

I 脳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の生理的意義の解明

Elucidation of physiological roles for the spatiotemporal 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。

われわれの最近の誌上成果で、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、短いバリエント (S 体) が長いバリエント (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。昨年度までの研究で、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確認した。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。

平成 29 年度の研究では内在性の S 体および L 体のノックダウン実験を行った。まず、S 体を特異的に認識するウサギペプチド抗体を作成し、大脳皮質組織内および初代培養神経細胞内の S 体の局在を調べた。その結果、大脳皮質内において、時期・部位普遍的に発現している L 体に対し、S 体は 2/3 層の神経細胞に高発現していた。また、培養神経細胞内における局在も大きく異なっており、時期普遍的に軸索先端に局在が見られる L 体に対して、S 体の神経細胞内局在は軸索発達過程初期のステージ 2～3 初期には軸索先端部には見られず、ステージ 3 晩期からステージ 4 初期の時期にかけて次第に先端部に集積していった。さらに、L 体および S 体を生じる選択的スプライシングを可視化するレポータープラスミドを作製し、培養神経において各アイソフォームが産生されるタイミングを調べたところ、L 体を産生するスプライシングが培養初期から観察されたのに対し、S 体を産生するスプライシングはそれより遅れて、培養 3 日目以降に観察された。これらのデータは、S 体の発現量や局在が時空間的にダイナミックに制御されていることを示している。大脳皮質 2/3 層由来の脳梁軸索は、生後 3 日目 (P3) までの間に束化した状態で脳梁を通過し、その後、生後 7 日 (P7)～9 日 (P9) の間に、束化をゆるめ、皮質表層部へ上行することにより皮質内の投射を行うという、ダイナミックな形態変化や軸索の方向性の転換を特徴とする。L 体のノックダウンにより P3 で脳梁軸索の脱束化が引き起こされ、内在性の L 体が軸索の束化を正に制御することが明らかになった。逆に、S 体のノックダウンは P7～P9 で必要な軸索の脱束化が阻害され、皮質内投射が著しく減少した。以上の結果から、大脳皮質神経回路構築において、アクチン足場蛋白質 afadin の選択的スプライシングが適切な時期・場所で起こることが的確な神経回路構築を担うことが示唆された。

今後、afadin で制御される軸索束化の分子メカニズムについて、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、皮質脊髄路、前交連、視床皮質路などといった的確な場所での束化と脱束化が顕著な他の神経投射経路についても解析し、afadin が担う軸索束化のメカニズムの普遍性を検証する。

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 29 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。

最近、RepoMan/PP1 γ が分裂期の終わりに特定のヒストンコードを認識して特定のクロマチン領域に結合し、このことが核膜直下のヘテロクロマチンの形成に深く関わっ

ていることが報告された。一方、我々は lamin A が核膜直下のヘテロクロマチン形成に関与することを示す予備的な証拠を得ている。今後は、分裂期の終わりに起こるヘテロクロマチンの核膜直下への再配置の分子機構を明らかにするつもりである。平成29年度は、そのための実験系の準備を行った。具体的には、ヘテロクロマチンと lamin A の核内ダイナミクスを追跡するための蛍光たんぱく質を利用したライブセルイメージングの系を立ち上げた。さらに、lamin A とヘテロクロマチンの相互作用を解析するための FRET 解析の系を立ち上げた。今後は、この2つの実験系を利用して、核膜直下へのヘテロクロマチンの再配置に関わる lamin A の役割と機能を明らかにしていく予定である。

Ⅲ 神経発達・回路形成を担うアクチン足場蛋白質の選択的スプライシング制御機構の分子基盤の解明

The molecular mechanism of the alternative splicing regulation of the actin-binding scaffold proteins in neural development and circuit formation

北川宏信
Kitagawa, H.

