

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870480

研究課題名(和文) LOTUSによる神経再生阻害受容体PirBの制御

研究課題名(英文) Regulation of PirB, a functional receptor for axonal growth inhibitors, by LOTUS

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系の再生を妨害する要因であるpaired immunoglobulin-like receptor B (PirB) に対するLOTUSの分子機能および生理機能を解析した。LOTUSがPirBと相互作用することを発見し、LOTUS-PirB結合はPirBリガンド分子であるNogoのPirBへの結合を阻害することを明らかにした。Nogoにより誘起される、NgR1欠損マウスの小脳顆粒細胞および後根神経節細胞の神経突起伸長阻害が、精製LOTUSタンパク質の添加によりレスキューされることが判明した。以上の研究成果により、LOTUSがPirBのアンタゴニストとして機能することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：I analyzed the molecular and physiological function of LOTUS to paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) which restricts functional recovery after damages to the central nervous system. I found that LOTUS interacted with PirB. LOTUS overexpressed with PirB in COS7 cells blocked the binding to PirB of Nogo, which is a functional ligand for PirB. Soluble form of LOTUS inhibited Nogo-induced growth cone collapse in cultured dorsal root ganglion neurons and Nogo-induced nerite outgrowth inhibition in cultured cerebellar granule neurons from ngr1-deficient mice. These data suggest that LOTUS functions as an antagonist for PirB.

研究分野：神経薬理学

キーワード：神経科学 神経再生阻害因子 アンタゴニスト 神経再生

1. 研究開始当初の背景

外傷性の脳や脊髄の損傷あるいは神経変性疾患による神経機能の喪失などに対する機能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種が挙げられる。これら4種の因子が共通の受容体である Nogo receptor-1 (NgR1) に結合することによって、神経細胞の成長円錐が崩壊し、突起伸長が阻害される。さらに、これらの神経再生阻害因子のうち Nogo、MAG および OMgp の3種の因子が結合する新たな受容体として Paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) が発見された。これら3因子の PirB への結合は NgR1 と同様に神経細胞の成長円錐を崩壊させ、突起伸長を阻害する。これらことから、NgR1 および PirB 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。しかしながら、NgR1 および PirB の双方の機能を特異的かつ効果的に抑制する物質の報告は全く存在しない。

申請者は、嗅索 Lateral olfactory tract (LOT) の神経回路を形成させる新規分子 LOT usher substance (LOTUS) を発見した。LOTUS は NgR1 に結合し、上記4種の神経再生阻害因子の NgR1 への結合を全て阻害し、これら4因子によって誘起される神経細胞の成長円錐崩壊および突起伸長阻害を全て抑制することから、LOTUS は NgR1 のアンタゴニストであることが判明した。一方で、申請者は、LOTUS と PirB におけるリガンド-受容体結合実験を行ったところ、LOTUS は PirB に結合することを発見した。しかしながら、PirB に対する LOTUS の分子機能および生理機能は全くの未知である。

2. 研究の目的

本研究では、LOTUS による神経再生阻害受容体 PirB の制御法を開発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 結合が、Nogo 等の神経再生阻害因子を受容する PirB の分子機能に及ぼす影響について検討した。Nogo の PirB への結合に対する LOTUS の影響を調べたところ、PirB 単独を強制発現させた COS7 細胞に Nogo は結合するが、LOTUS および PirB の両者を強制発現させた COS7 細胞には Nogo はほとんど結合しないことを見出した。そこで、PirB の成長円錐崩壊作用および突起伸長阻害作用に対する LOTUS の機能を解析する研究計画を立案した。

3. 研究の方法

(1) LOTUS-PirB 相互作用の検討;

COS7 細胞に PirB を強制発現させ、Fc および Streptavidin-binding protein (SBP) を融合させた LOTUS (LOTUS-Fc-SBP) の精製タンパク質を添加し固定し、抗 SBP 抗体を用いて PirB に結合した LOTUS-Fc-SBP を検出した。種々の精製 LOTUS-Fc-SBP タンパク質濃度において上記結合実験を行い、LOTUS-Fc-SBP と PirB との結合を定量化した。結合曲線および Scatchard plot 解析から、LOTUS-Fc-SBP と PirB との結合親和性を求めた。

LOTUS と PirB との結合を更に検証するため、SBP および FLAG タグを融合した LOTUS (SBP-FLAG-LOTUS) および HA タグを融合した PirB (HA-PirB) の両者を強制発現させた COS7 細胞に対してストレプトアビジン樹脂を用いて共沈降実験を行った。

