

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890187

研究課題名(和文) Nogo 受容体アンタゴニスト LOTUS の神経突起伸長作用機構

研究課題名(英文) Mechanism of neurite outgrowth promoting effect of LOTUS, an antagonist for Nogo receptor

研究代表者

栗原 裕司 (KURIHARA, Yuji)

横浜市立大学・生命医科学研究科・特任助教

研究者番号：00634552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000 円、(間接経費) 600,000 円

研究成果の概要(和文)：LOTUSは、中枢神経系の再生を妨害する要因であるNogo receptor-1 (NgR1) のアンタゴニストである。LOTUSの新たな機能として神経突起の伸長作用を発見した。本研究では、LOTUSの神経突起伸長作用に関して解析した。NgR1遺伝子欠損マウスを用いてLOTUSの神経突起伸長作用を媒介する神経細胞側の分子を検討したところ、NgR1以外にLOTUSと相互作用する分子が存在し、LOTUSの神経突起伸長作用は未同定のLOTUS相互作用分子を介することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：LOTUS functions as the antagonist for Nogo receptor-1 (NgR1) which restricts functional recovery after damages to the central nervous system. We found that LOTUS also promotes neurite outgrowth. In this study, I analyzed the promoting effect of LOTUS on neurite outgrowth. Using the neurons from ngr1-deficient mice, I investigated the molecule(s) which mediate the promoting effect of LOTUS on neurite outgrowth. I found that LOTUS interacts with the molecule(s) except for NgR1 and the unidentified LOTUS binding molecule(s) mediate the promoting action of LOTUS on neurite outgrowth.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬理学一般

キーワード：神経科学 突起伸長 シグナル伝達 神経再生

### 1. 研究開始当初の背景

外傷等による脳や脊髄の損傷あるいは神経変性疾患による機能の喪失などに対する神経機能の再建は極めて重要な課題である。このための再生医学研究が世界中で行われ、現在最も注目されている研究の一つに、中枢神経系に存在する神経突起伸長を阻害する因子(神経再生阻害因子)の機能抑制を目指した研究がある。神経再生阻害因子の代表格として、Nogo、myelin-associated glycoprotein(MAG)、oligodendrocyte myelin glycoprotein(OMgp)およびB lymphocyte stimulator(BLyS)の4種がある。これら4種の因子が共通の受容体であるNogoreceptor-1(NgR1)に結合することによって、神経細胞の突起伸長が抑制される。このことから、NgR1は損傷や障害を受けた中枢神経系の再生を妨害する要因であると考えられている。

申請者らは嗅索 lateral olfactory tract (LOT)の形成を担う新規分子 LOT usher substance(LOTUS)を発見した。LOTUSはNgR1に結合し、上記4種全ての神経再生阻害因子のNgR1への結合を阻害し、これらの因子による突起伸長阻害を抑制するNgR1アンタゴニストであることが判明した。またLOTUSのC末端側の2領域(UA/EC)がNgR1に対する結合領域かつ拮抗作用領域であることを明らかにした。一方で、申請者らは、精製LOTUS基質上に網膜神経節細胞を培養したところ、神経突起が著しく伸長することを発見した。このことは、LOTUSの新たな機能として神経突起伸長作用が発見されたことを示す。しかしながら、LOTUSの神経突起伸長作用に関する機構は全くの未知である。

### 2. 研究の目的

本研究では、LOTUSの神経突起伸長作用の分子機構を解明することを目的とした。本研究課題開始に先立って、申請者はLOTUSの神経突起伸長作用を媒介する神経細胞側の分子の同定を試みた。NgR1に対するLOTUSの結合領域(UA/EC)でも同様に神経突起伸長作用が示されたことから、LOTUSの神経突起伸長作用を媒介する分子としてNgR1を予測した。そこで、*ngr1*遺伝子欠損(*ngr1-KO*)マウスの網膜神経節細胞を用いてLOTUSの神経突起伸長作用を解析する研究計画を立案した。また一方で、LOTUSの神経突起伸長作用を媒介する分子がNgR1でない可能性も鑑み、当該分子をスクリーニングすることも含め、本研究計画を立案した。

### 3. 研究の方法

(1) *ngr1-KO* マウスの神経細胞に対するLOTUSの神経突起伸長作用；  
精製LOTUSあるいはUA/ECをコートした培養皿に*ngr1-KO*マウスの網膜神経節細胞を培養し、神経突起の長さを計測した。また、ラミニンをコートした培養皿に*ngr1-KO*マウスの

