

I 神経回路構築におけるアクチン足場蛋白質の選択的スプライシングの時空間制御機構の解明

Regulatory mechanisms underlying the spatio-temporal production of alternative splicing variants of the actin-binding scaffold molecules during brain development

生沼泉
Oinuma, I.

アクチン細胞骨格の再構成は神経細胞の発達過程において重要な役割を果たしている。発達過程の大脳皮質内において、神経軸索は決められた時期に決められた場所で分枝形成することで、的確な神経回路を形成しており、分枝形成の制御は神経機能発揮に極めて重要である。軸索分枝形成のメカニズムの研究が盛んに行われ、アクチン細胞骨格依存的な軸索分枝形成を担う数々の因子が同定されている。しかしながら、神経発達期に時期・部位特異的に軸索分枝を形成するメカニズムの説明には至っていない。われわれは、「細胞をとりまく場」あるいは「細胞内」の変化によって駆動されるアクチン足場蛋白質の選択的スプライシングの時空間的制御を想定し、その機構の解明並びに可視化と操作を行うことを目的として研究を進めている。

高次脳機能の発現には、神経細胞が生まれた後、標的細胞を認識して周辺の場の様々な誘引性・反発性の誘導（ガイダンス）因子に応答し、ダイナミックに突起の伸長・退縮を繰り返しつつ的確な標的細胞とシナプス形成する必要がある。これまでの研究で、軸索ガイダンス因子の細胞内情報伝達機構を解明し、低分子量 G 蛋白質の 1 つ、R-Ras の活性が様々な外界因子の駆動で共通に制御され、R-Ras の軸索内での活性制御が軸索の動的形態制御において普遍的役割を果たしていることが明らかになっている。また、R-Ras の結合分子として、PI3-kinase (*J. Cell Biol.*, 2006, *J. Biol. Chem.*, 2007) やアクチン抗キャッピングタンパク質 Ena/VASP のリガンドタンパク質である Lamellipodin (*J. Neurosci.*, 2012)、そしてアクチン足場蛋白質である afadin を同定しており (*MBoC*, 2012)、そのうち、afadin は、初代培養大脳皮質神経細胞において、その C 末端の F-actin 結合ドメインを介し、軸索分枝形成を担う。

最近の誌上成果で、afadin の選択的スプライシングが、神経細胞発達過程で変化しており、さらに、短いバリエーション (S 体) が長いバリエーション (L 体) に対してドミナントネガティブ体として働くことで、L 体の細胞膜での集積によるアクチン重合足場形成を阻害するという報告をした (*MBoC*, 2015)。それを踏まえ、「選択的スプライシングが

脳構築の場で時空間的に制御され、afadin の各アイソフォームの発現が制御されることで、的確な神経分化・神経回路形成を引き起こされている」という新奇システムの存在を想定し、その機構の解明並びに可視化と操作を目的として研究を進めている。

平成28年度の研究で、マウス大脳皮質 2/3 層神経細胞の発達過程で、S 体の発現量が適切に制御されることが的確な脳神経回路の構築に必要であるということを示した。マウス大脳皮質において、発達時期普遍的に発現している L 体に対し、内在性の S 体タンパク質の発現量は胎生期には低く抑えられており、出生後に急峻に発現が増加する。そこで、胎生期から CAG プロモーター下で S 体を過剰発現させることで、脳梁軸索の脱束化、対側皮質内での層特異的な分枝の抑制等が観察された。現在、この異常の原因について、ガイドランス因子などの細胞外因子や、軸索間の細胞接着因子との関係性の観点から検証を進めるとともに、S 体の発現のタイミング制御メカニズムの解析も行っている。

II SUMO 修飾による核ラミナの機能調節機構

Regulation of nuclear lamina dynamics by SUMOylation

廣瀬富美子
Hirose, F.