(2) Nogo-PirB 結合に対する LOTUS の分子機能の検討;

COS7 細胞に LOTUS および PirB の両者を強制発現させ、SBP および alkaline phosphatase (AP) を融合させた Nogo (SBP-AP-Nogo) 精製タンパク質を添加し固定し、AP 基質を用いて SBP-AP-Nogo 結合を可視化・定量化した。

(3) PirB の成長円錐崩壊作用および突起伸長阻害作用に対する LOTUS の生理機能の検討;

PirB を高発現するマウス後根神経節細胞およびマウス小脳顆粒細胞は Nogo 等の神経再生阻害因子により成長円錐が崩壊し、神経突起伸長が阻害される。しかし、これら神経細胞は PirB と同じリガンド分子を受容し、同様な機能を有する NgR1 も発現しており、LOTUS が NgR1 拮抗作用を有することから、PirB に対する拮抗作用を特定化できない。そこで、本研究では *ngr1* 遺伝子欠損 (*ngr1*-KO) マウスの後根神経節細胞および小脳顆粒細胞を使用して、PirB に対する LOTUS の生理機能を解析した。

培養した *ngr1*-KO マウスの後根神経節細胞に精製 LOTUS-Fc-SBP タンパク質を添加し、精製 Nogo タンパク質を添加し固定した。固定した後根神経節細胞をファロイジンで染色し、成長円錐を可視化した。成長円錐の形態を観察し、その崩壊の割合を定量した。また一方で、*ngr1*-KO マウスの小脳顆粒細胞を Nogo 基質上に播種し、精製 LOTUS-Fc-SBP タンパク質を添加し培養した。培養した小脳顆粒細胞を固定し、抗-tubulin 抗体で免疫染色することにより神経突起を可視化し、神経突起の長さを計測した。

4. 研究成果

(1) LOTUS-PirB 相互作用の解析;

PirB を強制発現させた COS7 細胞に精製

LOTUS-Fc-SBP タンパク質を添加し、その結合の検出を試みたところ、LOTUS-Fc-SBP は PirB に結合した (図 1A)。次に、LOTUS-Fc-SBP の PirB に対する結合曲線および Scatchard plot 解析から、LOTUS-Fc-SBP と PirB との結合解離定数は約 200 nM と算出された (図 1B)。さらに、SBP-FLAG-LOTUS および HA-PirB の両者を強制発現させた COS7 細胞に対するストレプトアビジン樹脂を用いた沈降産物中に HA-PirB が検出された (図 1C)。これらのことから、LOTUS は PirB と相互作用することが明らかとなった。

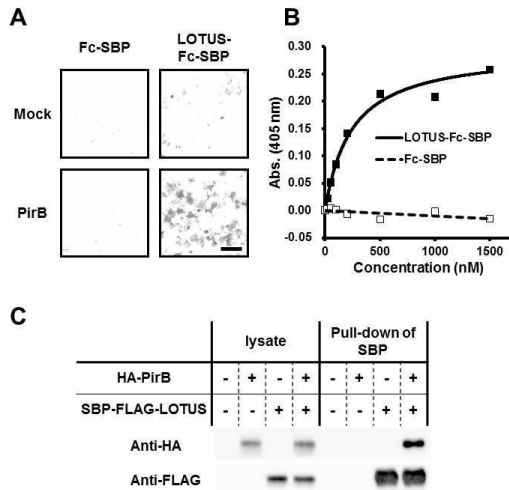


図1 LOTUSはPirBと相互作用する
 A COS7細胞に強制発現させたPirBに対する精製LOTUS-Fc-SBPタンパク質の結合実験。Scale bar, 200 μ m。
 B COS7細胞に強制発現させたPirBに対する精製LOTUS-Fc-SBPタンパク質の結合曲線。
 C SBP-FLAG-LOTUSおよびHA-PirBの両者を強制発現させたCOS7細胞に対する共沈降実験。

(2) Nogo-PirB 結合に対する LOTUS の分子機能の解析 ;

LOTUS および PirB の両者を強制発現させた COS7 細胞に精製 SBP-AP-Nogo タンパク質を添加し、その結合の検出を試みた。その結果、PirB 単独を強制発現させた COS7 細胞には SBP-AP-Nogo は結合するが、LOTUS および PirB の両者を強制発現させた COS7 細胞には SBP-AP-Nogo はほとんど結合しなかった (図 2)。このことから、