網膜神経節細胞を培養し、アルカリホスファターゼ(AP)融合の精製LOTUS(AP-LOTUS)を添加して、APの基質を用いてAP-LOTUSとの結合を可視化して、AP-LOTUSの結合度を野生型マウスと比較した。

(2) LOTUSと相互作用する分子のスクリーニング；

*ngr1-KO* マウスの網膜神経節細胞に発現するLOTUS相互作用分子の検討  
ストレプトアビジン結合タンパク質streptavidin-binding protein(SBP)融合のLOTUS(SBP-LOTUS)発現プラスミドを分子生物学的手法により作製し、SBP-LOTUSタンパク質を精製した。*ngr1-KO*マウスの網膜神経節細胞をラミニン基質上に培養し、精製したSBP-LOTUSを添加し結合させ、架橋剤を用いて結合を架橋し、培養した網膜神経節細胞を可溶化した。SBPとの強力な親和性を有するストレプトアビジン樹脂を用いて、LOTUSと相互作用する分子を精製した。その精製産物をSDS-PAGEにより分離し、各バンドを質量分析計によりプロテオミクス解析した。

Neuro2Aに発現するLOTUS相互作用分子の検討

マウス神経芽細胞腫由来の細胞株Neuro2Aをレチノイン酸で処理し、神経分化させた。レチノイン酸で神経分化したNeuro2Aに対して、精製したAP-LOTUSを添加して、APの基質を用いてAP-LOTUSとの結合を可視化して、AP-LOTUSが結合するか否かを検討した。

精製LOTUSをコートした培養皿にレチノイン酸で神経分化したNeuro2Aを培養して、LOTUSが神経突起伸長を誘起するか否かを検討した。SBP-LOTUSを安定的に発現するNeuro2Aを樹立し、レチノイン酸で処理し、神経分化させた。このNeuro2Aに対して架橋剤を用いてSBP-LOTUSの結合を架橋した後、可溶化した。ストレプトアビジン樹脂を用いて、LOTUSと相互作用する分子を精製した。その精製産物をSDS-PAGEにより分離し、各バンドを質量分析計によりプロテオミクス解析した。

### 4. 研究成果

(1) *ngr1-KO* マウスの神経細胞に対するLOTUSの神経突起伸長作用；

精製LOTUSあるいはUA/ECをコートした培養皿に*ngr1-KO*マウスの網膜神経節細胞を培養し、神経突起の長さを計測したところ、神経突起の伸長は野生型マウスとほぼ同様であった(図1)。また、ラミニンをコートした培養皿に培養した*ngr1-KO*マウスの網膜神経節細胞に対して精製AP-LOTUSを添加し、その結合を可視化したところ、AP-LOTUSの結合は野生型マウスにおいてもほぼ同様に示された(図2)。

これらのことから、網膜神経節細胞上にはLOTUSと相互作用する分子がNgR1以外に存在

し、この未同定の LOTUS 相互作用分子が LOTUS の神経突起伸長作用を媒介することが示唆された。LOTUS は、異なった相互作用分子を介して、神経再生阻害因子の拮抗作用と神経突起伸長作用の双方を併せ持つことから、神経再生の促進に奏功することが大いに期待される。

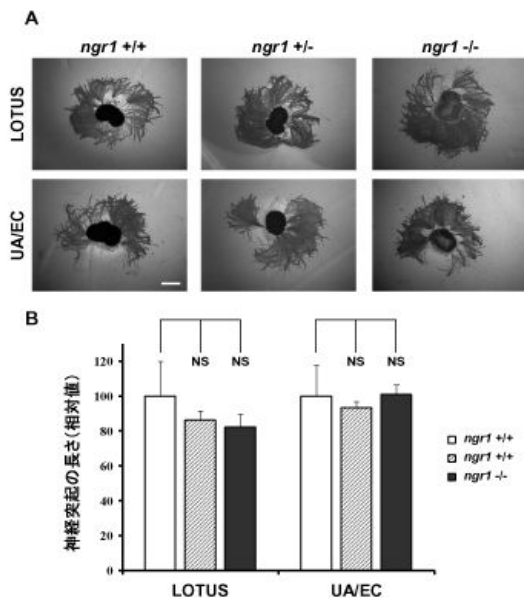


図1 *ngr1*遺伝子欠損マウスの網膜神経節細胞におけるLOTUS、UA/ECの神経突起伸長作用  
A LOTUSあるいはUA/EC基質上に培養した*ngr1*遺伝子欠損マウスの網膜神経節細胞。Scale bar, 200  $\mu$ m。  
B 神経突起の長さの定量化。野生型マウスの神経突起の長さを100とし、その相対値でそれぞれ示した。