脳神経系の発達において、選択的スプライシングは複雑かつ緻密な神経回路のネットワーク形成に不可欠であり、組織・細胞や発達時期によって厳密にコントロールされている。このスプライシング機構の破綻は様々な脳発達異常や神経疾患の発症に関与しているため、その制御メカニズムを解明することは重要な課題である。神経系で選択的スプライシングが盛んなタンパク質であるイオンチャネルや細胞接着分子に関して数多くの研究が蓄積されているが、神経細胞の形態形成を直接担う細胞骨格制御分子に関する研究については萌芽的段階である。アクチン足場蛋白質 afadin は選択的スプライシング制御により、長いバリエーション (l-afadin) と短いバリエーション (s-afadin) を生成し、神経細胞の軸索分岐に対してそれぞれ正と負の制御をすることが明らかにされている。発現パターンに着目すると、l-afadin は組織広範に発現している一方で、s-afadin は脳・神経細胞特異的に発現している。また、大脳皮質の培養神経細胞において、l-afadin は培養初期から普遍的に発現しているが、s-afadin は培養3日目から発現がみられることを見出している。このように、s-afadin は組織特異的かつ発達時期特異的な発現を示すが、この時空間的な発現パターンがどのように制御されるのか、また神経回路の形成に果たす役割は不明である。そこで、我々は s-afadin の発現及びスプライシング制御に関連する因子と制御メカニズムを解明し、神経発達や回路形成における機能的意義を解明する目的に研究を進めている。

平成29年度の研究では、s-afadinの選択的スプライシング制御因子を同定するために、既知の遺伝子データベースから神経細胞特異的に発現するRNA結合タンパク質に焦点を当て、候補遺伝子を18遺伝子まで絞り込んだ。さらに、神経芽細胞腫 Neuro2a細胞は分化レベルに関わらずs-afadinが恒常的に発現している事を見出し、RT-PCR法により Neuro2a細胞及びマウス大脳皮質で共通して発現する遺伝子を探索し、候補遺伝子をさらに10遺伝子まで絞り込んだ。そして、この10遺伝子の過剰発現ベクター及びshRNAによるノックダウンベクターを作製した。今後は、これらのベクターを Neuro2a細胞に遺伝子導入し、Western blot法やRT-PCR法でs-afadinの発現変化を検出することで、候補遺伝子の中からs-afadinの発現制御を担うキーファクターを同定する。そして初代培養神経細胞及び生体マウスを用いて、同定した遺伝子が大脳皮質の神経回路構築にどのような役割を果たすかを調べていく。また、s-afadinのスプライシング機構の上流シグナルにも着目する予定である。そのため準備段階として、マウス胚性腫瘍細胞 EC細胞の神経細胞への分化誘導系を立ち上げ、分化誘導したP19細胞とマウス初代培養神経細胞と比較したところ、発達段階に伴うs-afadinの発現パターンが類似していることを見出した。この実験系を活用し、s-afadinの組織特異的・発達段階依存的な選択的スプライシング機構を生み出すメカニズムを明らかにしていく。

発表論文等 List of Publications

- I-1 Daiki Ohama, Takahiko Matsuda, and Izumi Oinuma: Differential regional and subcellular localization patterns of afadin splice variants in the mouse central nervous system. *Brain Res.* 1;1692:74-86. doi: 10.1016/j.brainres.2018.05.004. (2018)
- I-2 岩田彩、松田孝彦、生沼泉：軸索分岐制御因子 afadin のアイソフォームの脳神経系での発現の時空間的差異の検証. 第64回年度日本生化学会大会近畿支部例会一般口頭発表およびポスター発表（平成29年5月、大阪大学豊中キャンパス）
- I-3 名村有紗、松田孝彦、生沼泉：細胞骨格制御因子 afadin の神経特異的スプライスバリエーションの産生機構解明の試み. 第64回年度日本生化学会大会近畿支部例会一般口頭発表およびポスター発表（平成29年5月、大阪大学豊中キャンパス）
- I-4 大浜大揮、生沼泉：軸索形態制御因子 afadin の2つのアイソフォームの大脳皮質神経回路構築における生理機能の解明. 第64回年度日本生化学会大会近畿支部例会一般口頭発表およびポスター発表（平成29年5月、大阪大学豊中キャンパス）
- I-5 生沼泉、大浜大揮：神経回路構築における afadin の選択的スプライシングバリエーションの発現タイミングの制御とその意義. 脳構築における発生時計と場の連携第2回領域会議 口頭発表およびポスター発表（平成29年7月、神戸ニチイ学館）
- I-6 名村有紗、松田孝彦、生沼泉：神経細胞の形態形成を担う afadin の選択的スプラ

