

神経突起伸展におけるセプチンと微小管翻訳後修飾

名古屋大学大学院 理学研究科 細胞制御学グループ
上田(石原) 奈津実

1. はじめに

胎生期から生後発達期にかけての脳組織でみられるニューロンやグリア細胞の分裂、移動、突起伸展などの現象には微小管やアクチン細胞骨格系による細胞形態と運動の制御が不可欠である。成体脳においてもアクチン細胞骨格系のリモデリングが長期記憶の構造的基盤の一端を担うことが確立している。一方、重合性ヌクレオチド結合蛋白質ファミリーSEPT1-14から成るセプチン細胞骨格系も神経系に大量に存在するが、その生理的意義には不明な点が多い。申請者が所属する木下研究室はセプチン系を中心に細胞骨格系の研究を行っている(Curr Opin Cell Biol 2006, 2008など)。これまでに、マウスでは13種類の遺伝子に由来するセプチンが多様な組み合わせでヘテロオリゴマーを形成すること、微小管、アクチンと相互作用して種々の細胞現象に関与することなどを示してきた。セプチンを最も大量に発現する組織は脳であり、神経やグリアでの機能が当該分野の焦点といえる。しかし、セプチン系の多機能性と機能重複のために、これまでに作製された遺伝子破壊マウスの多くは胎生初期に致死となるか軽微な異常しか示さず、神経系のセプチン細胞骨格の生理機能は不明である。

申請者は、平成21年度まで所属していた東京大学尾藤研究室において、神経活動依存的なCa²⁺/カルモデュリン依存性蛋白質リン酸化酵素(CaMK)の突起伸展制御機構や成熟した神経細胞におけるラフトシグナリング経路を明らかにした(Ageta-Ishihara et al., J Neurosci 2009; Takemoto-Kimura[#], Ageta-Ishihara[#] ([#]equal contribution) et al., Neuron 2007)。この研究過程で*in vitro*(大脳皮質初代培養系など)および*in vivo*(マウス子宮内電気穿孔法を用いたニューロンへの遺伝子導入・可視化系など)の実験系を駆使し、細胞形態と分子局在を精密に定量解析する手法を確立した。このような背景から、申請者はニューロンの形態計測系を駆使して神経細胞の分化過程における細胞骨格系(セプチン、アクチン、微小管)の相互作用を探索する好機を得たといえる。そこで、初代培養系(*in vitro*)とマウス個体レベルの実験系(*in vivo*)を相補的に組み合わせた本研究を遂行することにより、発生期における細胞骨格間の協調作用や制御機構を生理的なコンテキストで理解することを目指した。

2. 方法

① 神経突起形成におけるセプチンの役割は不明である。そこでセプチン複合体の必須サブユニットであるSEPT7に対して作製したshRNA+GFP共発現ベクターを電気穿孔法にてマウス大脳皮質ニューロンに導入し、神経突起の表現型を精査した。

② ①の実験を*in vivo*で再現・検証するため、申請者の先行論文と同様の方法で子宮内電気穿孔法を用いて16日胚の大脳皮質Ⅱ-Ⅲ層の錐体ニューロンのセプチンを欠乏させ、対側皮質への軸索投射を定量解析した。

③ 微小管にはセプチンを含む多様な関連蛋白質群が会合し、構成蛋白質チューブリンもアセチル化やポリグルタミン酸化などの化学的修飾を受けている。微小管の修飾・制御におけるセプチンの役割を探索するため、SEPT7に対して作製したshRNA+GFP共発現ベクターを発現した場合の神経突起内微小管の状態を、関連蛋白質群や修飾微小管の抗体を用いて検討した。*in vitro*の実験を*in vivo*で再現・検証するため、子宮内電気穿孔法を用いて16日胚の大脳皮質Ⅱ-Ⅲ層の錐体ニューロンのセプチンを欠乏させ、微小管の修飾・制御を精査した。

④ ③に関連して、神経突起内微小管のダイナミクス制御におけるセプチンの役割を探索するため、神経細胞にGFP-EB1(微小管結合蛋白質)とSEPT7に対して作製したshRNA+GFP共発現ベクターを発現させ、ライブイメージングによって微小管のダイナミクスを計測し、セプチン欠乏の有無で定量比較した。

3. 結果 研究成果

① セプチン複合体の必須サブユニットSEPT7に対して作製したshRNA+GFP共発現ベクターをマウス大脳皮質ニューロンに導入し、マウス大脳皮質ニューロンの神経突起形成を評価した。結果、SEPT7の欠乏によって、軸索ならびに樹状突起伸展が有意に阻害されることを見出した。

② ①の実験を*in vivo*で再現した結果、セプチンを欠乏させたニューロンの対側皮質への軸索投射が有意に阻害されることを見出した。

③ 微小管の修飾・制御におけるセプチンの役割を探索した結果、*in vitro*ならびに*in vivo*の両実験系でSEPT7欠乏ニューロンにおいて、アセチル化されたalpha-チューブリンが細胞体ならびに神経突起において過剰蓄積していることを見出した。

④ 神経突起内微小管のダイナミクス制御におけるセプチンの役割について微小管結合蛋白質EB1を指標として探索した結果、SEPT7欠乏ニューロンにおいて、微小管のダイナミクスが減弱していることを見出した。

4. まとめ

本研究により、大脳皮質形成の初期発達過程において、セプチンが軸索ならびに樹状突起発達に貢献することを複数の実験系で明らかにした。また、セプチンがチューブリンの脱アセチル化反応を促進し、微小管ダイナミクスを保障することを見出した。

これらの成果は2012年12月現在論文投稿中であり、このような実り多き貴重な研究助成を与えて下さいました組織委員の先生方、ならびに公益財団法人アステラス病態代謝研究会の皆様へ深く感謝し、御礼申し上げます。

5. 参考文献

1. 上田(石原)奈津実, 木下専
セプチン
生化学辞典, in press, 2012
2. Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamiyo S, Fujii H, Mano T, Blaeser F, Chatila TA, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, Okuno H, Bito H.
Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase cascade.
Journal of Neuroscience, 29: 13720–13729, 2009.
3. Barral Y, Kinoshita M.
Structural insights shed light onto septin assemblies and function.
Curr Opin Cell Biol, 20: 12–18, 2008
4. Takemoto-Kimura S[#], Ageta-Ishihara N[#] ([#]equal contribution), Nonaka M, Adachi-Morishima A, Mano T, Okamura M, Fujii H, Fuse T, Hoshino M, Suzuki S, Kojima M, Mishina M, Okuno H, Bito H.
Regulation of dendritogenesis via a lipid raft-associated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI γ .
Neuron, 54: 755–770, 2007.
5. Kinoshita M.
Diversity of septin scaffolds.
Curr Opin Cell Biol, 18: 54–60, 2006.