

神経回路形成における細胞周期制御因子の新しい機能

研究代表者： 小西 慶幸（工学研究科・准教授）

概 要	
	細胞周期の制御因子である分裂後期促進因子（Cdh1-APC）は、分化後の神経細胞においても機能を持ち、軸索の伸長を特異的に制御する。本研究課題では Cdh1-APC が神経細胞において軸索という特定の細胞形態を制御する機構を明らかにする。細胞内で位置情報を担う要因として微小管の翻訳後修飾の関与を仮定し、これによって Cdh1-APC の下流因子が選択的に軸索に局在する可能性の検証を試みる。今期は、小脳の顆粒細胞の低密度培養とイメージングの解析系を立ち上げ、顆粒細胞において微小管修飾に依存した軸索への選択的輸送機構が存在することを示した。また、Cdh1-APC の下流で誘導される分子のうち、軸索に局在する分子が存在することを観察した。今後、これらの因子の局在が微小管修飾に依存することを示し、その分子機構と脳回路形成における機能を明らかにする。
関連キーワード	軸索、樹状突起、細胞周期、シグナル伝達、微小管

研究の背景および目的

軸索伸長制御における Cdh1-APC の機能は小脳顆粒細胞を用いて明らかにしてきたため、本研究では引き続き小脳顆粒細胞を用いて解析を進めることにした。一方、微小管修飾を介した軸索への局在制御は海馬錐体細胞を用いた解析により報告をしている。これは Banker らによって海馬錐体細胞の低密度が確立され、この細胞を用いて神経極性の制御や軸索への輸送特性などの解析が進んできたことによる。申請者の仮説を検証するために、

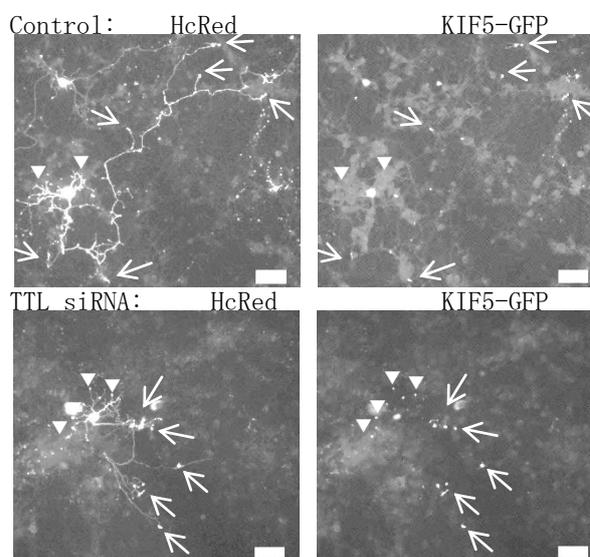
本研究課題では以下項目を具体的な目的とし実験を行った。(1) 小脳顆粒細胞においても低密度での培養を確立し、軸索や樹状突起への分子局在を解析する系を確立する。(2) 小脳顆粒細胞においても微小管修飾（チロシン化）に依存して軸索への輸送が制御されることを示す。(3) Cdh1-APC の下流で制御される因子のうち、軸索に局在する分子を同定する。

研究の内容および成果

(1) 小脳顆粒細胞は高密度で培養することで軸索や樹状突起を伸長させ、長期間安定的に生存させることが可能である。生後 5 日のマウス小脳から顆粒細胞を調整し、低密度（~4000 個/cm²）で培養を行った。この密度では数日で細胞は死滅してしまうが、フィーダー細胞として高密度の顆粒細胞自身、または生後 1 日のマウス大脳皮質から調整したアストロサイトと向かい合わせに共培養することで、維持することが可能になった。軸索と樹状突起のマーカーである Tau1 抗体と MAP2 抗体により免疫染色を行った結果、低密度で培養した顆粒は 1 本の軸索と樹状突起を形成し、正しく極性を形成することが確認された。

(2) 海馬錐体細胞においては、キネシンのモーター領域に GFP 蛍光タンパク質を融合した分子（KIF5-GFP）はキネシンの軸索認識の機構により軸索に特異的に輸送される。顆粒細胞（7DIV）における KIF5-GFP の局在を解析した結果、海馬錐体細胞と同様に軸索の先端に特異的に局在が確認された。さらに、微小管チロシン化酵素である TTL の siRNA を細胞に導入し、微小管修飾を阻害する

