

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。

平成 30 年度の研究では、「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・神経回路形成が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きた。まず、各アイソフォームを分別できるペプチド抗体を作成し、マウス脳内での発現パターンの差異を詳細に検証し、領野・層普遍的に発現している L 体に対し、S 体は皮質 2/3 層の、特に、体性感覚野で強い発現が観察された (*Brain Res.*, 2018)。さらに、大脳皮質 2/3 層の軸索発達過程において *in vivo* で afadin のスプライシングパターンが変化していることを bichromatic-splicing reporter (*Gene.*, 2019) を用いた実験で証明した。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こと、また、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ることから、S 体の発現の量やタイミング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。さらに分子メカニズムの検証を進めた結果、L 体が脳梁軸索の束化に必須であり semaphorin の共受容体 Neuropilin-1(Nrp1) と結合することで束化を担っていることが明らかになった。大脳皮質発達過程において S 体の発現が低い脳梁通過時には L 体、その後急峻な S 体の発現亢進が起こる脳梁通過後には S 体へと Nrp1 の結合相手がダイナミックに変化することで、L 体による軸索束化を S 体が拮抗的に阻害していた。

以上から、アクチン足場分子の選択的スプライシングが脳梁通過までに必要な軸索束化、その後の対側で軸索が上行し皮質内投射するのに必要な脱束化のタイミングを制御することで、脳梁軸索のガイダンスが規定されることが明らかになった。我々は、従来から広く提唱されている、長距離・短距離作動性のガイダンス因子による脳梁軸索の投射制御機構とは全く異なる、個々の軸索内でのアクチン足場蛋白質のバリエーションの発現の時空間制御という、神経細胞内因性のセントラルドグマのレベルでの脳梁軸索ガイダンスの新奇システムを提唱するに至った。

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、ガイダ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。そこで、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。

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。平成 30 年度は、分裂期の終わりから G1 期にかけて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ために、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。また、核ラミナの構成因子であるラミン A をノックダウンし、ヘテロクロマチンの核膜直下への配置に対する影響を調べた結果、ラミン A は分裂期終期から G1 期における核内でのヘテロクロマチンの正しい配置に必要であることが証明し判明した。今後は、生細胞での lamin A とヘテロクロマチンの相互作用を解析する予定である。このために、蛍光たんぱく質を利用した細胞内のたんぱく質因子間相互作用を検出できる Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 解析システムの構築に取りかかった。

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、長いバリエント (*l-afadin*) と短いバリエント (*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30年度の研究では、大脳皮質神経細胞の初代分散培養系をモデルとし、神経損傷後の修復過程における *l-/s-afadin* の発現パターンを解析した。その結果、*l-/s-afadin* の発現はともに、神経損傷に伴う軸索切断が起こると一旦発現がリセットされ、その後の修復過程で、正常な神経発達過程とは異なる時期特異的な発現パターン（発現量・タイミング）を示した。これは、中枢神経系における神経損傷後の神経回路が部分的にしか修復できないことの要因の一つである可能性が考えられ、完全修復のためには、軸索形態を制御する *l-/s-afadin* の発現バランス・タイミングを制御する必要があることを示唆している。さらに、神経細胞間の細胞間接着を物理的に亢進させると *s-afadin* の発現が早期に誘導されたことから、細胞間接着という神経修復のための新たなメカニズムが提唱された。最後に、*s-afadin* の選択的スプライシング制御因子を探索するために、RNA結合タンパク質に焦点を当て、*in silico* スクリーニングと RT-PCR の詳細な解析から候補遺伝子を10個に絞り込むことができた。今後は、これらの発現ベクターを *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し、培養神経細胞を用いて神経発達・修復過程における機能を解明していく。さらに生体マウスを用いて、*in vivo* 大脳皮質神経回路構築における候補遺伝子の役割についても調べていく。

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ント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ント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ントの発現差異の解析．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. 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)
- II-5 河合淳史、廣瀬富美子 : Assembly of heterochromatin under the nuclear membrane is determined at the end of mitosis. ポスター発表 第 41 回分子生物学会年会 (平成 30 年 11 月、パシフィコ横浜)

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術の確立

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 G.L Snider

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
10. 科学研究費助成事業（基盤 C）（平成 30-32 年度）
研究課題 G1 期における核ラミナとヘテロクロマチンの相互作用の解析
研究代表者 廣瀬 富美子
11. 研究助成金 公益財団法人 日本科学協会 笹川科学研究助成（平成 30 年度）
研究課題 哺乳類中枢神経回路の配線原理に基づいた損傷脳領域の機能的回復への挑戦
研究代表者 北川 宏信
12. 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 30 年度）
研究課題 損傷脳機能の革新的な治療戦略につながる神経回路配線の時空間制御メカニズムの解明
研究代表者 北川 宏信
13. 研究助成金 公益財団法人兵庫県立大学科学技術公園財団 教育研究助成（平成 30 年度）
研究課題 中枢神経回路の配線構築における時空間制御メカニズムに基づいた損傷脳機能の画期的回復法の開発
研究代表者 北川 宏信