核膜の裏側に存在する核ラミナは A-type lamin (lamin A/C) と B-type lamin (lamin B) タンパク質が重合した網目状の繊維構造である。核ラミナは、核膜とクロマチンの両者と相互作用し、転写・DNA 複製・DNA 修復など多岐にわたる核内反応の調節に関わっている。なかでも、核膜直下でのヘテロクロマチンの形成に深く関わっていることが知られているが、これに関わる因子やその制御メカニズムについては、解明されていない。我々はこの問題を解決するために、核ラミナとクロマチンの相互作用に関わる因子の同定を試みている。核ラミナは細胞分裂のたびに崩壊と再構築を繰り返す。我々は、核ラミナとクロマチンとの特異的な相互作用は、核ラミナの構築と分裂期染色体の脱凝縮が起こる分裂期終盤に起こるであろうと想定し、この時期に lamin A と相互作用する因子を検索している。

まず、核ラミナや核膜の構築をドミナントネガティブに阻害する lamin A 変異体の作成を行った。作成した変異体のうちのひとつ (SIM3 変異体) は lamin A の C 末端近くに存在する SUMO interacting motif (SIM) コンセンサス様配列内の 2 つのアミノ酸置換変異体であった。SIM は、SUMO (small ubiquitin-like modifier) タンパク質が、標

的タンパク質のリジン残基の側鎖にイソペプチド結合によって付加された状態 (SUMO 化) を認識して結合する疎水性の短いアミノ酸配列である。SIM3 変異体を発現させた細胞では、分裂期終期における lamin A の脱リン酸化が遅延し、その後の核ラミナの再構築の破たんや核の形態異常が起こった。そこで、lamin A の SIM 様配列と相互作用する SUMO 化タンパク質を探索し、候補因子としてセリンスレオニン型脱リン酸化酵素である PP1 γ /RepoMan 複合体を見出した。

平成 28 年度の研究では、RepoMan/PP1 γ と lamin A の相互作用が SUMO-SIM 相互作用を介したものであるかどうかを、SUMO-SIM 相互作用をドミナントネガティブに阻害する SUMO 変異体や SUMO 修飾が起こらなくなる PP1 γ /RepoMan 変異体を用いて検証した。また、FRET 法を利用して細胞内での RepoMan/PP1 γ と lamin A の相互作用の時空間的な解析も行った。これらの実験から、RepoMan/PP1 γ は SUMO-SIM 相互作用を介して lamin A を分裂期終期の染色体上にリクルートし、lamin A の M 期特異的なリン酸化を除く脱リン酸化酵素として働くことを明らかにした。今後は、核膜直下でヘテロクロマチンが形成される G1 期初期の細胞に焦点をあて、ヘテロクロマチンの形成に関わる lamin A の相互作用因子を探索していく予定である。

発表論文 List of Publications

- I-1 Izumi Oinuma: Live-cell imaging and functional analysis of endogenous neuronal proteins by CRISPR-Cas9-mediated genome editing. 平成 28 年度日本生化学会大会 シンポジウム (平成 28 年 9 月、仙台)
- II-1 Yamashita D, Moriuchi T, Osumi T and Hirose F.: Transcription Factor hDREF Is a Novel SUMO E3 Ligase of Mi2 α . J Biol Chem. doi: 10.1074/jbc.M115.713370. (2016)
- II-2 森内昂文、長栄良平、木藤健太、廣瀬富美子: RepoMan/PP1 γ 複合体は分裂期終期における lamin A の脱リン酸化に関わる。第 39 回日本分子生物学会年会 ポスター発表 (平成 28 年 12 月、横浜)
- II-3 木藤健太、森内昂文、廣瀬富美子: 有糸分裂期における RepoMan の SUMO 化の解析。第 39 回日本分子生物学会年会 ポスター発表 (平成 28 年 12 月、横浜)

科学研究費補助金等

1. 科学研究費助成事業 (挑戦的萌芽) (平成 26-28 年度)
研究課題 新奇セマフォリン受容体阻害剤による中枢神経再生能賦活化への挑戦
研究代表者 生沼 泉

2. 兵庫県立大学特別研究助成金 若手研究者研究支援（平成 28 年度）
研究課題 幹細胞移植に依らずに損傷中枢神経繊維の機能的再生を可能とする新技術の開発
研究代表者 生沼 泉
3. 研究助成金 公益財団法人 中島記念国際交流財団 若手研究者研究助成金（平成 28 年度）
研究課題 哺乳類中枢神経系における内在性蛋白質の標識および活性操作システムの開発
研究代表者 生沼 泉
4. 研究助成金 公益財団法人 武田科学振興財団 薬学系研究奨励（平成 28~29 年度）
研究課題 低分子量 G 蛋白質 R-Ras によるガイダンスシグナル統合のメカニズムの解明
研究代表者 生沼 泉
5. 科学研究費助成事業（基盤 C）（平成 27-29 年度）
研究課題 分裂期染色体上に存在する lamin A 相互作用因子の同定
研究代表者 廣瀬 富美子