ことで、軸索のみに観察された KIF5-GFP のシグナルが樹状突起にも検出された（図 1）。このこと



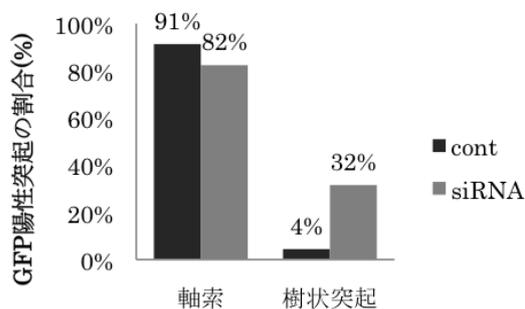


図1: TTL 阻害による顆粒細胞内の KIF5-GFP の局在変化 (スケール:20 μ m)

から、微小管のチロシン化による翻訳後修飾は海馬錐体神経細胞のみならず小脳顆粒細胞においてもキネシンの輸送方向の制御を介して軸索への特異的な物質輸送に寄与していることが示唆された。

(3) これまでの研究で、Cdh1-APC は核内において転写因子 SnoN のユビキチン化-タンパク質分解を介して転写を制御し、軸索の伸長を抑制することが明らかとなっている。Ikeuchi らにより、DNA マイクロアレイを用いて小脳顆粒細胞における SnoN の標的因子の探索がなされた。SnoN の抑制により半分以上に発現が減少した 8 遺伝子のうち、細胞骨格や細胞接着への関与が示唆される 4 因子 (Tropomyosin1, Tropomyosin3, Ccd1, Talin1) を Cdh1-APC-SnoN の下流で直接的に軸索形態を制御する因子の候補とし、これらの因子が軸索に局在するか否かについて確認を行った。Tropomyosin1, 3 については Iowa 大学のハイブリドーマバンクから抗体を入手し免疫染色を行った。Ccd1, Talin1 については Harvard 大学 Bonni 博士、Leicester 大学 Critchley 博士との共同研究として GFP 融合タンパク質の発現ベクターを入手した。低密度で培養した顆粒細胞において Tropomyosin1, Tropomyosin3 の免疫染色を行っ

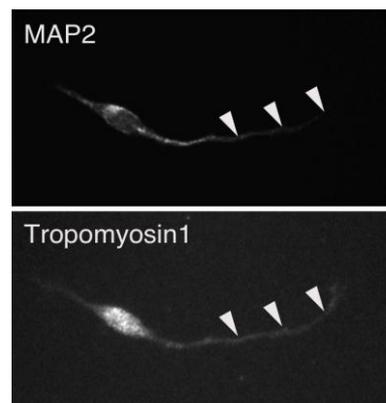


図2: 培養2日目の Tropomyosin1 の免疫染色。矢尻は軸索を示す。

たところ、Tropomyosin3 は神経細胞において発現が弱かったが、Tropomyosin1 は神経細胞の軸索に局在が観察された (図2)。

また、GFP-Ccd1 を発現した顆粒細胞でその蛍光シグナルの分布を観察した結果、突起を伸長しはじめた神経細胞において軸索の先端に局在が観察された。より形態形成の進んだ神経細胞では樹状突起にもシグナルが観察され、極性の確立、軸索の形成が行われる初期の神経細胞で一過的に軸索に局在する可能性が示唆された。GFP-Talin1 は細胞全体に分布が観察された。これまでの研究で、本研究課題を遂行するための実験系を確立し、微小管修飾を介した軸索輸送制御の普遍性を示すことができた。また、Cdh1-APC の下流因子のうち少なくとも Tropomyosin1 および Ccd1 は軸索に局在することが示され、これらの因子が局所的に神経突起の形態を制御する可能性が示唆された。今後これら Cdh1-APC 下流因子の局在解析を継続すると共に、微小管の修飾に依存して細胞内局在が変化するか否かを解析する予定である。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Yang H, Sugiura Y, Ikegami K, Konishi Y, Setou M. Axonal gradient of arachidonic acid-containing phosphatidylcholine. *J Biol Chem.* 287(8):5290-300 (2012)

「特記事項」

(学会発表) 小西慶幸. 軸索形態制御に関わる翻訳後修飾を介した細胞内分子機構: 軸索伸長および軸索識別についての研究. 第54回日本神経化学学会大会 2011/9/26-28 石川

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

内藤記念科学奨励金・平成23年度・代表・採択・3,000千円
 稲盛財団研究助成・平成24年度・代表・採択・1,000千円
 科学研究費補助事業 新学術領域研究 (公募研究) ・平成24-25年度・代表・申請中
 科学研究費補助事業 基盤研究 (B) 平成24-25年度・分担・申請中