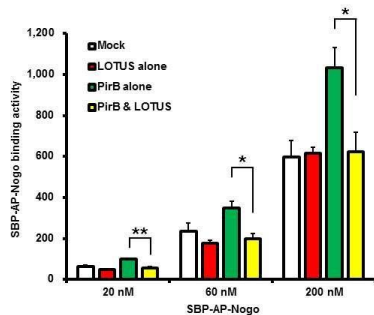


図2 LOTUSはNogo-PirB結合を阻害する
 LOTUSおよびPirBの両者を強制発現させたCOS7細胞に対するSBP-AP-Nogo結合の定量化グラフ。
 n = 4. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$ (one-way ANOVA)。

LOTUS は Nogo の PirB に対する結合を阻害することが判明した。

(3) PirB の成長円錐崩壊作用および突起伸長阻害作用に対する LOTUS の生理機能の解析 ;

培養した *ngr1*-KO マウスの後根神経節細胞に精製 LOTUS-Fc-SBP タンパク質および精製 Nogo タンパク質を添加し、成長円錐の形態を観察したところ、精製 Nogo タンパク質により誘起された成長円錐崩壊が、精製 LOTUS-Fc-SBP タンパク質の添加により抑制された (図 3A)。また一方で、精製 LOTUS-Fc-SBP タンパク質を添加し、Nogo 基質上に培養した *ngr1*-KO マウスの小脳顆粒細胞の神経突起の長さを計測したところ、Nogo の作用により阻害された神経突起伸長が精製 LOTUS-Fc-SBP タンパク質の添加により抑制された (図 3B)。これらのことから、LOTUS は Nogo による成長円錐崩壊作用および神経突起伸長阻害作用をレスキューすることが明らかとなった。

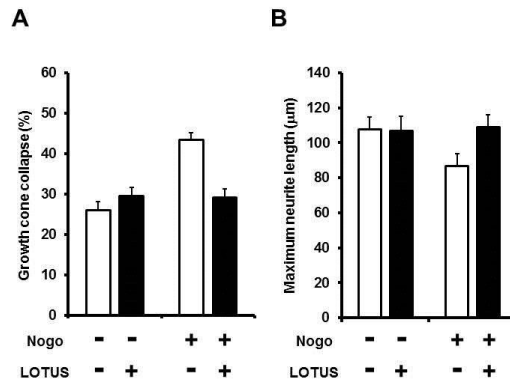


図3 LOTUSはNogoにより誘起される成長円錐崩壊作用および神経突起伸長阻害作用を抑制する

A *ngr1*欠損マウスの後根神経節細胞におけるNogoによる成長円錐崩壊作用に対する精製LOTUSタンパク質の抑制効果の定量化グラフ。
 B *ngr1*欠損マウスの小脳顆粒細胞におけるNogoによる神経突起伸長阻害作用に対する精製LOTUSタンパク質の抑制効果の定量化グラフ。

以上の研究成果により、LOTUS が PirB のアンタゴニストとして機能することが示唆された。現在、Nogo による成長円錐崩壊作用および神経突起伸長阻害作用が、後根神経節細胞および小脳顆粒細胞に発現する PirB を媒介しているか否かについて、RNAi 法による PirB ノックダウン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3件)

(1) Kurihara Y, Takei K. LOTUS, a potent blocker of Nogo receptor-1 causing inhibition of axonal growth. *Neural Regen Res.*, 査読有, 10, 46-48, 2015.

DOI: 10.4103/1673-5374.150652.

- (2) Takahashi K, Kurihara Y, Suzuki Y, Goshima Y, Tanaka F, Takei K. Association of cerebrospinal fluid levels of lateral olfactory tract usher substance (LOTUS) with disease activity in multiple sclerosis. JAMA Neurol., 査読有, 72, 176-179, 2015.
DOI: 10.1001/jamaneurol.2014.3613.
- (3) Kurihara Y, Iketani M, Ito H, Nishiyama K, Sakakibara Y, Goshima Y, Takei K. LOTUS suppresses axon growth inhibition by blocking interaction between Nogo receptor-1 and all four types of its ligand. Mol Cell Neurosci., 査読有, 61, 211-218, 2014.
DOI: 10.1016/j.mcn.2014.07.001.

〔学会発表〕(計1件)

- (1) 栗原 裕司, 齋藤 優, 竹居 光太郎. LOTUS はコンドロイチン硫酸プロテオグリカンにより誘起される軸索伸長阻害を抑制する. 第37回日本神経科学大会横浜, 2014.9.13.

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