イシシングを制御する因子の探索. 第 57 回生命科学夏の学校 ポスター発表 (平成 29 年 9 月、滋賀県白浜荘)

- I-7** 大浜大揮、生沼泉：大脳皮質神経回路構築におけるアクチン足場蛋白質 afadin の 2 つのアイソフォームの発現時期と機能の検証. 第 57 回生命科学夏の学校 ポスター発表 (平成 29 年 9 月、滋賀県白浜荘)
- I-8** 名村有紗、松田孝彦、生沼泉：アクチン足場タンパク質 afadin の 2 つのスプライスバリエーションの発現差異の解析. 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 ポスター発表 (平成 29 年 12 月、神戸国際展示場)
- I-9** 大浜大揮、生沼泉：マウス大脳皮質 2/3 層神経細胞の発達における長短 2 つの afadin アイソフォームの機能差異. 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 ポスター発表および一般口頭発表 (平成 29 年 12 月、神戸国際展示場)
- I-10** 大浜大揮、生沼泉：Spatio-temporal production of alternative splicing variants of an actin-binding scaffold protein afadin is required for callosal circuit formation. International Young Scientists Workshop on Neural Development and Stem Cells. ポスター発表 (平成 29 年 12 月、関西セミナーハウス)
- II-1** 廣瀬富美子：Dephosphorylation of lamin A at the end of mitosis is regulated by SUMOylation. 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 ポスター発表 (平成 29 年 12 月、神戸国際展示場)
- II-2** 長栄良平、廣瀬富美子：Analysis of SUMO interacting motif in the lamin A polypeptide. Leading Program International Symposium 2017. ポスター発表 (平成 29 年 12 月、光都 CAST)
- II-3** 廣瀬富美子：Dephosphorylation of lamin A at the end of mitosis is regulated by RepoMan/PP1 γ . Leading program evaluation conference. ポスター発表 (平成 30 年 3 月、光都 CAST)
- II-4** 河合淳史、廣瀬富美子：Assembly of heterochromatin under the nuclear membrane is determined at the end of mitosis. Leading program evaluation conference. ポスター発表 (平成 30 年 3 月、光都 CAST)

科学研究費補助金等

1. 科学研究費助成事業 (基盤 C) (平成 29-31 年度)
研究課題 低分子量 G 蛋白質 R-Ras によるガイダンス因子シグナル統合の分子機序の解明
研究代表者 生沼 泉

2. 科学研究費助成事業（新学術領域研究）（平成 29-30 年度）
研究課題 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
研究代表者 生沼 泉
3. 研究助成金 公益財団法人 ノバルティス科学振興財団研究奨励金（平成 29 年度）
研究課題 分化後神経細胞への直接的遺伝子治療法確立のための基盤技術開発
研究代表者 生沼 泉
4. 研究助成金 兵庫県立大学特別研究助成金 若手研究者研究支援（平成 29 年度）
研究課題 神経伸長因子の人為的賦活化による中枢神経繊維再生への挑戦
研究代表者 生沼 泉
5. 研究助成金 公益財団法人 ひょうご科学技術協会学術研究助成（平成 29 年度）
研究課題 神経再生医療基盤技術としての、分化後神経細胞での遺伝子置換技法の確立
研究代表者 生沼 泉
6. 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
7. 研究助成金 公益財団法人 双葉電子記念財団自然科学研究助成（平成 29 年度）
研究課題 分化後神経細胞への直接的遺伝子治療法確立のための基盤技術開発
研究代表者 生沼 泉
8. 研究助成金 公益財団法人 加藤記念バイオサイエンス振興財団研究助成（平成 29-30 年度）
研究課題 分化後神経細胞における遺伝子置換技術の開発
研究代表者 生沼 泉
9. 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