替えを利用した感作型反応であることの証明

通常、リガンド刺激により細胞（軸索）全体と形質膜上の受容体レベルが低下し、脱感作が起こるが、Slit-Robo シグナリングでは、Slit 刺激により軸索先端と表面の Robo1 レベルが上昇する現象を、申請者らは培養脊髄交連ニューロンを使い、発見した。このことから、Slit 刺激により感作反応が起こる可能性が考えられた。この反応は、正中線交叉時にタイミングよく、交連軸索が Slit 感受性を不可逆的に増強する仕組みの本体と期待されるため、以下の研究に取り組む。

a) Robo1 輸送サイクルの寄与

Robo1 は、リサイクリング輸送に重要な endocytic recycling compartment (ERC) と trans-Golgi network (TGN) に主に局在することが判った。Slit 刺激により、Robo1 は ERC/TGN 経路で軸索先端へリサイクルされる可能性がある。また、他グループが網膜ニューロンを用いた実験で、エンドサイトーシスが Slit シグナル経路に重要と報告した。そこで、エンドサイトーシスとリサイクリングが Slit 感作に関与するか調べるため、種々の細胞内輸送調節因子に対する RNAi 実験を行う。現在進行中の実験で、small GTPase である Rab5 と Rab11 の RNAi により感作反応は消失したため、エンドサイトーシスとリサイクリングの両方が感作に必要と考えられ、まず始めにこの実験を完成させる。

b) Slit 刺激後の Robo1 の運命：new Robo or used Robo?

申請者がこれまでに得た知見から、Slit 非刺激下では Robo1 はエンドサイトーシス後速やかに分解されるが (Yuasa-Kawada et al. 2009)、Slit 刺激下ではエンドサイトーシス後のリサイクリング経路が活性化されることで Robo1 が安定化し、細胞内と細胞膜を往復する輸送サイクルがぐるぐる回転することで、シグナルが増強される可能性が高い。シグナル伝達に寄与する活性型 Robo1 は、刺激時に細胞膜表面に出ていて取り込まれ、その後膜にリサイクルされたものか、エンドソームに滞在するもの (endocytic signaling) それとも ERC/TGN に最初保存されていたのが新たに軸索膜上に輸送されたものだろうか？ “使い古し”あるいは“新品”の Robo1 のどちらが反応に寄与するか検討するため、

Slit 刺激前に抗体標識した Robo1 の挙動を追跡するか、あるいは刺激前に膜局在する Robo1 をブロックしておき、刺激後新たに膜上に現れた Robo1 を検出するという、2種類の生細胞抗体標識実験を行う。Slit シグナリングにおいて、Robo1 輸送系を利用した感作反応の仕組みが見えると期待する。

c) エンドサイトーシス依存的な Slit 感作反応の on/off

Rab5 を抑制すると、意外なことに、Slit 刺激下でも Robo1 分解経路に切替り、一方、エンドサイトーシス正常作動時のみ、Slit 刺激依存的に Robo1 輸送サイクルが稼働し、感作反応が起こるのが最近わかった。そこで、何らかのエンドサイトーシス制御分子の発現レベルあるいは活性が変化することで、正中線交叉時にタイミングよく、Slit 感受性が活性化される可能性がある。そのような制御分子(群)の探索、発現解析と機能解析を行う。エンドサイトーシスには様々なルートと機構があるが、まだ不明な点が多い。現在も研究が精力的に進んでいる分野であり、それらの知見を随時参考にしながら、候補分子の中から探索を行う。最後に、in vivo において、判明したメカニズムで説明可能か、ノックアウトマウスや個体レベルのノックダウンで検証する。