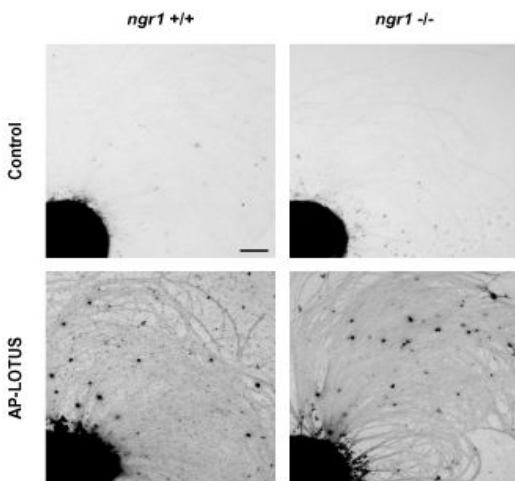


図2 ラミニン基質上に培養し、LOTUSと結合させた*ngr1*遺伝子欠損マウスの網膜神経節細胞。Scale bar, 50  $\mu$ m。

(2) LOTUS と相互作用する分子のスクリーニング;

*ngr1*-KO マウスの網膜神経節細胞に発現する LOTUS 相互作用分子の検討  
*ngr1*-KO マウスの網膜神経節細胞をラミニン

基質上に培養し、精製した SBP-LOTUS を添加し結合させ、架橋剤を用いて結合を架橋し、培養した網膜神経節細胞を可溶化した。ストレプトアビジン樹脂を用いて、LOTUS と相互作用する分子を精製し、その精製産物を SDS-PAGE により分離し、各バンドを質量分析計によりプロテオミクス解析した。

Neuro2A に発現する LOTUS 相互作用分子の検討

レチノイン酸で神経分化させた Neuro2A に対して精製した AP-LOTUS を添加し、その結合を可視化したところ、AP-LOTUS は神経分化 Neuro2A に結合した。さらに、精製 LOTUS をコートした培養皿にレチノイン酸で神経分化した Neuro2A を培養したところ、神経突起伸長が誘起された。これらの結果は、神経分化させた Neuro2A に LOTUS の神経突起伸長作用を媒介する分子が発現および機能していることを示唆する。神経分化させた Neuro2A に発現する当該分子を同定するために、SBP-LOTUS 安定発現株 Neuro2A を樹立した。樹立した SBP-LOTUS 安定発現株 Neuro2A をレチノイン酸で処理し、神経分化させ、架橋剤を用いて SBP-LOTUS の結合を架橋した後で、可溶化した。ストレプトアビジン樹脂を用いて、LOTUS と相互作用する分子を精製した。その精製産物を SDS-PAGE により分離し、各バンドを質量分析計によりプロテオミクス解析した。

現在、これらのスクリーニング法を用いて LOTUS の神経突起伸長作用を媒介する分子を同定するための実験を遂行中である。

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2件)

(1) Iketani M, Iizuka A, Sengoku K, Kurihara Y, Nakamura F, Sasaki Y, Sato Y, Yamane M, Matsushita M, Nairn AC, Takamatsu K, Goshima Y, Takei K. Regulation of neurite outgrowth mediated by localized phosphorylation of protein translational factor eEF2 in growth cones. *Dev. Neurobiol.*, 査読有, 73, 230-246, 2013. DOI: 10.1002/dneu.22058

(2) 栗原 裕司, 竹居 光太郎. LOTUS による神経回路形成機構. *Annual Review 神経* 2013, 査読無, 2013年発行巻, 63-67, 2013.

<http://www.chugaiigaku.jp/item/detail.php?id=1180>

[学会発表](計3件)

(1) 栗原 裕司, 伊藤 拓夢, 池谷 真澄, 五嶋 良郎, 竹居 光太郎. LOTUS の神経突起伸長作用. 第 36 回日本神経科学大会

&第 56 回日本神経化学会大会 京都,  
2013.6.21.

- (2) Kurihara Y, Iketani M, Ito H, Nishiyama K, Sakakibara Y, Goshima Y, Takei K. LOTUS functions as a potent antagonist for Nogo receptor. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry & The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry Kobe, 2012.10.1.
- (3) 栗原 裕司, 池谷 真澄, 伊藤 拓夢, 西山 邦幸, 榊原 裕介, 五嶋 良郎, 竹居 光太郎. Nogo 受容体に対する LOTUS の拮抗作用. 第 35 回日本神経科学大会 名古屋, 2012.9.19.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

栗原 裕司 (KURIHARA Yuji)  
横浜市立大学・  
生命医科学研究科・特任助教  
研究者番号 : 00634552