2. srGAP-ミオシン系の物理的相互作用と Slit による制御の意義

申請者らの研究で、Slit-Robo 経路の下流分子 srGAP がミオシン様分子と直接相互作用し、Slit 刺激がミオシン活性を制御することが判った。これまで srGAP がニューロンの運動を抑制し、軸索（樹状突起）伸長と分枝を促進することが報告されている。本研究では、srGAP による運動と突起伸長のバランスを取るメカニズムにおいて、そのミオシンが通常時 (Slit 非存在下) どのように機能するのか、ミオシン阻害薬や srGAP とミオシンの RNAi、機能欠失変異体を用いて調べる。また、srGAP、アクチン、ミオシン、脂質膜等からなる無細胞再構成系も使用する。更に、srGAP - ミオシンという細胞膜変形 - アクチン系制御ユニットが Slit 刺激を受けて、翻訳後修飾されるのか、またどのように機能を変化させるか、交連ニューロンと、もう1つの Slit 反応性の細胞モデル系である、脳室下帯由来ニューロン (SVZa) を用いて調べる。細胞膜の曲率制御と裏打ちの F-アクチンの再構築をカップルさせた形態形成の仕組みを解明したい。例えば、細胞生物物理学的アプローチを導入することで、細胞膜曲率変化に応じ、このユニット依存的でアクトミオシン系により細胞牽引力を変化させるメカニズムが発見できそうである。また Slit 刺激に応じて、ERC 近傍に局在する srGAP とミオシン系がリサイクリングにより軸索膜へ輸送されることが、どのように感作反応に寄与するか調べる。

3. 新規アンキリンリピートドメイン蛋白質の機能

申請者らは、酵母 two-hybrid スクリーニングにより Robo1 結合蛋白質の探索を行い、USP33、srGAPs の他に、Ankrd (MW:170 kDa) を同定した。Ankrd はこれまで機能が全く知られていない新規蛋白質であるため、まずオーソドックスな解析から開始したい。

a) Slit 刺激により、Robo1 との相互作用が変化するか検討する。

b) 発生過程における発現タイムコースを、in situ ハイブリダイゼーションと免疫組織化学により検討する。また、細胞内局在を確定する。

c) 申請者らが発見した下流分子 srGAP と、制御分子 USP33、また他グループから報告された Robo1 結合蛋白質群との相互作用を検討し、Ankrd がシグナル伝達プラットフォームとして機能する可能性を検討する。細胞内の何処で、どのコンポーネントと相互作用し、Slit による制御を受けるか調べる。Ankrd は細胞質と核に局在するため、細胞質 - 核間シグナリングの可能性も検討する。マイクロアレイ解析を行い、Slit で発現調節を受ける候補遺伝子群を同定したが、その中に幾つかのガイダンス分子とその受容体が含まれ、ガイダンスシグナル間の階層構造が見えてきた。Ankrd が実際に核シグナル伝達体かもしれないという可能性に、申請者は興味を持っている。

d) 培養ニューロンを使った成長円錐崩壊アッセイや、個体レベルの RNAi により、Ankrd が Slit シグナル経路に関係するか調べる。

e) Ankrd ファミリーに共通の存在意義を確立する。データベース検索の結果、Ankrd タンパク質は Slit シグナリングに類似点のある複数のシグナル経路（例えば、インスリン - Glut4 輸送系）でも発見できた。ファミリー全体ではまだ機能は未解明ながら、重要である可能性があり、また疾患への関与も指摘されている。Slit シグナル経路での Ankrd タンパク質の機能解析をモデルケースとしたい。

4. 研究成果

1. 軸索の正中線交叉における Slit 応答性スイッチの実体の解明

Slit 応答性スイッチの根幹には、感作型反応に加えて、その抑制系と促進系の両方が存在することを本研究で明らかにした。その成果をまとめ、現在、論文投稿中である。

まず、正中線交叉後のステージのマウス胚から調製した脊髄交連ニューロンを Slit で刺激すると、軸索の Slit 応答性は減弱せず、むしろ増強されることを証明した。また、Robo1 受容体のエンドサイトーシスとリサイクリングの両方が、Slit 応答、更に Slit 自身による感作反応に必要であった。この輸送経路を遮断した場合、軸索表面の Robo1 レベルが増大することで応答が強められるとい

う予想に反し、むしろ Robo1 の軸索レベルと Slit 応答性が顕著に低下することが判った。細胞膜と細胞内を往復する Robo1 受容体の輸送サイクルが回転することが、Slit-Robo シグナリングに必須であり、何らかの細胞内シグナルを増強すると予想した。今期間中の研究の結果、その要となるのは、Arf 低分子量 G 蛋白質、特に Arf6 と判明した。Arf6 ノックアウトマウス、及び胚性脊髄に ex vivo エレクトロポレーションを行った実験で、交連軸索の正中線交叉は有意に抑制され、正中線内、あるいは越えた直後で軸索伸長が停止する表現型が認められた。

更に、Slit-Robo シグナリングの下流で Arf6 を活性化する因子として、複数の Arf-GEFs (guanine nucleotide exchange factors) を同定した。それらが軸索応答性スイッチ内部のポジティブフィードバックループを交叉前では負に、交叉後では正に制御することが、in vitro、in situ、in vivo レベルの解析で明らかとなった。以上の成果から、Slit 応答性の制御回路の中心部分を解明することができたと考える。正中線交叉前では、Slit 応答性が偶発的に ON になるのを阻止し、交叉後においてのみ軸索が Slit 応答性を獲得することで、正中線へスムーズに進入でき、一旦入ると今度はすぐ追い出されるよう仕向ける仕組みが見えてきた。

2. srGAP-ミオシン系の物理的相互作用と Slit による制御の意義

3. 新規アンキリンリピートドメイン蛋白質の機能

1. の Slit 応答性スイッチの実体が予想以上に興味深く、その解析に時間を要したため、現在、培養細胞において Robo1 受容体とミオシン様分子と Ankrd 蛋白質の相互作用をそれぞれ免疫沈降にて確認した段階にある。詳細な機能解析は現在進行中である。

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)

Nishiwaki, Y., Yoshizawa, A., Kojima, Y., Oguri, E., Nakamura, S., Suzuki, S., Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Mochizuki, T., Masai, I. The BH3-only SNARE BNip1 mediates photoreceptor apoptosis in response to vesicular fusion defects. *Dev. Cell* 25, 374-387 (2013).

査読有

[学会発表](計 5件)

Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Yanagi, S., Masai, I., Rao, Y., Wu, J.Y. Upregulation of sensitivity to the repellent Slit during midline crossing

by commissural axons. 第45回日本発生
生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大
会(2012年5月30日・神戸コンベンション
センター)

湯浅 - 河田純一、木下 - 河田真理子、柳茂、
政井一郎、Rao, Y., Wu, J.Y. : 正中線交叉
における交連軸索のSlit応答性スイッチ
を支える分子メカニズム: Robo1細胞内輸送
系と脱ユビキチン化酵素 USP33の役割.

第35回日本分子生物学会年会(2012年12月
14日・福岡国際会議場)

Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M.,
Yanagi, S., Masai, I., Rao, Y., Wu, J.Y.
Roles of Robo endocytic trafficking in
acquisition of axonal responsiveness to
the repellent Slit during midline
crossing. 第46回日本発生生物学会(2013
年5月29日・松江くにびきメッセ)

湯浅-河田純一: 神経回路形成における軸
索反応性の不可逆性スイッチを支える分子
基盤. 2013年度さきがけ研究21「認識と
形成」領域年会(2013年9月14日・愛知県
岡崎・基礎生物学研究所)

河田純一、内海健、康東天: 正中線におけ
る軸索ガイダンスを支える分子基盤. 第
61回日本臨床検査医学会学術集会(2014年
11月25日・福岡国際会議場)

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://camiku.kyushu-u.ac.jp/kawad>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河田 純一 (KAWADA, JUNICHI)

九州大学・先端医療イノベーションセンタ

ー・准教授

研究者番号: 00312207

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし