

新規分子 Shootin1 による神経極性形成機構の解明

鳥山 道則

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞内情報学講座

(伊東 広 教授)

平成 19 年 1 月 29 日 提出

< 目次 >

序論		2
材料と方法		6
結果		16
考察		25
謝辞		35
参考文献		36
図表		41

<序論>

神経細胞は複雑な神経ネットワークの最小の構成単位であり、電気的なシグナル情報の伝達を行う細胞である。我々ヒトをはじめとする高等動物の脳は、膨大な数の神経細胞が複雑かつ正確で規則的なネットワークを構築し正しい情報伝達を行うことにより、記憶、学習、運動などの高次生命現象を生み出し生物個体の生存に必要な不可欠な役割を担っている。

神経細胞の基本的な形態として、細胞体から 1 本の軸索と複数の樹状突起の構造的／機能的に異なる 2 種類の神経突起を伸長させる。樹状突起は他の細胞から神経伝達物質を受け取る「入力」役割を行い、細胞体は核と細胞質が含まれ遺伝情報の保存、遺伝子発現、タンパク質の合成および細胞の生存に必要な代謝を担う。そして、軸索は活動電位を神経末端まで伝達し他の細胞に伝達する「出力」の役割を担っている。このように神経細胞は樹状突起→細胞体→軸索への情報の流れが存在し、この情報の流れに一定の方向性つまり極性を有している。さらに、情報伝達に極性を持たせるため樹状突起側には神経伝達物質に対する受容体などが、逆に軸索側には神経伝達物質の放出などに関与する分子が特異的に局在する。このような分子の非対称的な局在化は細胞の極性に依存しており、軸索／樹状突起の形成に伴い特異的な局在化が生じると考えられている(Winckler et al., 1999; Horton et al 2003)。では、神経細胞が極性を獲得する上で重要な役割を担う 2 種類の神経突起（軸索／樹状突起）の決定機構はどのようなものであろうか？

Banker らグループは、ラット海馬培養神経細胞を用いた解析を古くから行い、軸索／樹状突起の形成機構に関する多くの研究を行ってきた(Goslin et al., 1989)。彼らの実験系では *in vitro* において海馬神経細胞を分散し培養することにより *in vivo* では困難であった細胞の形態変化の観察を容易に行える。加えて、*in vitro* の条件であるため、細胞外の環境を均一に保持できる利点も有している。*in vivo* においては神経細胞のみならず多くの細胞は、他の細胞や細胞外マトリクス、液性因子の濃度勾配などの多くの細胞外環境要因による影響を受けるが、この実験系ではこれらの要因を排除することが可能となる。このように細胞外環境が細胞の各部位において均一な条件下でも、神経細胞は発生に伴い極性を形成し、軸索、樹状突起の決定が行われる(Dotti et al., 1987)。その過程は以下に示す 5 つのステップに分けられている(Craig et al., 1994; Dotti et al., 1988)(図 1)。

まず、神経細胞は基質に接着後、数時間で細胞の辺縁部に Lamellipodia と呼ばれる F-Actin が豊富に存在する構造物を形成する (Stage1)。その後、細胞体

から 3~5 本の短い神経突起を伸長させる (Stage2)。この段階の神経突起は、形態、タンパク質の局在、伸長速度において、すべてきわめて酷似した性質を有している(Goslin et al., 1990)。また、個々の神経突起は伸長と退縮をダイナミックにくり返しており、形態的に対称性を保持している。この段階では、将来どの神経突起が軸索へと分化するかは不明である。つまり、Stage2 の細胞においてはすべての神経突起が将来軸索へと分化する性質を持ち合わせていると予測できる。しかし、そのうちの 1 本のみが急速に伸長し軸索へと分化し形態的な対称性は崩壊する (Stage3)。その後、残りの短い神経突起は軸索ではなく樹状突起へと分化する (Stage4)。そして最後には *in vitro* の環境下においても神経細胞同士がシナプスを形成し軸索/樹状突起の伸長はほぼ終了する (Stage5)。神経細胞における軸索、樹状突起の極性形成は Stage2 から Stage3 へと移行する間に決定されているといえる。神経極性形成の大きな特徴として、単一の神経突起のみが軸索へと分化すること、さらにこの過程は細胞自立的な現象であり、細胞外環境に依存しないことが挙げられる。さらに Banker らは Stage2 から Stage3 の極性形成時の細胞の形態変化を丁寧に観察したところ、Stage2 段階において、ほかの神経突起より約 10 μm 長く伸びた神経突起が軸索へと分化する結果を報告している(Goslin et al., 1989)。これを裏付ける実験として、極性形成後の Stage3 の段階の神経細胞において軸索を切断し、その後の突起伸長の様子を観察したところ、他の突起よりも長く切断した場合には、切断された突起が再び軸索へと分化するが、他の突起と同等もしくはそれ以下の長さで切断した場合には、軸索への分化は神経突起間でランダムに生じることが報告されている。この際も他の突起より 10 μm 以上の長さの差が存在すると、有意に軸索へと分化することが認められている。さらに対照的な実験として、極性形成前の細胞において軸索に分化する前の神経突起を機械的に引っ張ってやると、その突起が軸索へと分化することが示されている(Lamoureux et al., 2002)。これら 2 つの知見は、神経細胞の極性形成 (軸索形成) には突起自体の長さに依存する要因の存在を示唆している(図 2)。

この結果を得て、Andersen らは、極性形成前の Stage2 の神経細胞では、他の突起の伸長に対して阻害的に働くシグナル (Growth inhibitory signal) が存在すること、また自身の突起には促進的に働くシグナル (Self promoting Signal) が存在することを予測している(Anderson et al., 2000)。極性形成前の神経細胞では未成熟な神経突起同士がお互いに軸索への分化を抑制し合い伸長と退縮を繰り返すが、偶発的に他の神経突起よりも 10 μm 長く伸長した神経突起は Growth inhibitory signal と Self promoting Signal を同時に上昇させる。その結果、他の神経突起の伸長を抑制すると同時に、自己の伸長を促進させる Positive feedback loop の存在をモデルとして提唱した(図 3)。このモデルでは、

未成熟な神経突起のうちの1つが伸長し他の神経突起との長さの差が開くことが重要であると考えられる。

神経突起伸長における細胞骨格の再編成

神経突起が伸長するには微小管やアクチンフィラメントなどの細胞骨格系の再編成が重要である(Da silva et al., 2002)。神経突起の先端には成長円錐といわれる構造体が存在し突起伸長に重要な役割を果たしていることが知られている。成長円錐はその外側に Filopodia や Lamellipodia 等の F-Actin が豊富に存在する領域が存在し P-Domain (Peripheral Domain) と呼ばれている。さらにその内側にミトコンドリアや小胞などの細胞内小器官および微小管とその+末端が存在する C-Domain (Central Domain) と呼ばれる領域が存在する。突起伸長や成長円錐の形態変化などは微小管、アクチンフィラメントを重合もしくは脱重合することにより調節されており、当然ながらこれら細胞骨格を調節する分子の多くも成長円錐に局在し機能している。神経突起の伸長時にはアクチンフィラメントの構造変化が生じると同時に微小管の重合が盛んになり微小管のプラス端が C-Domain を超えて、P-Domain に進入するといった報告がなされている。Bradke らは、極性形成前の神経細胞において、最もダイナミックな成長円錐を有する神経突起が軸索へと分化しやすいことを報告している(Bradke et al., 2000)。また、神経突起先端でアクチンの重合阻害剤である Cytochalasin D を作用させると、その神経突起が軸索へ分化することが報告されている(Bradke et al., 1999)。これらのことから、神経突起先端での細胞骨格分子の動体は神経突起伸長および極性形成に重要であると考えられる。

神経突起伸長を制御するシグナル分子

近年、神経極性形成に関与するシグナル伝達機構が明らかになりつつあり、神経極性形成時には突起先端での PI3-Kinase の活性が重要であること多くのグループから報告がなされている(Shi et al., 2003, Banker et al., 2003, Yoshimura et al., 2006)(図 4)。これは、PI3-Kinase の活性型の発現により、複数の軸索の形成が誘導されることや(Yoshimura et al., 2005)、逆に PI3-Kinase の阻害剤の添加により極性形成が抑制されることに挙げられる。PI3-Kinase は細胞膜の構成成分である phosphatidylinositol (4,5) diphosphate (PIP2) にリン酸基を付加する酵素であり、様々な生物種に広く分布している。活性化された PI3-Kinase は突起先端で phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate (PIP3) を産生する。PIP3 はセリン/スレオニンキナーゼである Akt と結合し、Akt の自己リン酸化を経て活性化し下流分子のリン酸化を促進する。神経極性形成時には GSK-3 β が Akt によりリン酸化を受け不活性化する(Shi et al., 2004; Jiang et al.,

2005)。GSK-3 β の下流には CRMP-2 (collapsin response mediator protein-2) が知られており CRMP-2 は非リン酸化状態では Tubulin と結合しその重合を制御することで微小管の伸張を誘導する(Inagaki et al., 2001; Fukata et al., 2002; Arimura et al., 2004)。しかし、GSK-3 β によりリン酸化を受けると Tubulin との結合能を失い、重合活性も消失する。

PIP3 は一方で Rho Family Small GTPase に対するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) と結合し活性化を誘導する(Nishimura et al., 2005)。神経極性時期には、Cdc42、Rac1 が局所的に活性化する一方で RhoA は不活性化されており、それらの下流で機能するアクチンフィラメントや微小管の調節因子の活性を制御することにより細胞骨格系の再編成を担い、突起伸長を制御する(Fukata et al., 2002; Schwamborn et al 2004)。

PI3-Kinase の活性化状態の指標となるリン酸化 Akt や GFP-Akt-PH (GFP と Akt の PHdomain を融合させたもの) を用いた、PI3-Kinase の時空間的な活性を変化の観察によると、その活性は極性形成前の神経細胞では個々の突起先端でダイナミックな局在変化を示している(Menager et al., 2004)。特に伸長時の突起先端では濃縮し、退縮すると突起先端からは消失するといった変化をするが、極性形成後の神経細胞では軸索の先端のみに局在し、他の神経突起先端からは消失する。神経突起の形態だけでなく PI3-Kinase の活性化自体も対称的な分布から非対称的な分布を示す。

PI3-Kinase の活性化とそれに引き続く下流分子の活性化による神経突起伸長に関する知見は数多く得られているが、神経極性形成時における PI3-Kinase の非対称的 (局所的) な活性化に関する機構は不明である。PI3-Kinase は受容体型チロシンキナーゼやそれらと結合したアダプター分子また Ras と結合することにより活性制御がなされている(Yoshimura et al., 2006)。しかしながら先に述べたように、神経極性形成は細胞自立的な現象であり、*in vitro* のような細胞外環境がそれぞれの神経突起間で均等な条件下では受容体からのシグナルも各神経突起間で均一であることが予想できる。したがって、何らかの細胞内因子の働きにより PI3-Kinase の非対称的な活性制御が時空間的になされていると考えられ、神経細胞の極性形成に重要であると考えられるが、これを制御する因子の同定やその機構も不明である。

本研究においては、神経細胞が自立的な極性形成を誘導する分子を新たにスクリーニングすること、および得られた分子の機能解析を行うことで神経細胞の自立的な極性形成機構の解明を目指した。

<材料と方法>

RI 標識 Stage 2/Stage 3 サンプルの調製

胎生 18 日目の Wister 系ラット(日本 SLC)より脳を摘出し、0.4%の Glucose (Sigma) を含む PBS (pH 7.4) 中に集めた。さらに脳より海馬のみを摘出し、0.18% Glucose, 0.1% BSA (Sigma) , 0.0012 % DNase (Sigma) , 0.05% Papain (Nakarai) を含む PBS (pH 7.4) 中で 4 回パスツールピペットによるピペッティングを行った。そのまま 37 °C で 20 分間インキュベートした後、上清を除いて 0.18% Glucose, 0.1% BSA (Sigma) , 0.0012% DNase (Sigma) を含む PBS (pH 7.4) を新たに加えてパスツールピペットによるピペッティングと 37 °C でのインキュベートを 10 分間行った。上清を別のチューブに集め、沈澱している細胞の塊には新たな 0.18% Glucose, 0.1% BSA (Sigma) , 0.0012% DNase (Sigma) を含む PBS (pH 7.4) を加えてパスツールピペットによるピペッティングと 37 °C でのインキュベートをくり返し行い、個々の細胞に分離した。5.0×10⁶ 個の細胞をあらかじめ 1 mg/ml Poly-D-lysine (Sigma) および 50 µl/ml マウスラミニンコートをした 60 mm×15 mm プラスチックディッシュ上で培養した。培養開始より 3 時間は Neurobasal Medium (Gibco BRL) に 10% Fetal bovine serum (JRH Biosciences) を加えたものを培地として使用し、その後は、Neurobasal Medium に B-27 supplement (Gibco BRL) , 1 mM グルタミン, 2.5 µM cytosine β-D-arabinofuranoside を加えた培地中で培養を行った。培養は 37 °C, CO₂ 濃度 5% の条件下で行った。

RI 標識アミノ酸は、Pro-mix L-[35S] in vitro cell labeling mix (containing 70% L-[35S] methionine and 30% L-[35S] cysteine) (Amersham Bioscience) を用いた。RI を添加する前のコールドの培地内システインおよびメチオニン含量は、通常の Neurobasal Medium に含まれる量の 13% になるよう調整した。ディッシュ内の培地は RI と合わせて 3 ml になるようにし、うち放射線量は 1700 µCi になるように調整した。極性形成前の Stage 2 サンプルは、前述の培養条件で 10 時間行った後、RI 標識アミノ酸を含む培地に交換し 37 °C, CO₂ 濃度 5% の条件下 4 時間標識した。極性形成後の Stage 3 サンプルは培養 58 時間後の細胞について同様に標識培養を行った。4 時間の標識後、細胞を通常の Neurobasal Medium 5 ml で 2 回洗浄し、500 µl のサンプル調製液に溶解させた。サンプル調製液には、7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS, 0.5% Triton X-100, 0.5% IPG buffer pH 3-10 (Amersham Bioscience) , 100 mM DTT にトレーサーとして Orange G を少量加えたものを用いた。細胞を溶解して回収する際、タンパク質の非特異的吸着による損失を少しでも防ぐため、7 日間培養を

行った海馬神経細胞より調製した非 RI 標識タンパク質を 60 μ g 加え、共に回収した。細胞溶解液はその後 1 時間室温で放置し十分にタンパク質を可溶化させ、不溶性物質を除くため 15,000 rpm , 1 時間,室温で遠心分離を行った。得られた上清は 2D Clean-Up Kit (Amersham Bioscience) を用いタンパク質を沈澱させ脂質、核酸、塩などの不純物を除いた後、再度 200 μ l のサンプル調製液に溶解させ液体シンチレーションカウンターにより放射線量を測定した。サンプルは、 6.0×10^6 cpm ずつ 1.5 ml マイクロチューブに分注し、使用するまで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

二次元電気泳動

二次元電気泳動については、(Oguri et al., 2002) に基づいて行った。一次元目の等電点電気泳動は、長さ 24 cm の固定化 pH 勾配ストリップゲル(pH 4.0-5.0, pH 4.5-5.5, pH 5.0-6.0, pH 5.5-6.7, pH 6.0-9.0) (Amersham Bioscience) を使用して Multiphor II (Amersham Bioscience) 上で行った。サンプルの添加はストリップゲル膨潤液 (組成は前述のサンプル調製液と同様、相違点はトレーサーとして bromophenol blue を用いた) に混合してストリップゲル膨潤時に同時にタンパク質試料を取込ませる方法で行った。サンプル添加前に再度 Stage 2 と Stage 3 で放射線量を合わせ (毎回 4.0×10^6 cpm $\sim$ 6.0×10^6 cpm の範囲内で調製) サンプルを含めて 360 μ l の膨潤液で一晩かけて膨潤した。

等電点電気泳動の泳動条件は、2 時間 500 V で泳動した後 6 時間かけて 3500 V まで上昇させ、40 時間 3500 V で泳動を行った。ただし、pH 6.0-9.0 については、3 時間 300 V で泳動した後 6 時間かけて 1400 V に上昇させ、16 時間 1400 V で泳動、3 時間かけて 3500 V に上昇させ、最後 3 時間 3500 V で泳動した。等電点電気泳動が終了したストリップゲルは、平衡化バッファー (50 mM Tris-Cl, pH 8.8; 6 M Urea; 30% w/v glycerol; 2% v/v SDS; 65 mM DTT にトレーサーとして少量の bromophenol blue を加えたもの) で 25 分間室温で震盪した。次に平衡化バッファーの組成のうち 65 mM DTT を 135 mM ヨードアセトアミドに変えた新たなバッファー内で 25 分間室温で震盪した。

二次元目の電気泳動は、13.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) により行った。ただし、pH 4.5-5.5 および pH 5.0-6.0 については分子量 50 kDa 以上のタンパク質を検出するために 6.5%ポリアクリルアミドゲルもあわせて用いた。平衡化が終了したストリップゲルを泡が入らないようにスタッキングゲルに密着させ、0.5% アガロースを用いて包埋した。泳動槽は、13.5%ポリアクリルアミドゲルには幅 24 cm $\times$ 高さ 70 cm、6.5%ポリアクリルアミドゲルには幅 24 cm $\times$ 高さ 35 cm の 2 種類の縦型電気泳動槽 (オーダーメイド, 日本エイドー) を用いた(Inagaki et al., 2004)。

泳動を終えたゲルはそのままゲルドライヤーで乾燥させ、イメージングプレート（富士フィルム）に 2 週間感光させた。この際に自然界に存在する放射線によるバックグラウンドを軽減する目的で、鉛で覆われた環境下で感光を行った。イメージングプレートは BAS 2500（富士フィルム）により読み取り、ゲルイメージを得た。

ディファレンシャルディスプレイ解析

得られたゲルイメージは、複数の人間の目視により明らかに発現が上昇あるいは減少しているタンパク質スポットを変動があるものとして解析を行い。Stage 3 において発現が上昇あるいは減少しているタンパク質スポットは、3~7 回の実験を行って再現性を調べ、半数以上で再現よく上昇あるいは減少したタンパク質スポットを発現が変動した分子と判定した。さらに、定量解析ソフト Multigauge（富士フィルム）を用いて、タンパク質スポットの強度を数値化して定量を行った。

RI サンプルとコールドサンプルの二次元電気泳動ゲルでの二重染色

質量分析を行う際のタンパク質スポットとディファレンシャル解析で得られた RI 標識 Stage 2/Stage 3 サンプルの二次元電気泳動ゲルイメージとの対応させるため、RI 標識サンプルとコールドサンプル（生後 14 日目ラット全脳タンパク質または生後 1 日目ラット全脳タンパク質）を混合したものについて二次元電気泳動を行った。1.0×10⁷cpm の RI 標識サンプルと 1.5 mg のコールドサンプルを混合して二次元電気泳動を行い、銀染色によりタンパク質スポットの検出を行った。その後乾燥させたゲルをイメージングプレートに感光させ RI ラベルタンパク質の検出を行い得られたゲルイメージと銀染色によって得られたゲルイメージを重ね合わせた。

質量分析用のサンプル調製のための二次元電気泳動

質量分析による候補タンパク質の同定は、銀染色によりタンパク質を検出したゲルを用いて行った。生後 14 日目または生後 1 日目ラット全脳タンパク質を 2D Clean-Up Kit により精製し、約 500 µg~1.5 mg のタンパク質試料を前述の方法で二次元電気泳動を行い、銀染色によりタンパク質スポットを検出した。銀染色は、グルタルアルデヒドを使用しない Mortz らの Vorum silver staining protocol に基づいて行った(Mortz et al., 2001)。またタンパク質量が微量なため質量分析による同定が困難であると予想されるタンパク質スポットに関しては、ゲル濾過カラムによるプレフラクションとアセトン沈殿による濃縮を行い、目的のタンパク質スポットあたりのタンパク質量を増加させたタンパク質試料を

持いた。目的とするタンパク質スポットを銀染色後のゲルからカッターナイフなどを用いて切り出し、使用時まで-80℃で保存した

ゲル内消化

トリプシンを用いたゲル内消化方法は (Nomura et al., 2003) に基づいて行った。最初に、100 mM チオ硫酸ナトリウムと 30 mM フェリシアニル化カリウムを混合した溶液にゲルを浸し、銀染色の脱色を行った (Gharahdaghi et al., 1999)。脱色液を除いて十分に水で洗浄した後 1 mm 角に切断し、新しい 1.5 ml マイクロチューブにゲル片を集めて 50% アセトニトリル (Wako) を加えて 15 分間静置した。上清を除いて 100% アセトニトリルを加えて 15 分間チューブミキサー (TOMY) により震盪して脱水した。その後 100 mM NH_4HCO_3 内で 5 分間静置しそのまま 100%アセトニトリルを加えて 15 分間チューブミキサー (TOMY) で震盪した。上清を除いて遠心エバポレーターにより真空乾燥を行った。

還元反応は 10 mM DTT (Amersham Bioscience) を含む 50 mM NH_4HCO_3 中で 56 °C 45 分を行った。室温に戻した後、55 mM ヨードアセトアミド (Sigma) を含む 50 mM NH_4HCO_3 中で遮光下 30 分アルキル化反応を行った。その後再び前述と同様 100% アセトニトリルと 100 mM NH_4HCO_3 で洗浄し、遠心エバポレーターにより真空乾燥を行った。

この後 0.1% RapiGestSF (Waters) を含む 50 mM NH_4HCO_3 でゲルを膨潤させ、37 °C 10 分間静置した。余った RapiGest 溶液を吸い取った後、再び真空乾燥を行った。

その後氷上で 12.5 ng/ μl トリプシンを含んだ 50 mM NH_4HCO_3 の消化バッファーを少しずつゲルが完全に膨潤するまで加え、45 分間氷上でインキュベートした。45 分後、余った消化バッファーを除いてゲル片が浸る程度に 50 mM NH_4HCO_3 を加えて 37 °C インキュベーター内で一晩反応させた。

ペプチド抽出と脱塩

酵素消化終了後、上清を別のチューブに集めてゲル片には 25 mM NH_4HCO_3 を 20 μl 加えて 15 分間超音波処理 (UT-53N, SHARP) を行った。そしてさらに 100% アセトニトリルを 20 μl 加えて 15 分間超音波処理を行った。次に上清を集めて 5% HCOOH (Sigma) を 20 μl 加えて 15 分間超音波処理を行った。集めた上清は遠心エバポレーター (TOMY) により 10 μl まで濃縮した。濃縮したペプチド溶液は脱塩カラム (逆相クロマトグラフィー) に通してペプチドを吸着させ、1% TFA (Sigma) を通した後、15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調製したマトリクスを含む 70% アセトニトリル/0.1% TFA 0.8 μl で MALDI Target plate 上に溶出し室

温で乾燥し結晶化させた。脱塩カラムは Poros RP R2 (逆相カラム, ビーズサイズ 20 μm , Applied Biosystems) を GELoader tip (Eppendorf) 内に 5 mm 長になるよう充填させたものを用いた。マトリクスには、 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma) を用いた。

質量分析 (MALDI-TOF/MS) による測定

質量分析計は VoyagerTM Elite (Applied Biosystems) を用い、測定は reflector mode, positive, delayed extraction mode (125 nsec) により行った。キャリブレーションのための外部標準には Angiotensin (1296.5 Da)、Neurotensin (1672.9 Da)、Adrenocorticotrophic hormone (2465.7 Da) の 3 種を用いた。測定サンプルにトリプシンの自己分解物のペプチドピーク (842.5098, 1045.5642, 2211.1046) が検出された場合はこれらを内部標準として質量校正を行った。

データベース解析

タンパク質の同定は、ペプチド混合物の質量スペクトルより得られたピークについて検索ソフト (Mascot, Peptide finger printing <http://www.matrixscience.com/>) を用いて行った。

この際、トリプシンの自己消化物やコンタミネーションにより検出されたケラチン由来のペプチドのピークは除外し検索を行った。

検索時の設定として以下に示す条件で行った。

生物種 : mammalian

データベース : NCBI nr

Missed cleavage : 1

Fixed Modification : Carbamidomethyl (C)

Variable Modification : Oxidation (M)

誤差 : 0.1~0.3

Shootin1 の開始コドンの探索

極性形成時に発現上昇するタンパク質として KIAA1598 が同定された。質量分析により同定された、KIAA1598 の配列の N 末端はメチオニンから開始されておらず、開始 codon のメチオニンを決定する必要があったため、以下に示すような操作を行った。

KIAA1598 の 5' 側の約 100bp の DNA 配列を query として NCBI の BLAST データベースより Human EST 配列の検索を行った。検索により同定されたいく

つかの EST 配列において KIAA1598 とアミノ酸のフレームが一致するように DNA 配列からアミノ酸配列への変換を行い、開始 codon と推測されるメチオニンの決定を行った。

Shootin1 発現 vector の構築

かずさ DNA 研究所より譲渡された cDNA を template として、PCR 反応を行った。発現 vector などに subcloning するため、制限酵素 BamHI サイトを付加した以下の Primer を用いた。

5'-GCGGATCCATGAACAGCTCGGACGAAGAGAAGCAGCTGCAGCTCATT
ACCAGTCTGAAC および

5'-GCGATCCCTACTGGGAGGCCAGTATTC、各 50 μ M、template DNA 100 ng、FailsafeTM PCR Enzyme mix (1.25U)、PreMix buffer A の組成で 95°C 1 分 95°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分 30 秒 $\times$ 10cycle 72°C 5 分で行った。増幅された DNA 断片を制限酵素 BamHI (TOYOBO) により切断し、pBluescript II SK+ (Stratagene) に subcloning した。シーケンスにより変異のないクローンを選択し発現 vector、pCMV-Tag-3B(stratagen)、pEF-BOS、pCAGGS、pEGFP-C1(cloneteach)に翻訳時のフレームが一致するようにサブクローニングし大腸菌 (DH5 α) を 100 ml の LB 液体培地で一晚培養した。培養終了後に plasmid maxi prep kit (Qiagen) を用いて plasmid DNA の精製を行った。さらに 3 回のフェノール処理と 1 回のクロロホルム処理を行いエタノール沈殿し、DNA の沈殿を予め濾過滅菌した 100 μ l の H₂O に溶解した。溶解した Plasmid DNA は-80°Cで保存した。

HEK293T 細胞内への Transfection と Western blot による発現確認

構築した vector が細胞内で発現産物タンパク質が分解や発現停止などがなく全長として発現しているかを確認するため以下の実験を行った。

80% confluent に達した HEK293T 細胞にリン酸カルシウム法により transfect し、24 時間後に DMEM(sigma)で 3 回細胞を洗浄し、リン酸カルシウム-DNA の複合体を取り除いた。その後、10% FCS を含む DMEM を 4 ml 加え、37°C, 5% CO₂ で培養した。24 時間後に Medium を吸い取り、1 $\times$ PBS を 5 ml 加え洗浄し、150 μ l の 1 $\times$ SDS sample buffer を加えスクレーパーを用いて細胞溶解物エッペンチューブに収集した。氷上で溶液の粘性がなくなるまで超音波処理を行った後、室温で 30 分、17200g で遠心し、遠心後の上清を別のエッペンチューブに分取し SDS-PAGE 用の sample とした。この sample 2~5 μ l を SDS-PAGE で展開した。泳動終了後の SDS-ポリアクリルアミドゲルを 15 分間 Transfer buffer (100 mM Tris, 192 mM Glycine, 5% メタノール) に浸し震

盪した。Blotting 装置 (Trans Blot SD, Biorad) の電極を transfer buffer で浸し、予め SDS ポリアクリルアミドゲルと同じサイズに切断し 15 分以上 transfer buffer に浸して気泡を除いた whatman 3MM 濾紙 3 枚を気泡が入らないように注意しながら電極上に 3 枚重ねた。その上に 10 秒間メタノールに浸して 15 分以上 transfer buffer に浸した PVDF 膜 (IPVH000010, Millipore) を重ね、さらに transfer buffer で震盪した SDS-ポリアクリルアミドゲルを重ねさらに濾紙を 3 枚重ねた。重ねた濾紙及びゲルがずれないように慎重に電極をのせ、25V, 270mA で 3 時間通電し、ゲル中のタンパク質を PVDF 膜上に blotting した。Blotting 終了後の PVDF 膜を 3% skim milk を含む TBS で PVDF 膜を blocking した。1 時間震盪したのち PVDF 膜をハイブリパック (コスモバイオ) に移し 3% skim milk (Morinaga) を含む TBS に 1000 倍に希釈した 1 次抗体 (anti-myc) を 1 ml 加え、4℃で一晩反応させた。反応終了後、0.05% Tween-20 (nacalai) を含む TBS で 8 分×3 回ずつ洗浄しハイブリパックに移した後、0.05% Tween-20 を含む TBS に 2000 倍に希釈した 2 次抗体 (Anti-Rabbit HRP-conjugate, Amersham Bioscience) を加え室温で 1 時間反応させた。反応終了後、0.05% Tween-20 を含む TBS で 8 分×3 回ずつ洗浄した。洗浄終了後、PVDF 膜を ECL 反応液 (ECLTM Western Blotting Detection Regens, Amersham Bioscience) に 1 分間浸した。キムワイプで余分な反応液をとり除き PVDF 膜を透明の file にはさみ、X 線フィルム (Fujifilm) に 1 分から 10 分間感光させた。感光後に現像機にて X 線 film を現像し、目的のバンドを確認した。

免疫染色

神経細胞が培養されている 24 well plate に 7.4% ホルマリンを含む PBS を 500 μ l 加え氷上で 10 分間固定した。そこに氷冷した 1×PBS を 2 ml 加え、アスピレーターで残りの溶液が 200 μ l 以下にならないように吸い取りさらに PBS を 2 ml 加え、この操作を 3 回行い、最後に 2 ml の 1×PBS が存在した状態で氷上にて 10 分間静置した。アスピレーターにて PBS を吸い取り、そこに -20℃に冷却したメタノールを加え、-20℃で 10 分間静置した。F-actin の染色を行う際には 0.05% Triton X-100 を加え氷上で 15 分間処理した。その後アスピレーターにてメタノールを完全に吸い取り 10% NGS (フナコシ) を含む PBS を 500 μ l 加え室温で 1 時間静置して blocking した。blocking 終了後、カバースリップを細胞が付着している面が上になるように 24 well plate の蓋に移し、10% NGS を含む 1×PBS で希釈した 1 次抗体を 30 μ l カバースリップ上に加えた、この蓋を水で湿らせたキムタオルを敷き密閉できる容器に移し 4℃で一晩反応させた。反応終了後、24 well plate の蓋に氷冷した PBS を加え軽く震盪した後、3 ml

の氷冷した PBS を加えた 24 well plate にカバースリップを加え氷上で 1 時間静置した。その後、1 次抗体反応時と同様にカバースリップを蓋に移し、1×PBS で希釈した 2 次抗体を 30 μ l カバースリップ上に加え、室温で 1 時間反応させた。F-actin の染色を行う際には、二次抗体中に 100 倍希釈した Rhodamin-Phalloidin(Molecular Probe)を加え反応を行った。反応終了後、1×PBS を蓋に加え軽く震盪した後 3 ml の PBS を加えた 24 well plate にカバースリップを移し、室温で 1 時間静置した。その後、50% glycerol を含む PBS を 1 滴のせたスライドガラス (MATUNAMI, MICRO SLIDE GLASS) に細胞が付着した面が上になるようカバースリップを移し、50% glycerol を含む PBS をカバースリップ上に数滴加えた。その後カバーガラス (MATUNAMI, MICRO COVER GLASS) を気泡が入らないように注意しながらカバースリップ上にのせ、50% glycerol を含む PBS を加えスライドガラスとカバーガラスの間をみたした、カバーガラスの 4 辺にマニキュアを塗り。室温で数分間乾燥させた後蛍光顕微鏡 (Axio plan 2, ZWISS) で観察した。

免疫染色における抗体の希釈条件を下に示す

1 次抗体

Mouse monoclonal anti-phospho-Akt(587F11) (Cell signaling)	x200
Rabbit polyclonal anti-myc-tag (MBL)	x500
Mouse monoclonal anti-myc-tag (MBL)	x5000
Mouse monoclonal anti-tau-1 (Boehringer)	x500
Mouse monoclonal anti-MAP-2 (Sigma-Aldrich)	x3000
Mouse monoclonal anti-synaptophysin (Progen)	x2500

2 次抗体

Alexa Flour 488 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes)	x1000
Alexa Flour 594 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes)	x2000
Alexa Flour 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes)	x1000
Alexa Flour 594 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes)	x1000
Alexa Flour 350 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes)	x800

初代培養神経細胞への Transfection (エレクトロポレーション)

上記の方法により得られた海馬神経細胞を回収し、遠心 (1000rpm、4℃、20min) し細胞を沈殿させ、その後、氷冷した 1xPBS 5~10ml を加え懸濁し 1.0 ~3.0x10⁶ 個の細胞を 15 ml チューブに分取し再び遠心し細胞を沈殿させ、

上清を取り除き Rat Neuron Nucleofector Solution (AMAXA) 用 75 μ l と Supplement solution 18 μ l の混合液で細胞を懸濁し、前記の方法により精製した PlasmidDNA を加え十分にピペッティングにより懸濁した。細胞懸濁液の全量を専用のキュベットに移し Nucleofector Type 1 (AMAXA) のプログラム O-03 を用いてエレクトロポレーションを行った。その後キュベットから細胞懸濁液を回収し 10%FBS を含む NeuroBasal に懸濁した後、予め PDL および ラミニンでコーティングした GlassCoverSlip もしくは Dish 上にまいた。2~3 時間後に細胞が接着したのを確認したのち Neurobasal に 1 %B27 および 1 mM グルタミンを加えた培地に置換し培養 (37°C, 5 % CO₂) を行った。

初代培養神経細胞への Transfection (Lipofectamine)

複数個の Plasmid DNA を同一細胞内で発現させたい場合にはこの方法を用いた。上記の方法により得られた海馬神経細胞を、1 反応につき 2×10^6 個を分注し、遠心により細胞を回収した。その後、10%FCS を含む Neurobasal 300 μ l に懸濁した。1.5 ml チューブ 2 本に 10% FCS を含む Neurobasal 50 μ l を分注し一方には Plasmid DNA を 2 μ g、もう一方には Lipofectamine 2000 Solution (Invitrogen) を 2 μ l 加え、室温で 5 分間静置し、その後両者を混ぜ室温で 20 分間静置した。最後に神経細胞の懸濁液に Lipofectamine/DNA の混合液を加え、20 回程度激しくピペッティングし、37°C、5% CO₂ で 90 分間培養を行い、神経細胞内に plasmid DNA を取り込ませた。その後、遠心により細胞を沈殿し上清を除いた後、10% FCS を含む Neurobasal を加え細胞を懸濁し、細胞数を測定したのち、Coverslip 1 枚あたり 2.0×10^5 cell になるように 10% FCS を含む Neurobasal で希釈し細胞をまき培養を行った。90 分後には Neurobasal medium に B-27 supplement (Gibco), 1 mM グルタミンを加えた培地に交換した。長期間培養する場合には 3 日間に 1 度半分量の Medium を吸い取り新たな Medium を加えた。

RNAi

Shootin1 の発現抑制を行う際には、Invitrogen 社の BLOCK-iT Pol 2 miR RNAi expression vector kit を用いた。ラット Shootin1 の 138 から 158 番目の塩基に相当する、TGAAGCTGTTAAGAACTGGA を同 kit 内の pcDNA 6.2-GW/emGFP-miR vector に Ligation し構築した。また、ネガティブコントロールとして、同 Kit 内に添付されていた pcDNA 6.2-GW/emGFP-miR-neg vector を用いた。海馬神経細胞には、Nucleofector を用いエレクトロポレーションにより導入した。

神経細胞の形態の定量解析

それぞれの免疫染色画像を取り込み定量解析ソフト ImageGauge (Fujifilm) で解析を行い、神経突起の長さや細胞内での蛍光強度を測定し、数値化データ得たのち表計算ソフト Excel (Microsoft) により統計解析および有意差検定を行った。極性形成の判定基準としては、幅広く用いられている基準に従って判定を行った。これは、ある突起の長さが他の突起の長さの 2 倍以上であった場合には極性形成が行われた Stage3 の神経細胞とし、それ以下の場合には極性形成前の Stage2 の神経細胞とみなした。

タイムラプス観察

観察を始める 3 時間以上前に培地を 1 % B27 および 1 mM グルタミンを含む L-15 Medium に置換し 37°C で培養した。その後、顕微鏡上に置き観察した。この際、顕微鏡の設置してある部屋全体を市販の暖房器具を用い 33°C から 37°C 程度になるよう予め保温しておいた。顕微鏡システムには DeltaVision (関テクノロン) を用い、x 40 倍の対物レンズを使用した。

Shootin1 タンパク質の精製と抗体の作成

Human の Shootin1 の全長を pGEX-6P-1 vector に Frame が合うように構築した。構築した Vector を大腸菌 BL21 (Codon plus) に形質転換した。その後、コロニー形成後、抗生物質としてアンピシリンを含む LB 培地で一晚振盪培養を行った。その後、この培養液を新たに用意したアンピシリンを含む LB 培地 (7l) に移し培養 (37°C 200rpm) し、OD:600 が 0.7 になるまで培養を行った。OD:600 が 0.7 になった時点で培地を 25°C に冷却した後、終濃度が 0.1mM になるように IPTG を加え 25°C で 4 時間振盪培養 (200 rpm) を行った。培養終了後、遠心により大腸菌を回収し氷冷した 1×PBS に懸濁し再び遠心により菌体を回収した。この操作を 2 回行った後、菌体重量を測定しその 3 倍量 (w/v) の氷冷した Homogenate Buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA, 250 mM Sucrose 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 µg/ml leupeptin) 加え懸濁後超音波処理 30 秒 x10 回 により菌体を破壊した。超遠心 (10 万 G, 4°C, 60 分) で可溶性画分と不溶性画分に分画した後、可溶性画分を回収し 0.25 µm のフィルターを用いて濾過を行った。その後 Glutathion-Sepharose 4B (Amasham) と 4°C で 2 時間反応させ GST-Shootin1 融合タンパク質を吸着させ、TED buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) に 150 mM の NaCl を加えた Buffer で glutathion-Sepharose 4B を洗浄した後、15 mM の還元型グルタチオンを含む TED と反応させ融合タンパク質を Glutathion-Sepharose 4B から解離させた。その後、Precision Prptase (Amasham) と反応させ、GST と

Shootin1 の部分を切断した、GST 部分は再び Glutathion-Sepharose 4B と反応させることにより除去し、Shootin1 のタンパク質を得た。得られたタンパク質は 1xPBS で透析を行い MBL 社に委託しウサギに免疫することで抗血清を得た。

免疫沈降

生後 1 日目の Rat より全脳を取り出し、氷冷した 1×PBS に浸し血液成分等を洗浄した。その後、Homogenate buffer を脳重量の倍量加え、ホモジェナイザーをもちい脳組織を破碎した。700G で 5 分間 2 回遠心し、未破碎細胞および核画分を沈殿させ取り除いた、上清を超遠心（10 万 G、4℃、30min）遠心し、Cytosol 成分を含む可溶性画分と細胞膜や細胞骨格成分を多く含む不溶性画分に分画した。不溶性画分に 3 倍量の RIPA buffer を加えピペティングした後氷上で 20 分間静置した。その後、再び超遠心（10 万 G、4℃、30min）を行い、上清を 0.2 μm のフィルターで濾過し、1.5ml チューブに 600 μl ずつ分注した。そこに、抗体を加え 4℃で 3 時間回転させ、予め RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1 % sodium deoxycholate, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μg/ml leupeptin, 10 mM Na₃VO₄, 10 mM beta-glycerophosphate)で平衡化した Protein G-Sepharose 4B を加え 1 時間反応させた。反応終了後、遠心により ProteinG-Sepharose/抗体の複合体を沈殿させ、RIPA Buffer を加えて穏やかに攪拌した。この操作を 3 回繰り返したのち、上清をきれいに取り除き、そこに 1×SDS sample buffer を加え、SDS-PAGE に用いる Sample とした。

<結果>

極性形成時に発現上昇するタンパク質のプロテオーム解析

培養開始 14 時間後の Stage2 の神経細胞と 62 時間後の Stage3 の神経細胞より抽出した全タンパク質を 2 次元電気泳動で展開したところ、等電点 4.0-9.0、分子量 250 kDa 以下の範囲 (図 5,6A) において、6,197 個のタンパク質スポットが検出された。検出された全タンパク質スポットにおいて、極性形成前と形成後で Spot 強度の比較定量を行ったところ、極性形成に伴い全検出スポットの 4.5% に当たる 277 個のタンパク質スポットの強度が増加していることが確認された。一方で 4.3% に当たる 265 個にスポットが減少していることが認められた (表.1)。

質量分析法によるタンパク質スポットの同定

極性形成に伴い発現が上昇するタンパク質スポット 277 個に関して、トリプシンによる In-gel digestion とそれにより得られたペプチド断片を質量分析法を用いた解析により同定を行った。その結果、95 個のタンパク質スポットに関して同定に成功し、その内訳としては細胞骨格関連分子 23 個、代謝関連分子 19 個、タンパク質・膜輸送関連分子 14 個、タンパク質合成・分解関連分子 12 個、シグナル伝達関連分子 12 個、その他 (機能未知など) 15 個であった (表 2)。

新規分子 Shootin1 の同定

同定された分子の中で新規分子 Shootin1 (KIAA1598) に注目し、機能解析を行った。2 次元電気泳動ゲル内での Shootin1 のタンパク質スポットの位置を図 8A に示す。Shootin1 タンパク質スポットの強度を定量解析ソフトを用いて測定したところ、極性形成に伴い 3.3 倍 (n=16) の上昇が有意に認められた (図 7B)。

Shootin1 は 456 アミノ酸より構成され、ヒト Shootin1 の場合、理論分子量は 52.6 kDa であった (図 8)。アミノ酸の配列情報からは他の分子の相同性や保存された domain などの存在は確認されなかったが、3 箇所の coiled-coil と 1 箇所の Proline-Rich および 2 箇所の leucine Zipper domain を有していた (図 9)。また、配列内には、膜貫通部位や細胞外への分泌、細胞内小器官への局在化に関わるシグナルは配列の存在は確認されなかった。各種のデータベース検索ではこれまでに魚類以上の脊椎動物でその存在が確認されており、線虫やショウジョウバエ、酵母などには存在が確認されなかった。

Shootin1 の発現部位および発現変化

成体ラットの各組織より抽出した全タンパク質を抗 Shootin 抗体で Western Blot したところ脳でのみ 60 kDa 付近にシグナルが認められた (図 10A)。それ以外の組織では 60 kDa のバンドは認められなかったが、Shootin1 の Splicing variant である Shootin2 のシグナルが 88 kDa 見られた。発生時期段階ごとに採取したラット全脳より抽出したタンパク質の Western Blot では、胎生 18 日目 (E18) からシグナルが検出され生後 4 日目 (P4) でピークを迎え、その後発生段階とともに減少が認められ、成体の脳組織では発現は微量であった (図 10B)。

初代培養海馬神経細胞での発現確認

In Vitro の環境下で生育させた、初代培養神経細胞から抽出した全タンパク質の Western blot では極性形成が起きる培養開始 14 時間後から 62 間後に急激に発現量が上昇し、その後培養開始 21 日目まで一定の発現レベルを保った後、培養開始 28 日目には急激な低下が認められた (図 10C)。比較としてシナプス小胞の輸送およびその放出に関与する分子である Synaptophysin の発現量と比較すると、Synaptophysin は培養開始、7 日目から 28 日目まで発現量の上昇が認められる。また、培養開始から 12 時間おきに採取したサンプルにおける Western blot では培養開始 12 時間後から 62 時間後まで一定の割合で上昇したのち、その後は一定の発現レベルを維持した (図 10D)

培養海馬神経細胞における Shootin1 の局在

神経細胞内における内在性 Shootin1 の局在を確認するため、免疫染色法を用いた解析を行った。極性形成前の Stage2 の神経細胞として培養開始 12 から 20 時間後、極性形成後の Stage3 の神経細胞として培養開始 48 時間後の細胞にそれぞれ 2 時間細胞質全体を染める色素マーカーである CMFDA を培地中に添加し染色した。その後、固定し抗 Shootin 抗体を用いて染色を行った。極性形成前の Stage2 の神経細胞では、未熟な神経突起の先端に存在する成長円錐および細胞体が染色された (図 11A)。画像より Shootin1 の染色強度と CMFDA の染色強度の比率を算出しプロットすることにより局所的な Shootin1 の相対濃度を導き出した。その結果、Shootin1 は細胞体よりも成長円錐に濃縮していることが確認された (図 11B)。極性形成後の Stage3 の神経細胞では軸索の成長円錐が強く Shootin1 抗体で染色されていた。しかし、将来、樹状突起に分化する未熟な神経突起の先端や神経突起自体には染色は殆ど認められなかった (図 12)。また細胞体の染色強度も極性形成前の Stage2 の神経細胞と大きな差は認められなかった。

成長円錐における Shootin1 の局在

極性形成後の Stage3 の神経細胞の軸索の成長円錐内における Shootin1 の詳細な局在について抗 Shootin 抗体を用いた免疫染色により観察を行った。成長円錐は F-Actin や微小管のおよびその+末端が多く含まれているため、Phalloidin により F-Actin の染色を行った。Shootin1 は成長円錐内において外側の F-Actin が多く存在する P-Domain と呼ばれる領域に強く濃縮し (図 13A)、filopodia の内部にも局在が認められた (図 13B)。しかし、成長円錐内部の C-Domain に相当する領域には強い濃縮は認められなかった。P-Domain に豊富に存在することから、F-Actin との局在の比較を行った。Filopodia 内部には F-Actin の束が存在するが Shootin1 は F-Actin と共局在はせずに F-Actin の束にそって存在するようにドット状に局在が確認された。

成長円錐 Filopodia における Shootin1 の局在 (電子顕微鏡)

成長円錐内の Filopodia における Shootin1 のより詳細な局在様式を解析するため免疫電子顕微鏡による観察を行った。この方法では二次抗体として、5nm の金粒子が結合した抗体を使うため、分子の局在が黒い点とし検出可能である。その結果、Shootin1 は成長円錐の Filopodia において一群の集団となり局在する様子が観察された (図 14)。また、Filopodia 内部においてその先端付近や細胞膜近傍に局在する様子が確認された。

成長円錐様構造体 "Wave" への Shootin1 の局在

培養海馬神経細胞の免疫染色の結果、Shootin1 は神経突起先端に存在する成長円錐だけでなく、Wave と呼ばれる成長円錐様の構造体 (Ruthel et al., 1998 and 1999) にも局在が認められた。また、Shootin1 は Wave に局在した状態で細胞体から神経突起に沿って突起先端まで移動する様子が確認された。Wave による Shootin1 の輸送は極性形成前の神経細胞だけでなく、極性形成後の神経細胞でも観察された (図 15)。

極性形成前の神経細胞における Shootin1 の挙動

極性形成前の Stage2 の神経細胞は、個々の神経突起が伸長と退縮を繰り返しダイナミックな動体を見せている (図 16)。この時期の細胞における Shootin1 の動体を EGFP-Shootin1 を用いた Timelapse 観察を行った (図 17)。EGFP-Shootin1 と mRFP を神経細胞内に導入後、12 時間から 24 時間培養した細胞を観察した。mRFP は細胞の体積を補正する際の Volume Maker として用い、細胞の厚みを反映して局在し特徴的な局在様式は認められなかった。一方 EGFP-Shootin1 は細胞体と未熟な神経突起の先端に局在し、さらに Wave に

局在し神経突起に沿って細胞体から神経突起の先端に移動した。WaveによりShootin1は細胞体から突起先端に輸送されると、突起先端でのShootin1量の上昇が認められ、その後神経突起の顕著な伸長が確認された。その後、先端のShootin1の量は時間と共に、減少する様子が確認され、それに応じて神経突起の退縮が認められた。その後も、①Shootin1の細胞体からの輸送、②神経突起先端への濃縮、③突起の伸長、④突起先端からの減衰、⑤突起の退縮の5つのStepを繰り返した。タイムラプスの観察データから、Shootin1の突起先端での蛍光強度と突起伸長の速度を定量したところ、Shootin1が高濃度で存在する場合には突起の伸長が、逆に低濃度の場合には突起の退縮が認められた(図17B)。

極性形成時の神経細胞におけるShootin1の挙動の変化

極性形成が行われるStage2からStage3への移行時期におけるEGFP-Shootin1の局在の変化について観察を行った。Stage2では個々の神経突起間でShootin1の濃縮と減衰を繰り返しているが、Stage2のある時期に1つの神経突起の先端にShootin1が強く局在しその突起の急速な伸長が確認された。一方で、他の神経突起においてShootin1の蛍光は減少する様子が観察された(図18)。

Shootin1の過剰発現は過剰な軸索を形成する

Shootin1の機能を知るため、培養海馬神経細胞内においてShootin1を過剰発現させ、その際に神経細胞におけるShootin1の局在および表現型の解析を行った。極性形成後の神経細胞において内在性Shootin1は軸索の成長円錐のみで強い濃縮を示すが、Shootin1を過剰に発現させた細胞では軸索の成長円錐のみならず将来樹状突起へと分化すると予測される神経突起先端にも局在を示した。また、培養開始4日後の神経細胞においては、Myc-Shootin1を過剰発現させた細胞では $32.4 \pm 1.8\%$ (n=3, 209cells)の細胞が2本以上の過剰な軸索を有していた(図19、21A)。実験系のコントロールとして用いたMyc-GSTを発現させた場合には、 $9.9 \pm 2.5\%$ (n=3, 191cells)の細胞で過剰軸索の形成が認められた(図21A)。

Shootin1の過剰発現により生じた長い複数の神経突起の性質を検討するため、広く利用されている軸索のマーカーとしてTau-1(図20)およびSynaptophysin(図20B)、樹状突起のマーカーとしてMAP2(図20A)を用いて免疫染色を試みた。Shootin1を過剰発現した細胞においてTau1は長い神経突起のシャフト部分が強く染色されるのに対し短い神経突起は殆ど染色されなかった。またsynaptophysinは長い神経突起に沿ってドット状に染色されるが、細胞体および短い神経突起には局在が認められなかった。一方、樹状突起マーカーである

MAP2 は細胞体および短い神経突起が染色されたが、長い神経突起は染色されなかった。

Shootin1 の過剰発現は神経突起伸長を促進する

Shootin1 の発現および複数の突起先端への局在が神経突起の長さに及ぼす影響を検討するため、Myc-Shootin1 およびコントロールとして Myc-GST を発現する細胞において、培養開始 24、48 時間後および 4 日後の神経細胞の神経突起の長さの定量を行った。

培養開始 24 時間後の神経細胞の場合、全神経突起の長さの総和を比較すると Myc-GST の場合 $160.6 \pm 4.3 \mu\text{m}$ ($n=214$)、Myc-Shootin1 の場合には $204.9 \pm 4.8 \mu\text{m}$ ($n=206$) となった。また、各細胞において長い神経突起から順に 4 番目までの神経突起の長さを比較した場合、Myc-GST の場合には、長い突起から順に平均 101.2、36.1、22.9、18.9 μm であったのに対し、Myc-Shootin1 では平均 113.1、54.1、32.2、21.9 μm であった。有意差検定の結果すべての神経突起において優位な差が認められ、Shootin1 の過剰発現によりすべての神経突起の伸長が認められた (図 22)。

培養開始 48 時間後の神経細胞の場合、全神経突起の長さの総和を比較すると Myc-GST の場合 $241.0 \pm 6.7 \mu\text{m}$ ($n=160$)、Myc-Shootin1 の場合には $293.0 \pm 8.0 \mu\text{m}$ ($n=181$) となった。また、各細胞において長い神経突起から順に 4 番目までの神経突起の長さを比較した場合、Myc-GST の場合には、長い突起から順に平均 150.8、45.5、29.4、20.5 μm であったのに対し、Myc-Shootin1 では平均 161.8、71.4、39.9、27.5 μm であった。有意差検定の結果すべての神経突起において優位な差が認められ、Shootin1 の過剰発現によりすべての神経突起の伸長が認められた (図 23)。

さらに比較的培養後期の神経細胞である培養開始 4 日後の神経細胞においても同様の解析を行ったところ。全神経突起の長さの総和を比較すると Myc-GST の場合 $836.6 \pm 34.0 \mu\text{m}$ Myc-Shootin1 の場合には $836.3 \pm 22.7 \mu\text{m}$ ($n=116$) となった。また、各細胞において長い神経突起から順に 4 番目までの神経突起の長さを比較した場合、コントロールとして Myc-GST を導入した場合には、長いものから順に、平均 613.6、103.2、69.5、52.0 μm となった。Myc-Shootin1 を導入した場合には長いものから順に、平均 362.2、287.9、119.6、68.3 μm となり、GST および Shootin1 を発現させた細胞を比較すると、Shootin1 を過剰発現した細胞では、最も長い突起の長さが減少するが、2 番目以降の長さの神経突起は有意な増加が見られた (図 21)。

Shootin1 の発現抑制は神経極性形成を抑制する

過剰発現とは対照的に内在性 Shootin1 の発現を RNAi 法により抑制させた場合、神経細胞の形態に及ぼす影響について解析を行った。RNAi 法は miRNA のシステムを用い、ラットの Shootin1 の配列を標的とし他の遺伝子の配列と重複しない配列を用いた vector を構築した。(以後、Shootin1-RNAi)。また実験系のコントロールとして脊椎動物のすべての遺伝子の配列に対して標的とならない RNAi Vector を用いた (以後、Control-RNAi)。

Shootin1-RNAi を導入した細胞ではコントロールと比較し、細胞体では $55.0 \pm 13.5\%$ (n=20) 成長円錐では $13.9 \pm 3.9\%$ (n=19) に染色強度の減少が有意に認められた (図 24)。RNAi を導入し培養開始 24、48、72 時間後の神経細胞を固定し、発現抑制効率を確認するため抗 Shootin 抗体、神経細胞とそれ以外の細胞とを識別するため Tuj1 抗体で免疫染色を行った。まず Shootin1 の発現抑制が神経極性形成に及ぼす影響について解析を試みた。最も長い 1 本の神経突起が次に長い神経突起の二倍以上の長さを有しているときに極性形成が完了した細胞としてカウントし統計解析を行った。

その結果、培養開始 24 時間後の神経細胞では Control-RNAi が $56.9 \pm 2.9\%$ (n=3, 159 cells) が極性形成を完了しているのに対し、Shootin1-RNAi では $31.2 \pm 1.5\%$ (n=3, 169 cells) の細胞が極性を形成し、両者に有意な差が得られた。

また培養開始 48 時間後の神経細胞の場合 Control-RNAi では $81.3 \pm 3.8\%$ (n=3, 142 cells) が極性形成を完了しているのに対し Shootin1 発現抑制細胞では $39.3 \pm 2.3\%$ (n=3, 150 cells) が極性を形成した。さらに培養開始 72 時間後の神経細胞の場合 Control-RNAi では $93.0 \pm 0.9\%$ (n=3, 121 cells) が極性形成を完了しているのに対し Shootin1 発現抑制細胞では $78.5 \pm 1.0\%$ (n=3, 131 cells) が極性を形成した。培養時間に伴い軸索を形成し極性を獲得した細胞の割合が増加する傾向があるが、Shootin1 を発現抑制した細胞ではコントロールと比較し極性を獲得した細胞の割合が低いことが認められる。しかし、培養時間の経過に伴い、極性形成を完了した細胞の割合は増加する傾向が認められた (図 25)。

Shootin1 の発現抑制が神経突起の伸長を抑制する

前記の実験において神経突起の長さに Shootin1 の発現量が及ぼす影響について解析を試みた。培養開始 24 時間後の神経細胞の場合、全神経突起の長さの総和を比較すると Control-RNAi の場合 $161.8 \pm 7.1 \mu\text{m}$ (n=141) Shootin1RNAi の場合には $130.6 \pm 4.7 \mu\text{m}$ (n=143) となった。また、各細胞において長い神経突起から順に 4 番目までの神経突起の長さを比較した場合、Control-RNAi の場合には、長い突起から順に平均 94.3、36.9、25.1、18.3 μm であったのに対

し、Shootin1-RNAi では平均 67.6、34.6、21.8、15.4 μm であった。有意差検定の結果、最も長い神経突起の長さのみ有意差が得られ、Shootin1 の発現抑制により最も長い神経突起の伸長が抑制された (図 26)。

培養開始 48 時間後の神経細胞の場合、全神経突起の長さの総和を比較すると Control-RNAi の場合 $193.5 \pm 5.2 \mu\text{m}$ ($n=140$)、Shootin1-RNAi の場合には $241.6 \pm 7.4 \mu\text{m}$ ($n=144$) となった。また、各細胞において長い神経突起から順に 4 番目までの神経突起の長さを比較した場合、Control-RNAi の場合には、長い突起から順に平均 144.6、47.7、31.4、22.2 μm であったのに対し、Shootin1-RNAi では平均 92.8、47.6、31.8、22.8 μm であった。有意差検定の結果、培養開始 24 時間後の時と同様に最も長い神経突起の長さのみ有意差が得られ、Shootin1 の発現抑制により最も長い神経突起の伸長が抑制された (図 27)。

Shootin1 と PI3-kinase との相互作用の解析

神経極性の形成には PI3-kinase の局所的な活性化とその生成物である PIP3 およびその下流で活性化される分子の働きにより、神経突起の伸張が起き極性形成に関与する報告が数多くなされている。PI3-kinase は Regulatory Subunit と Catalytic Subunit から構成され class 1 PI3kinase の場合、Regulatory Subunit が p85、Catalytic Subunit が p110 である。p85 は活性化し自己リン酸化した受容体型チロシンキナーゼに直接もしくは、アダプタータンパク質を解して結合する。その結果、細胞膜にリクルートされ p110 の酵素活性を上昇させ PIP2 から PIP3 の反応を正に制御する。また p110 は活性化した Ras と結合することによっても活性化の制御を受ける。Shootin1 が PI3-kinase のシグナル伝達機構になんらかの影響を与えていることが予測されたので、Shootin1 と PI3-kinase との相互作用の確認を行った。

生後 1 日のラット全脳から膜画分を調整し可溶化したのち、抗 Shootin 抗体およびコントロールとして Normal-IgG により免疫沈降を行い、抗 p85 抗体により Western blot を行い、相互作用の確認を行った。その結果、Shootin1 抗体で免疫沈降した sample には p85 のシグナルが検出されたが、一方コントロールでは p85 のシグナルは認められなかったことから Shootin1 と PI3-kinase の相互作用が示唆された (図 28A)。また同様の実験において、抗 p85 抗体による免疫沈降においても Shootin1 の共沈降が確認された (図 28B)。

相互作用の可能性が示唆されたことから、軸索の成長円錐内における Shootin1 と p85 との共局在の確認を行った。Shootin1 は成長円錐の辺縁部に存在する Filopodia や Lamellipodia に局在するが、p85 は特に成長円錐内において特徴的な局在パターンは示さなかった。しかし、一部の Filopodia や Lamellipodia において Shootin1 と PI3-kinase との共局在が確認された (図

28C)。

Shootin1 の局在部位では PI3-kinase が活性化する

細胞内における PI3-kinase 活性の指標として 473 番目のセリン残基がリン酸化された Akt (以後 pAkt) が広く利用されている。そこで、Shootin1 の局在と PI3-kinase の活性化部位を比較検討するため pAkt との共免疫染色を行った。培養開始 48 時間後の極性形成が完了した神経細胞において Shootin1 は前述のように、軸索の成長円錐のみに強い局在を示した。pAkt は細胞体が最も強く染色されついで、軸索の成長円錐が染色されたが、将来樹状突起に分化する神経突起の先端には局在は認められなかった (図 29A)。また、PI3-kinase の特異的阻害剤である LY294002 を終濃度 20 μ M になるように培地中に添加し 2 時間処理した細胞では、Shootin1 は LY294002 非存在下のときと同様に軸索の成長円錐に強く濃縮したが、pAKT の染色強度は軸索先端および細胞体では非常に弱くなっていた (図 29B)。Shootin1 を過剰発現させた細胞では、軸索のみならず樹状突起に分化する神経突起の先端にも Shootin1 の局在が認められる。この条件に細胞においては、pAkt の染色も軸索の成長円錐のみならず、Shootin1 が局在した神経突起の先端に局在を示した (図 29C)。対照的に、Shootin1 の RNAi を行った細胞では、内在性 Shootin1 の発現抑制に伴い、抗 Shootin1 抗体による染色強度の減少が認められ、pAkt の局在に関しても軸索の成長円錐で減少が認められたが、細胞体側では顕著な変化は認められなかった (図 29D)。

Shootin1 による軸索の形成促進は PI3-kinase に依存する

Shootin1 を過剰発現させた場合には、本来 1 本しか形成されないはずの軸索が複数形成される表現形が認められるが、この現象が PI3-kinase のシグナルカスケードに依存しているかを解析した。Myc-Shootin1 を海馬神経細胞内で過剰発現させ、培養開始 6 日後の神経細胞に置いて単位細胞あたりの軸索の本数をカウントし、2 本以上の軸索を形成した細胞の割合を定量した。この際、PI3-kinase の阻害剤として終濃度 20 μ M の LY294002 を培養液中に添加したものと、コントロールとして DMSO を添加した細胞群を用意した。コントロールとして DMSO を添加したサンプルでは、 $39 \pm 2.9\%$ ($n=3$, 115 cells) が 2 本以上の複数の軸索を有していたのに対して、LY294002 で処理したサンプルでは $17.4 \pm 2.7\%$ ($n=3$, 107 cells) の細胞のみしか過剰な軸索を有していなかった (図 30)。有意差検定の結果 LY294002 の処理により有意に過剰軸索の形成が抑制されていた。また、LY294002 処理の有無に関わらず Myc-Shootin1 の細胞内局在には大きな差は認められなかった。先の実験系とは対照的に PI3-kinase の活性化変異体であるミリストイル化シグナルを付加した Myr-p110 を過剰発

現させた細胞において、Shootin1 の発現抑制を行い、過剰軸索の形成に及ぼす影響について解析を行った。Myr-p110 と Control-RNAi および Shootin1-RNAi の Vector を海馬神経細胞内に導入し、培養開始 6 日後に過剰軸索を形成している細胞の割合を計測し定量化した。活性型変異体である Myr-p110 とコントロール RNAi を導入した場合には、 33.7 ± 2.7 % (n=3, 119 cells) の細胞で過剰軸索の形成が認められた。Shootin1 を RNAi した細胞では 32.5 ± 1.2 % (n=3, 106 cells) の細胞で過剰軸索の形成が認められた (図 31)。有意差検定の結果、これら両者には差は認められなかった。

＜考察＞

神経極性形成に伴い発現変動する分子のプロテオーム解析

極性形成前後の神経細胞内で発現するタンパク質のプロテオーム解析の結果から、極性形成前後でタンパク質スポットのダイナミックな変動が確認された。二次元電気泳動法ではタンパク質は分子量のみならず翻訳後修飾の違いにより生じた等電点の変化も検出可能な実験系であることから、神経細胞の極性形成時期には発現量だけでなく翻訳後修飾が変化するタンパク質も多く存在することが考えられる。特に神経極性形成時期に発現量が上昇もしくは翻訳後修飾が変化するタンパク質は神経極性への関与が高い可能性がある。

本研究において質量分析により同定された分子のなかには、神経極性形成や突起伸長への関与がすでに報告されている分子が多く存在していた。特に **CRMP-2** は神経極性形成への関与がよく研究されている分子の 1 つであり、神経突起の先端で微小管の重合を促進し突起伸長を誘導する機能を有している。また **SNAP-25** は小胞輸送と細胞膜への小胞の融合に関与するタンパク質であり、発現抑制により軸索伸長が抑制される報告がなされている(Osen-Sand et al., 1993)。また、同じく **AmphiphysinI** も小胞輸送に関与することで神経突起伸長への関与が報告されている(Mundigl et al., 1998)。同定された分子の 1/3 程度は細胞骨格や小胞輸送に関与する分子であり、**Stage2** から **Stage3** への移行に伴う神経突起の急速な伸長には、細胞骨格の制御ならびに細胞膜の拡張に伴う膜成分の供給が必要であると考えられ整合性のある結果と思われる。

新規分子 Shootin1

新規分子 **Shootin1** には他に相同性のある分子や保存された **Domain** などの存在は認められず、配列情報からの機能予測は不可能であった。**Shootin1** が有する **Domain** の特徴として、**Coiled-Coil** 領域は他のタンパク質との相互作用に必要な領域であり、**Leucine-Zipper** もタンパク質の二量体化や他の **Leucine Zipper** を有するタンパク質との相互作用に必要なとされる配列である。さらに **Proline-rich-region** はそのアミノ酸の性質状、ポリペプチド鎖を大きく曲げる性質を有しておりタンパク質の立体構造状重要な役割を担う部位であると考えられる。また、特定の **Domain** との相互作用に必要な部位であり、**Proline-Rich** との相互作用 **Domain** としてシグナル分子などに見られる **SH3 (src homology 3) domain** や **WW domain** が挙げられる(Kay et al., 2000)。**Shootin1** に関して

もこれらの Domain を有するタンパク質との相互作用が予想される。

また、Shootin1 はデータベース検索の結果、魚類以上の脊椎動物のみで存在が確認されており、線虫やショウジョウバエ、酵母などの下等生物にはホモログは確認されておらず、生物の進化過程において、比較的新しい時期に誕生したと考えられる。脊椎動物の神経極性形成には Shootin1 は重要な役割を担っていると考えられる。

Shootin1 の発現変動

Shootin1 は神経細胞で特異的に発現する分子であり、神経細胞以外ではこれまでのところ発現は確認されていない。また、海馬神経細胞において、極性形成時に発現が急激に上昇し、神経突起の伸長が持続する時期には一定の発現量を保った後、神経細胞が他の細胞とシナプスを形成し神経突起の伸長が終了する培養 28 日目 Stage5 の神経細胞では急激な発現の減少が確認された。このことから、極性形成の初期段階および神経突起が伸長する時期にのみ Shootin1 の機能が必要とされ、神経突起伸長後の神経細胞の機能には Shootin1 はあまり関与していないと考えられる。

成長円錐内における Shootin1 の局在

Shootin1 は極性形成前の Stage2 および極性形成後の Stage3 の神経細胞において、神経突起の先端に存在する成長円錐といわれる構造体に局在している。成長円錐内には、細胞骨格の調節を行う分子や細胞膜成分の供給に関与する小胞とそれらの調節を担う分子、また神経突起伸長や退縮の方向性などを制御するガイダンス因子に対する受容体、その下流でのシグナル伝達に関与する分子が数多く存在している(Jay et al., 2000)。これら分子の働きにより神経突起の伸長が制御されている。免疫染色法による Shootin1 の成長円錐内での局在を観察したところ、Shootin1 は成長円錐内の Filopodia や Lamellipodia などの F-Actin が豊富に存在する P-Domain と呼ばれる箇所への濃縮が認められた。この Filopodia 内には F-Actin の束が存在しその先端には F-Actin の重合が起きるプラス端が存在する。さらに F-Actin の重合を制御する Capping 分子がプラス端に局在することが知られている。またその後方に存在する Lamellipodia では、F-actin の束がメッシュ状の形態をとって存在しており、F-Actin の枝分かれを担う arp2/3 や N-WASP などの分子や F-Actin 同士を架橋する分子などが局在している(Takenawa et al., 2001)。しかし P-Domain には細胞体側から伸長してきた、微小管やそのプラス端、ミトコンドリアや分泌小胞などの細胞内小器

官などは殆ど存在していない。F-Actin と Shootin1 の局在を比較すると、Filopodia 内において F-actin が比較的繊維状な形態をとり局在しているのに対して、Shootin1 は F-Actin の先端や束の周りにドット状に局在している。免疫電子顕微鏡を用いた成長円錐 Filopodia 内の局在の観察においても、Filopodia 内においてその先端や細胞膜付近に一群の局在が認められた。しかし、Filopodia 内部の F-Actin の束が存在する部位には局在は認められなかった。Shootin1 は膜貫通部位や特定のリン脂質との結合に必要とされる Domain などの存在は確認されていないことから。Shootin1 は細胞膜に存在する分子などと結合して局在していると推測される。また、免疫染色の結果、ドット状に局在することや電子顕微鏡観察の結果から、Shootin1 のシグナルが一群の集団として存在していることから、Shootin1 同士が直接もしくは他の分子を解して複合体を形成して存在している可能性が示唆される。

Shootin1 の成長円錐への輸送機構

神経細胞内において多くのタンパク質は細胞体で転写/翻訳され、機能すべき部位まで輸送されることが考えられる。軸索や成長円錐に局在する分子に関しては、微小管依存的にモータータンパク質であるキネシンにより細胞体から神経突起先端に輸送されることが知られている(Nishimura et al., 2004)。その輸送機構とは別に、Banker のグループは Wave といわれる成長円錐様の構造体が細胞体で形成され、神経突起に沿って移動し、先端まで移動することを報告している。Wave はその存在が *in vitro* のみならず *in vivo* においても確認されており、新しい形式の輸送機構であるといえる、Wave は構造的にも局在する分子の種類のにも成長円錐に酷似しており、Filopodia や Lamellipodia などの F-Actin が豊富に存在する領域がある。また、GAP-43 や Cortactin などの軸索の成長円錐に局在する分子も wave に局在し、Wave の移動にともない神経突起先端まで運ばれる(Ruthel et al., 1998)。また、アクチンの重合阻害剤である Cytochalasin D の処理により wave の移動が停止することも知られており、その輸送機構はアクチン骨格に依存していると考えられる(Ruthel et al., 1999)。免疫染色の結果、神経細胞内において Shootin1 が軸索の成長円錐および wave に局在することが確認された。さらに、EGFP-Shootin1 を用いた Time lapse 観察から、Shootin1 は細胞体から神経突起の先端まで、Wave により輸送される様子が確認された。この輸送は極性形成後の Stage3 の神経細胞のみならず、極性形成前の Stage2 の神経細胞においても確認され、Shootin1 の輸送機構である可能性が高いと考えられる。さらに、Time lapse による観察の結果、極性形成前の神経細胞において、Wave はそれぞれの神経突起にたいして、ランダムに輸送されることが見

られている。しかし、**wave** が細胞体で形成される分子機構などについては不明な点が多く残されており、その生理学的意義も解明されていない。

神経極性形成前後における Shootin1 の局在変化について

極性形成前の神経細胞では個々の未成熟な神経突起が伸長と退縮を繰り返しており、この時期の神経細胞は形態的に対称性を有している。極性形成前の Stage2 の神経細胞における Shootin1 の免疫染色および EGFP-Shootin1 を用いた Time lapse 観察の結果、神経突起の先端において Shootin1 は濃縮と消失を繰り返していた。また、神経突起先端へは Wave により輸送され、先端に濃縮したのち、神経突起の伸長が認められた。その後、神経突起先端の Shootin1 は時間と共に減少し、その後神経突起の退縮が確認された。このステップを個々の神経突起で繰り返しており、細胞は形態的に対称性を維持していた。

神経突起先端における Shootin1 量と神経突起の伸長に相関関係の有無を解析したところ、Shootin1 の量と神経突起の伸長には有意な差が認められた。Shootin1 が高濃度に存在する場合には神経突起は伸長し、低濃度に存在する場合には退縮がみとめられた。これらのことから、Shootin1 は神経突起の伸長を促進する機能を有していると考えられ、神経突起先端への Shootin1 の存在量が神経突起の伸長を調節している可能性が考えられる。

極性形成が起きる Stage2 から Stage3 への移行の際には、Shootin1 は1つの神経突起の先端に濃縮し、その神経突起の伸長が観察された。また、それ以外の神経突起からは Shootin1 が減衰する様子が観察され、神経突起の伸長も見られなかった。これらのことから極性形成が起きる時期に Shootin1 が単一の神経突起の先端に濃縮することが必要であると考えられ、それによる神経突起の伸長が神経極性形成に重要であると考えられる。

Shootin1 の過剰発現と RNAi による神経突起の伸長と極性形成の異常

神経細胞内で Shootin1 を過剰発現させた場合、まず、細胞全体での Shootin1 の存在量の増加が認められ、さらに極性形成に伴い本来は軸索先端のみに濃縮するべきだが軸索以外の神経突起の先端にも濃縮した。Shootin1 の神経突起先端への濃縮は神経突起の伸長を促進した。Shootin1 を過剰発現させた神経細胞では培養開始 24 時間および 48 時間後において、すべての神経突起の伸長が確認された。特に、2 番目以降の長さを持つ神経突起の伸長が著しく認められる。この結果は、本来は存在しないはずの神経突起先端に Shootin1 を過剰発現させたことにより濃縮し、神経突起の伸長が誘導されたものであると予測される。

特に2番目以降の神経突起の伸長に差が認められたことは、過剰発現により本来は局在していない神経突起先端に **Shootin1** の濃縮がみられたことに起因すると考えられる。さらにこの状態の神経細胞をさらに長く生育させた培養開始4日後の神経細胞では、複数本の長い神経突起の形成が認められた。これらの長い神経突起は、軸索マーカーとして一般的に利用されている **Tau-1** や **Synaptophysin** などの抗体により染色された。しかしながら、樹状突起のマーカーとして利用されている **MAP2** に対する抗体では染色は確認されなかった。これらの結果から、**Shootin1** の過剰発現により形成された複数の長い神経突起は軸索であると考えられる。過剰量の **Shootin1** が細胞内に存在することにより神経突起伸長の異常な促進と軸索への分化が誘導されたと考えられる。しかし、最も長い神経突起から4番目までに長い神経突起の総和においては、コントロールとして用いた **GST** との差は認められなかった。しかし、4番目までに長い神経突起のそれぞれの長さはコントロールと比較すると、最も長い神経突起では **Shootin1** を発現させた場合には減少が認められた。ところが、2番目から4番目以降の神経突起の長さに関しては **Shootin1** の過剰発現により増加が認められている。神経突起が伸長する際には細胞骨格の編成や細胞膜の拡張に伴う膜成分の供給が必要であり、それらの分子の活性を調節するシグナル分子の活性化も必要であると予測される。**Shootin1** の神経突起先端への濃縮が他の分子の活性に必要であると推測した場合、**Shootin1** を過剰に発現させた細胞の場合には、軸索になる神経突起以外の殆どすべての神経突起の先端に **Shootin1** の濃縮がおき、神経突起が伸長し軸索へ分化に対して誘導的に働くと考えられる。ところが他の神経突起の伸長に必要とされる分子の量は細胞内で限られたものであるため、本来は単一の神経突起先端に濃縮されるべきものが、多くの神経突起の先端に分散して存在すると考えられる。つまり細胞全体としての神経突起の伸長を促進する分子の量に変動が生じなくても、局所的な量が減少しており神経突起伸長を促進する不足した状態にあると考えられる。

しかし、培養開始24時間や48時間後の比較的初期の神経細胞においては、すべての神経突起の伸長が有意に認められており、培養開始4日後の場合とは異なる結果が得られている。この原因としては、培養初期の段階では神経突起の伸長に関与する分子の量自体に比較的余裕があること。もしくは、神経突起の長さが短く細胞の体積が比較的小さいことにより、分子の濃度自体も比較的高いためと推測される。

過剰発現とは対照的に **RNAi** 法により **Shootin1** の発現抑制を行った細胞では、極性形成に遅れが生じる結果が得られ、神経突起の長さにも有意に抑制されていた。この際の神経突起の伸長の抑制は最も長い神経突起のみで抑制の効果が見られており、それ以外の短い神経突起ではコントロールと比較して突起伸長

に対して抑制は示さなかった。これは本来、Shootin1 は単一の神経突起に濃縮し突起伸長の誘導と軸索への分化を促進するが、それ以外の神経突起は Shootin1 が濃縮しておらず伸長も誘導されない。RNAi による発現抑制では Shootin1 が濃縮し、伸長する神経突起に対してのみに効果が現れていると考えられる(図 32)。

Shootin1 の過剰発現により軸索の形成促進ならびに発現抑制により極性形成の阻害されることから、Shootin1 は神経極性の形成に重要な役割を担っていると考えられる。

PI3-kinase との関係

PI3-kinase は神経極性のみならず、他の細胞においても増殖、分化、遊走、など多くの生理現象に関与しており極めて重要な分子であると考えられる(Wang et al., 2002, Xu et al., 2003)。培養海馬神経細胞の極性形成における PI3-kinase の役割については数多くの報告がなされており極性形成に重要な分子であると考えられる。PI3-kinase の触媒サブユニットにミリスチル化シグナルを付加し強制的に細胞膜に移行させたタンパク質を神経細胞内で発現させると、本来は単一に形成されるべき軸索が複数形成される。また PI3-kinase の反応産物である PIP3 により活性化される Akt の活性型変異体、Rho Family small GTPase に対するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の一つである STEF の活性型、それらにより GDP から GTP への交換反応を触媒される Cdc42 や Rac1 の活性型変異体の発現により極性形成に乱れが生じ、過剰な軸索が形成される知見が得られている(Yoshimura et al., 2006, Jiang et al., 2005)。これらの分子の活性化は最終的に Actin、Tubulin などの細胞骨格を調節する分子を制御し、神経突起の伸長を促進する働きを担っている。

極性形成前の神経細胞では PI3-kinase の活性化は個々の神経突起間で対称的に起きていると考えられる。しかし、極性形成時期には単一の神経突起の先端で活性化し、下流分子の活性化を引き起こすことにより神経突起の伸長を促進する。極性形成前の神経細胞に PI3-kinase の特異的阻害剤である LY294002 や Wortmannin で処理すると、神経極性の形成が抑制されるとの報告からも、PI3-kinase の活性化が極性形成には必要であると考えられる。また極性形成前の神経細胞においてラミニンでコーティングしたビーズを神経突起の先端に接触させると、接触した神経突起先端で PI3-kinase の活性化が生じ神経突起の伸長が促進させる(Menager et al., 2004)。この報告からも、単一の神経突起内で PI3-kinase の活性が向上することにより、極性形成が誘導されると考えられる。

PI3-kinase は受容体チロシンキナーゼの活性化による自己リン酸化によって、

直接もしくは、アダプタータンパク質を解して活性化を受ける、また活性化した Ras との結合によっても活性化を受けて PIP3 を産生し、下流分子にシグナルを伝達することが知られている。しかしながら、受容体や接着分子などにより PI3-kinase が活性化される機構に関しては神経細胞のみならず、多くの細胞において理解が進んでいるが、細胞内自立的な活性化機構とそれによる神経細胞の極性形成の分子機構については全く知られていない。本研究のみならず、多くの神経極性について研究は *in vitro* による実験系が行われている。この条件下においては神経細胞は空間的に均一な細胞外環境下にあり、個々の神経突起間で細胞外からのシグナルを等しく受け取っていると考えられる。しかし、この条件下においても、1本の神経突起が選択的に伸長し軸索へ分化することは、細胞内に存在する分子による影響がされる。しかしこれまでのところそのような機能を担う分子の報告はなされておらず、神経極性形成のシグナル伝達機構は PI3-kinase が最も上流に位置すると考えられてきた。

PI3-kinase の活性を上昇させた場合と Shootin1 を過剰発現させた場合の神経極性に及ぼす表現型および、PI3-kinase 活性を阻害した場合と RNAi により Shootin1 の発現抑制を行った神経細胞の表現型は極めて似ており、Shootin1 の PI3-kinase のシグナルカスケードへの関与が予想された。免疫沈降法による相互作用の確認から、Shootin1 と PI3-kinase との相互作用が確認された。しかし、この相互作用は神経細胞内のみであり、HEK293T 細胞内で Shootin1 と PI3-kinase を発現させた場合には両者の相互作用は確認されなかった。この結果は、Shootin1 と PI3-kinase との相互作用は直接ではなく神経細胞内で発現するなんらかの分子を介在して相互作用していると考えられる。

細胞内における Shootin1 の局在と、PI3-kinase の活性化の指標として用いられている 439 番目のセリン残基がリン酸化された Akt の局在との比較から、Shootin1 の濃縮した神経突起の先端において PI3-kinase との相互作用が生じ局所的な活性化を誘導していると考えられる。本来は1本の神経突起先端に Shootin1 が濃縮し、その神経突起が伸長し、軸索へと分化するが、Shootin1 の過剰発現細胞においては、殆どの神経突起の先端に Shootin1 の濃縮が認められ、同時に PI3-kinase の活性化が誘導されている。また、Shootin1 を発現抑制した神経細胞の場合には、当然ながら、神経突起先端で Shootin1 の濃縮は認められない、この条件では、PI3-kinase の活性化も神経突起の先端では認められない。これらの結果は Shootin1 の神経突起先端の局在が PI3-kinase の局所的な活性化に関与することが考えられる。では Shootin1 は PI3-kinase のシグナルに対してどのように機能しているのだろうか？この問題について、本研究で得られた3つの結果から考察したい。まず、PI3-Kinase 活性を阻害した場合の Shootin1 の局在および軸索形成機構についてである。PI3-kinase 活性を特異的阻害剤で

ある LY294002 で阻害した場合に、神経突起先端において、pAkt の染色の低下が認められたが、Shootin1 の軸索先端への Shootin1 への濃縮には変化が認められなかった。このことは、Shootin1 の神経突起先端への輸送および成長円錐内での局在化状態の維持には PI3-kinase の活性が必要ないと考えられる。さらに、Shootin1 の過剰発現による過剰軸索の形成促進は PI3-kinase の阻害剤である LY294002 により有意に抑制されたことである。これは、Shootin1 が PI3-kinase のシグナルを経由している可能性を示唆している。加えて、PI3-kinase の活性型変異体の過剰発現細胞において RNAi により Shootin1 の発現抑制を行った場合には、過剰軸索の形成に対して影響を及ぼさなかった。以上の結果から Shootin1 は PI3-kinase の上流で機能し、PI3-kinase のシグナル経路を活性化させることにより神経極性形成に関与すると考えられる。

Shootin1 による神経極性形成のモデル

これらのことから Shootin1 の神経極性形成への関与に対して次のようなモデルが提唱できる(図 33、34)。極性形成前の神経細胞では、Shootin1 は細胞体から未熟な神経突起の先端に輸送される。神経突起の先端で PI3-kinase と相互作用し活性を誘導させ、反応産物である PIP3 を産生する。PIP3 はその下流で Akt や Rho family GTPase の活性化を誘導し、細胞骨格調節分子に働きかけることで神経突起の伸長を促進する。その後、Shootin1 の発現量が上昇し、神経突起先端への輸送される量も上昇する、神経突起先端への Shootin1 の存在量の上昇は更なる神経突起の伸長を促進する。他の神経突起より長く伸びた単一の神経突起は andersen らのモデルで提唱されている、Self Promoting signal と Growth Inhibitory signal を増加させると考えられる。この神経突起先端では Shootin1 の局在は安定的となり、持続した濃縮が続く、神経突起の伸長が促進される。それ以外の神経突起が伸長しない原因として Shootin1 が Wave により輸送されないこと。もしくは、輸送されても迅速に神経突起先端から消失することが考えられる。そのため、Shootin1 が単一の神経突起に濃縮し伸長した場合には、Feedback loop を介して単一の神経突起先端への濃縮と伸長がおき、それ以外の神経突起先端への濃縮と伸長は生じないと予測される。

本研究において、Shootin1 の非対称的な局在化が PI3-kinase の局所的な活性化を誘導することにより、神経細胞の極性形成に関与することが示唆された。しかしながら、PI3-kinase が活性化される詳細な分子機構に関しては不明な点が多く残されている。今後、Shootin1 と相互作用する分子の同定や機能解析を行うことにより、理解が進む可能性がある。また、極性形成に伴い、Shootin1 が単一の神経突起先端に濃縮する機構に関しても、未だ不明な点が多く残され

ており、更なる解析が必要とされる。これらの疑問が解決することは、神経細胞の極性形成機構の理解につながると期待できる。

＜謝辞＞

本研究を進めるにあたって、何不自由ない研究環境を与えてくださり、数々の御助言を賜った本学細胞内情報学講座の伊東広教授に深く感謝申し上げます。直接の指導教官である本学細胞内情報学講座の稲垣直之助教授には、未熟な私に対しお忙しい中いつも丁寧な指導と有意義なディスカッションの時間を設けてくださり心より感謝しております。細胞内情報学講座、山内淳司助手、水野憲一助手、島田忠之助手、多胡憲治助手には研究の没頭できるような研究室の環境設定などを気遣っていただき、大変感謝しております。

そして、二次元電気泳動法の立ち上げと私にご指導を頂いた卒業生の野村英子さん勝田和大さんには本研究を進めていく過程で数多くのお力添えをいただき、大変感謝しております。なかでも、Shootin1 の研究チームにあった、島田忠之助手、勝田和大さん、金村星日さん、光葉麻理さん、植村郁里さん、宮坂友梨さんには研究を進める上で有意義な情報交換を行うことができ、研究の展開に大きく貢献したことを感謝いたします。

タンデム型質量分析形によるタンパク質スポットの同定に関しては、南デンマーク大学の Peter Roepstorff 教授、エーザイ株式会社の石濱泰さん、MALDI-TOF MS (voyager) の使用に関しては本学技官の塚本順子さんに、In-Gel Digestion 法に関しては、本学技官の桑野晶喜さん横田直彦さんに、ご指導と助言を頂いたことを感謝しております。

電子顕微鏡の使用に関しては、本学、細胞間情報学講座の岩野恵助手、細胞構造学講座の中村雪子さんに心より感謝を申し上げます。

最後に、長期間の学生生活を経済的に支えてくれた両親、および多くの喜びと苦しみを共に感じ励ましあった友人にこころより感謝をささげます。

<参考文献>

Andersen, S.S., and Bi, G.Q. (2000). Axon formation: a molecular model for the generation of neuronal polarity. *Bioessays* 22,172-179.

Arimura, N., Menager, C., Fukata, Y., Kaibuchi, K. (2004). Role of CRMP-2 in neuronal polarity. *J Neurobiol.* 58, 34-47.

Banker, G. (2003). Pars, PI 3-kinase, and the establishment of neuronal polarity. *Cell* 112, 4-5.

Bradke, F., and Dotti, C.G. (1999). The role of local actin instability in axon formation. *Science* 283, 1931-1934.

Bradke, F., and Dotti, C.G. (2000). Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 10, 574-581.

Craig, A. M., and Banker, G. (1994). Neuronal polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 267-310.

Da Silva, J.S., and Dotti, C.G. (2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 694-704.

Dotti, C.G., and Banker, G.A. (1987). Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature* 330, 254-256.

Dotti, C.G., Sullivan, C.A., and Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 8, 1454-1468.

Esch, T., Lemmon, V., and Banker, G. (1999). Local presentation of substrate molecules directs axon specification by cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19, 6417-6426.

Fukata, Y., Kimura, T., and Kaibuchi, K. (2002). Axon specification in hippocampal neurons. *Neurosci Res.* 43, 305-315.

Fukata, Y., Itoh, T.J., Kimura, T., Menager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H., and Kaibuchi, K. (2002). CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat. Cell Biol.* 4, 583-591.

Gharahdaghi F, Weinberg CR, Meagher DA, Imai BS, Mische SM (1999). Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis.* 3, 601-5.

Goslin, K., and Banker, G. (1989). Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Cell Biol.* 108, 1507-1516.

Goslin, K., and Banker, G. (1990). Rapid changes in the distribution of GAP-43 correlate with the expression of neuronal polarity during normal development and under experimental conditions. *J. Cell Biol.* 110, 1319-1331.

Horton, A.C., and Ehlers, M.D. (2003). Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40, 277-295.

Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M., and Kaibuchi, K. (2001). CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 781-782.

Inagaki, N., and Katsuta, K. (2004). Large gel two-dimensional electrophoresis: improving recovery of cellular proteome. *Curr. Proteomics* 1, 35-39.

Jay, DG. (2000). The clutch hypothesis revisited: ascribing the roles of actin-associated proteins in filopodial protrusion in the nerve growth cone. *J Neurobiol.* 44, 114-125.

Jiang, H., Guo, W., Liang, X., and Rao, Y. (2005). Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators. *Cell* 120, 123-135.

Kay, BK., Williamson, MP., and Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 14, 231-241.

Lamoureux P, Ruthel G, Buxbaum RE, Heidemann SR. (2002). Mechanical tension can specify axonal fate in hippocampal neurons. *J Cell Biol.* (2002). 159, 499-508.

Menager, C., Arimura, N., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. (2004). PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *J. Neurochem.* 89, 109-118.

Mortz, E., Krogh, T.N., Vorum, H., Gorg, A. (2001). Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* 1, 1359-1363

Mundigl, O., Ochoa, GC., David, C., Slepnev, VI., Kabanov, A. De., and Camilli, P. (1998). Amphiphysin I antisense oligonucleotides inhibit neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.* 18, 93-103.

Nishimura, T., Kato, K., Yamaguchi, T., Fukata, Y., Ohno, S., Kaibuchi, K. (2004). Role of the PAR-3-KIF3 complex in the establishment of neuronal polarity. *Nat Cell Biol.* 6, 328-334.

Nishimura, T., Yamaguchi, T., Kato, K., Yoshizawa, M., Nabeshima, Y., Ohno, S., Hoshino, M., Kaibuchi, K. (2005). PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat. Cell Biol.* 7, 270-277.

Nomura, E., Katsuta, K., Ueda, T., Toriyama, M., Mori, T., and Inagaki, N.

(2004). Acid-labile surfactant improves in-solution dodecyl sulfate polyacrylamide gel protein digestion for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide mapping. *J. Mass Spectrometry* 39, 666-672.

Oguri, T., Takahata, I., Katsuta, K., Nomura, E., Hidaka, M., and Inagaki, N. (2002). Proteome analysis of rat hippocampal neurons by multiple large gel two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2, 666-672.

Osen-Sand, A., Catsicas, M., Staple, JK., Jones, KA., Ayala, G., Knowles, J., Grenningloh, G., and Catsicas, S. (1993). Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides in vitro and in vivo. *Nature* 364, 445-448.

Rolls, M.M., and Doe, C.Q. (2004). Baz, Par-6 and aPKC are not required for axon or dendrite specification in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* 7, 1293-1295.

Ruthel, G., and Banker, G. (1998). Actin-dependent anterograde movement of growth-cone-like structures along growing hippocampal axons: a novel form of axonal transport? *Cell Motil. Cytoskeleton* 40, 160-173.

Ruthel, G., and Banker, G. (1999). Role of moving growth cone-like "wave" structures in the outgrowth of cultured hippocampal axons and dendrites. *J Neurobiol.* 39, 97-106.

Schwamborn, J.C., and Puschel, A.W. (2004). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat. Neurosci.* 7, 923-929.

Shi, S.H., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112, 63-75.

Shi, S.H., Cheng, T., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2004). APC and GSK-3 β are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr. Biol.* 14, 2025-2032.

Takenawa, T., Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci.* 114, 1801-1809.

Wang, F., Herzmark, P., Weiner, O.D., Srinivasan, S., Servant, G., and Bourne HR. (2002). Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. *Nat. Cell Biol.* 4, 513-518.

Wedlich-Soldner, R., Altschuler, S., Wu, L., and Li, R. (2003). Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42 GTPase. *Science* 299, 1231-1235.

Winckler, B., and Mellman, I. (1999). Neuronal polarity: controlling the sorting and diffusion of membrane components. *Neuron* 23, 637-640.

Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K. (2005). GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* 120,137-149.

Yoshimura, T., Arimura, N., and Kaibuchi, K. (2006). Signaling networks in neuronal polarization. *J Neurosci.* 26, 10626-10630.

Yoshimura, T., Arimura, N., Kawano, Y., Kawabata, S., Wang, S., Kaibuchi, K., (2006). Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3 β /CRMP-2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 340, 62-68.

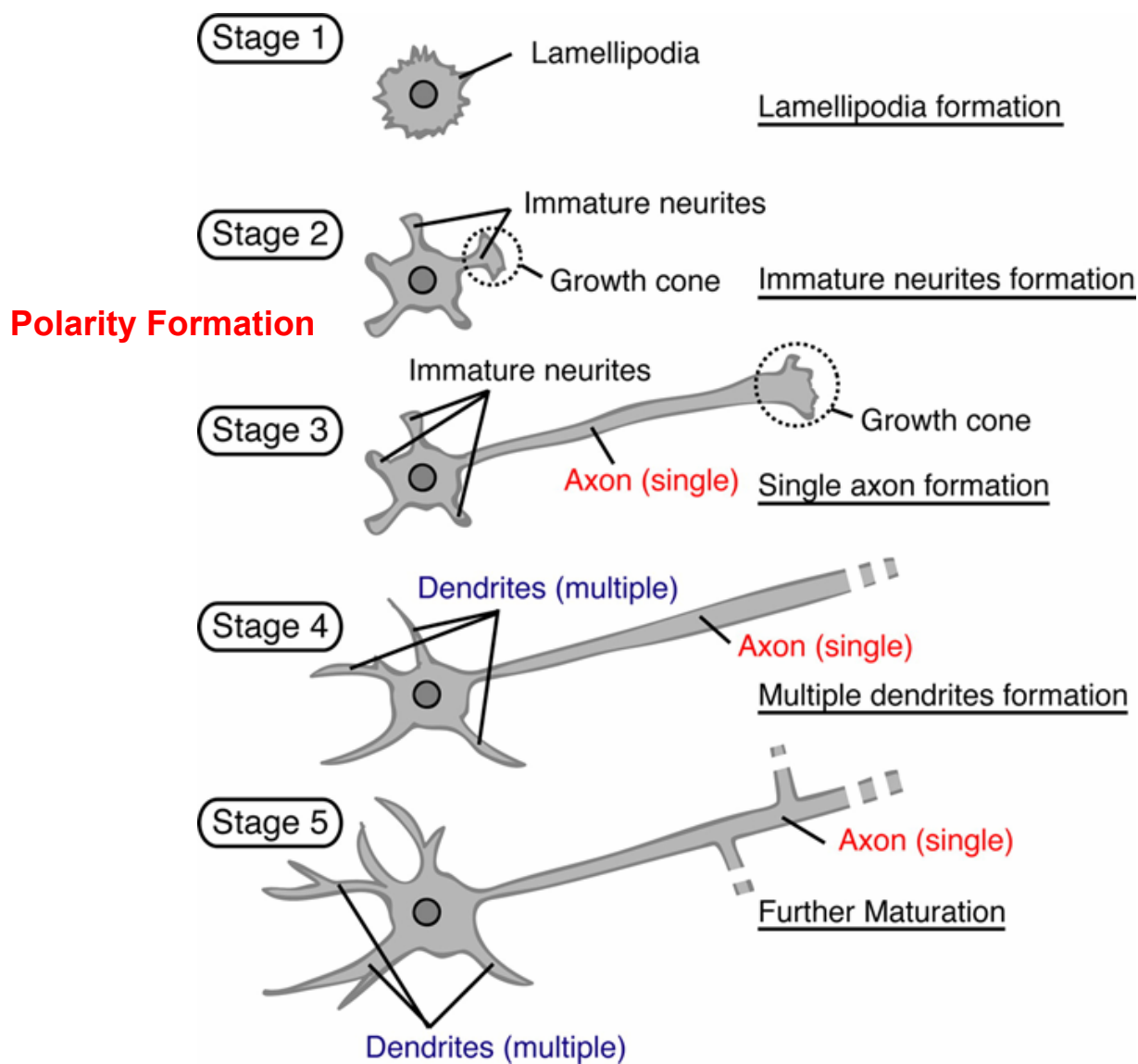


図1. 培養海馬神経細胞の発生段階と極性形成過程
Yoshimura et al., 2006より改変

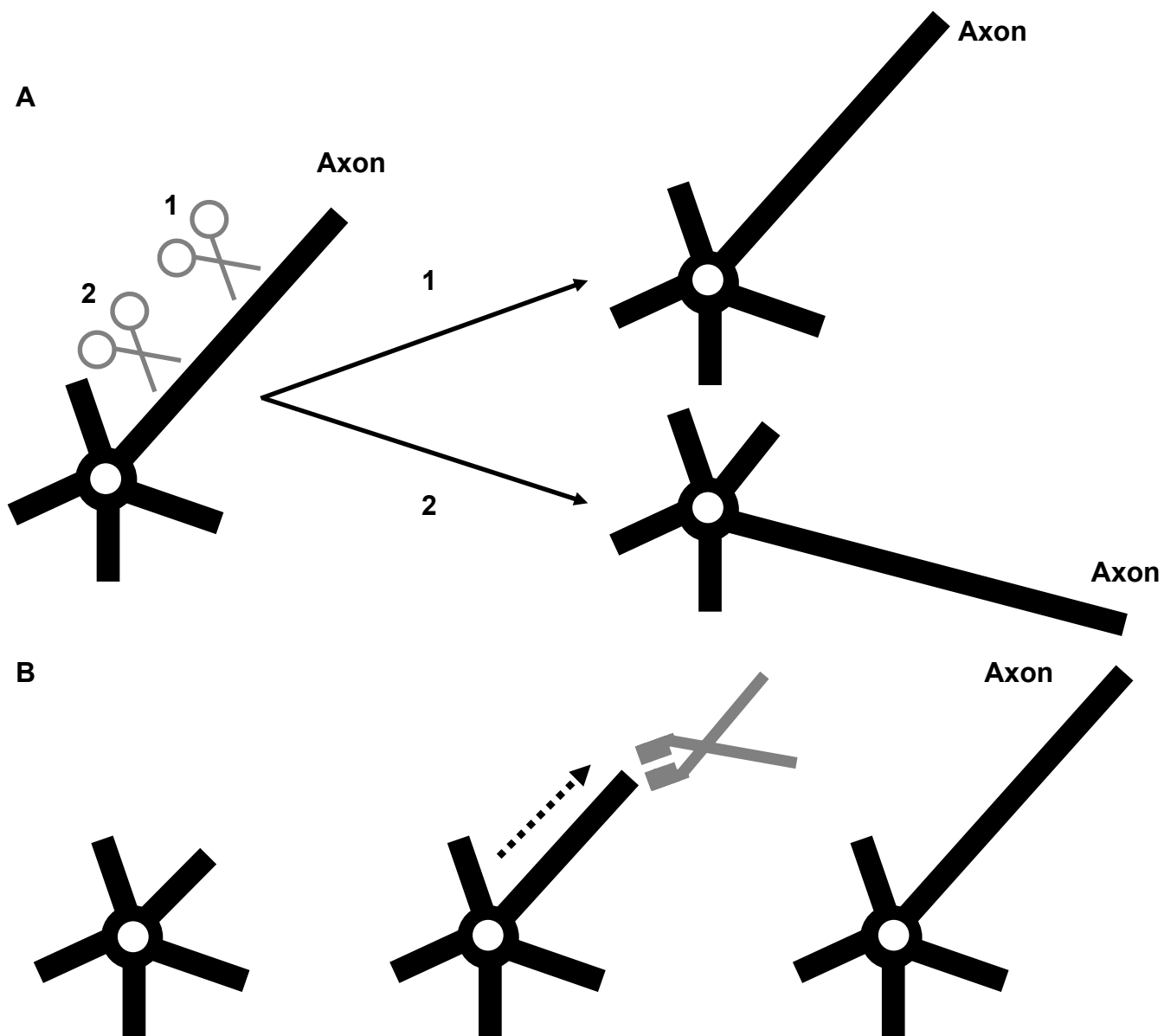


図2. 神経突起の長さが極性形成に及ぼす影響

A：軸索切断後の極性形成の違い

軸索を他の神経突起よりも長く切断した場合には、もとの突起が軸索へと分化する(1)。軸索を他の神経突起とほぼ同じ長さに切断した場合には軸索への分化がランダムに起きる(2)。

B：極性形成前の神経突起を人為的に伸長させた場合の極性形成

人為的に伸長させ、他の神経突起よりも長くした場合には、その神経突起が軸索に分化する。

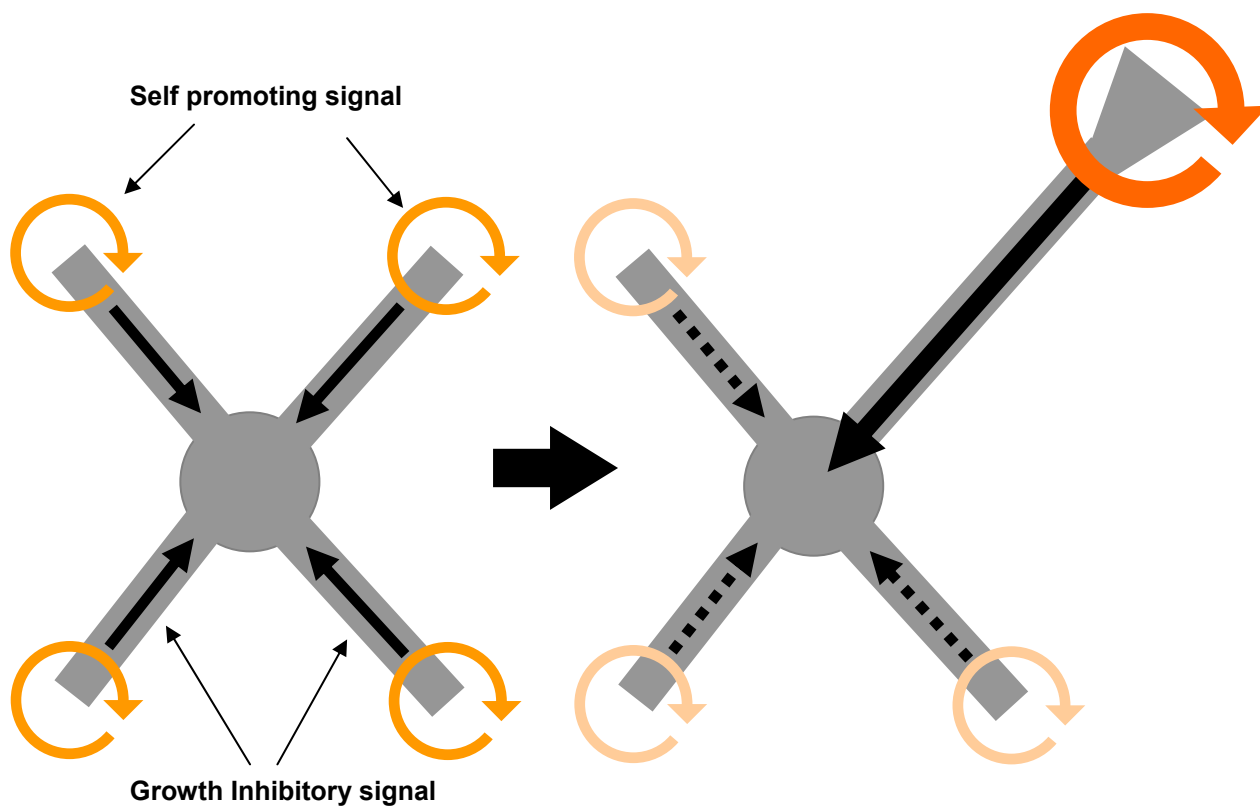


図3. 神経突起の長さが極性形成に及ぼす影響の概念モデル

Stage2の神経細胞では個々の突起の長さが等しく、同程度のSelf promoting signal(黒矢印)とGrowth inhibitory signal(丸矢印)を有している(図左)。しかし1本の神経突起が他より長く伸長した場合には、Self promoting signalとGrowth inhibitory signalを同時に増加させることでPositive feedbackが働き、神経突起が断続的に伸長する。

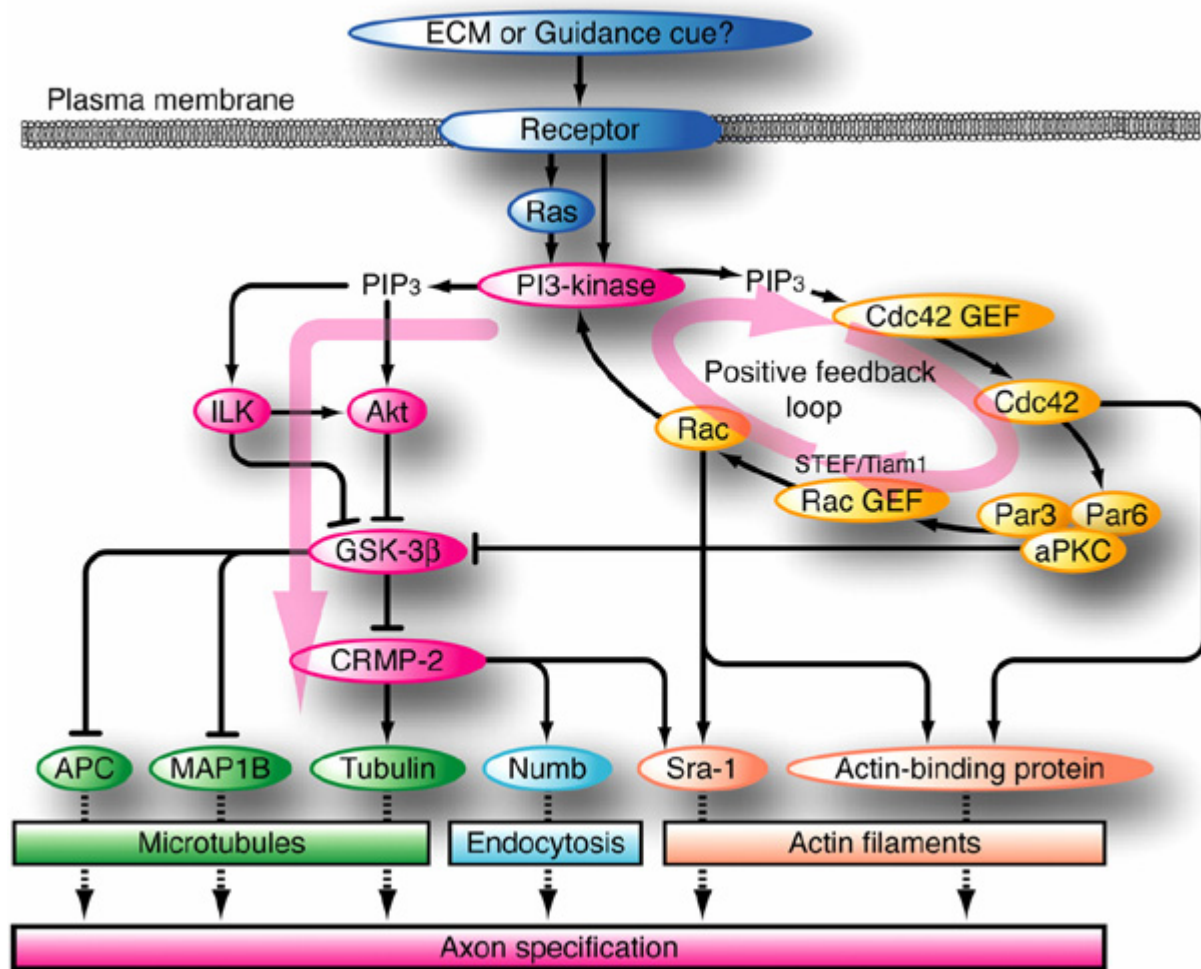


図4. 神経極性形成に関するシグナル伝達機構

Yoshimura et al., 2006より転載

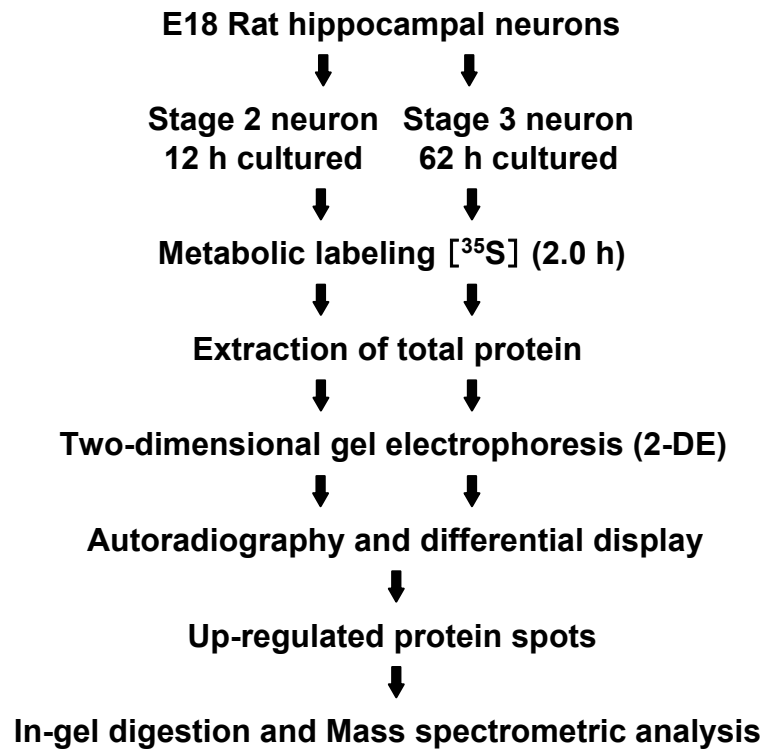
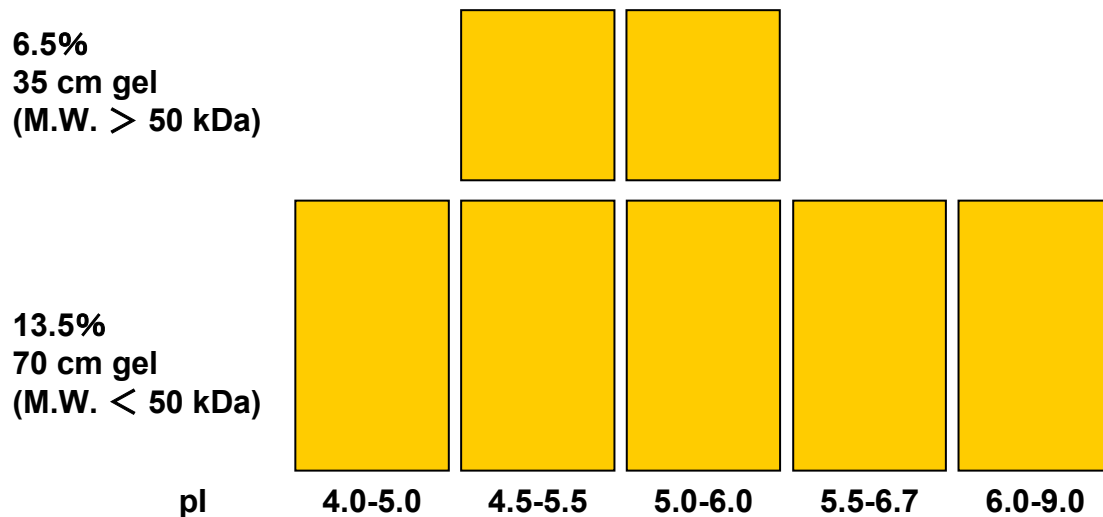


図5. プロテオーム解析による極性形成関連因子のスクリーニング方法

A



B

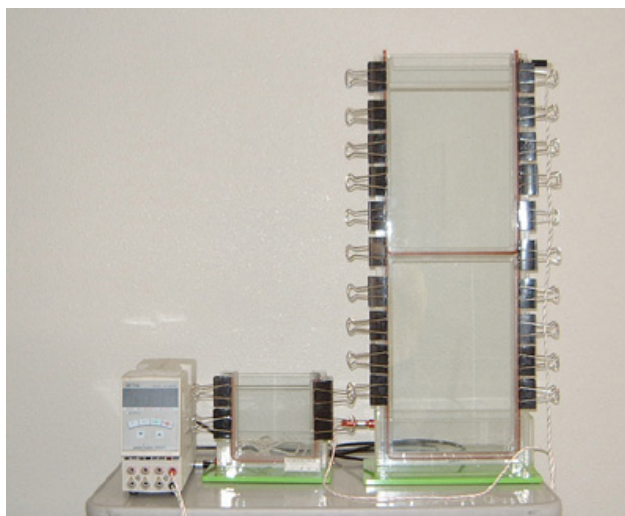


図6. 2次元電気泳動によるスクリーニング

A : 2次元電気泳動によるスクリーニングの範囲

分子量50 kDa以下のタンパク質スポットに関しては13.5 % アクリルアミドゲルを用い等電点4.0～9.0の範囲においてスクリーニングを行い、比較的高分子量側のタンパク質が多く存在した等電点4.5～6.0に関しては6.5%アクリルアミドゲルを用いたスクリーニングも行った。

B : 実験に用いた2次元電気泳動ゲルシステム（写真右）

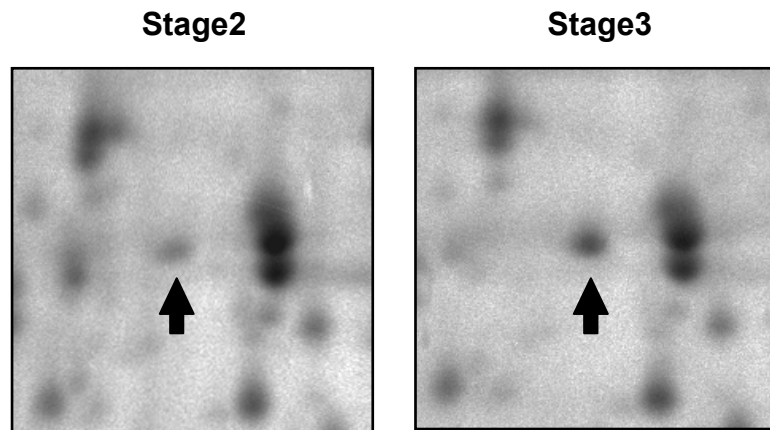
全検出タンパク質スポット	6,197 spots
極性形成に伴い強度上昇	277 spots (4.5%)
極性形成に伴い強度減少	265 spots (4.3%)
同定タンパク質スポット	95 / 277 spots

表1. 神経極性形成に伴うタンパク質スポットの変動

分類	スポット数（個）
細胞骨格細胞接着関連分子	23
代謝関連分子	19
タンパク質膜輸送関連分子	14
タンパク質合成分解関連分子	12
シグナル伝達分子	12
その他、機能未知	15
全同定タンパク質スポット数	95/277

表2 質量分析法により同定された極性形成に伴い発現上昇する分子のカテゴリー別の数

A



B

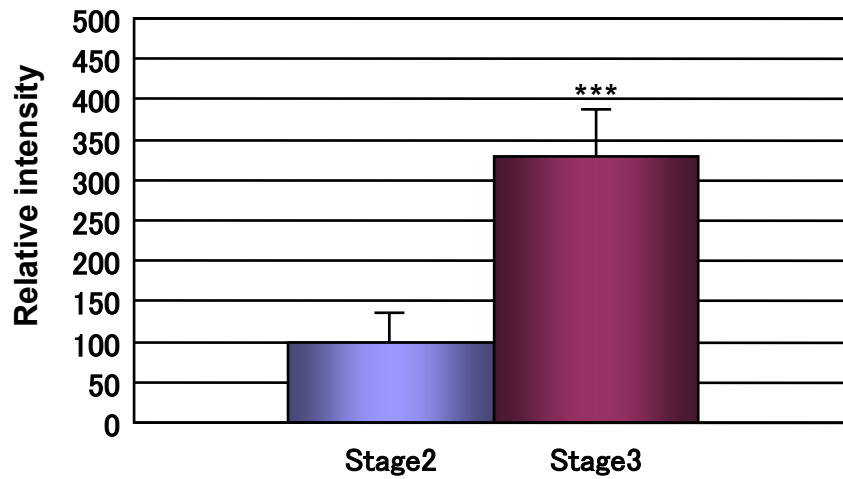
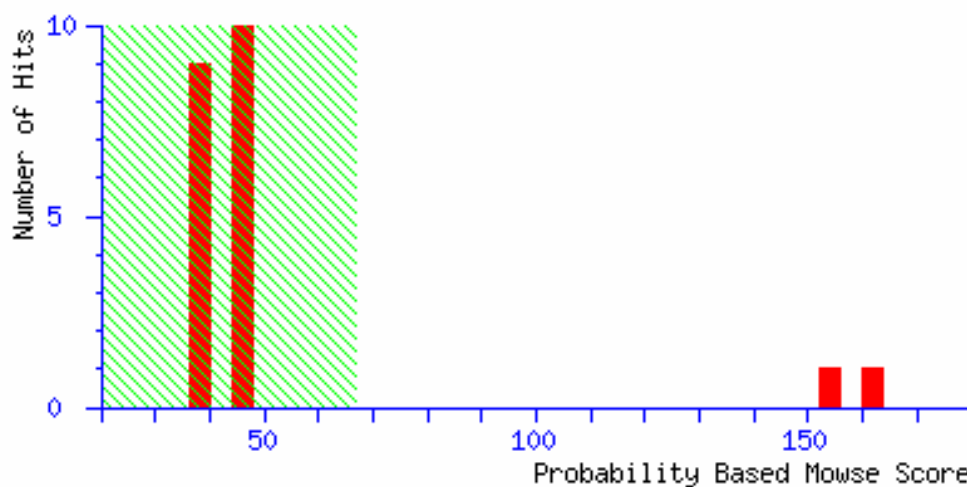


図7. 神経細胞の極性形成に伴うShootin1タンパク質スポットの変動

A : 2次元電気泳動ゲル上でのShootin1のタンパク質スポット (矢印)

B : ゲル上でのShootin1のSpot強度を定量化したもの

Stage2での値を100としたときの相対値を示す



1. [gi|10047271](#) Mass: 51784 Score: **120** Expect: 2.7e-07 Peptides matched: 14
KIAA1598 protein [Homo sapiens]

Number of mass values searched: 23

Number of mass values matched: 14

Sequence Coverage: 23%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

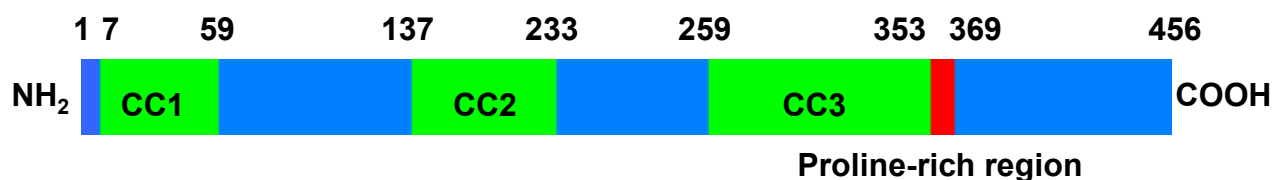
1  QLITSLKEQA IGEYEDLRAE NQKTKEKCDK IRQERDEAVK KLEEFQKISH
51 MVIEEVNFMQ NHLEIEKTCR ESAEALATKL NKENKTLKR SMLYMAKLGP
101 DVITEEINID DEDSTTDTDG AAETCVSVQC QKQIKELRDQ IVSVQEEKKI
151 LAIELENLKS KLVEVIEEVN KVKQEKTVLN SEVLEQRKVL EKCNRVSMLA
201 VEEYEEMQVN LELEKDLRKK AESFAQEMFI EQNKLRQSH LLLQSSIPDQ
251 QLLKALDENA KLTQQLEEER IQHQQKVKE EEQLENETLH KEIHNKQQL
301 ELLEEDKKEL ELKYQNSEK ARNLKHSVDE LQKRVNQSEN SVPPPPPPPP
351 PLPPPPPNPI RSLMSMIRKR SHPSGSGAKK EKATQPETTE EVTDLKRQAV
401 EEMMDRIKKG VHLRPVNQTA RPKTKPESSK GCESAVDELK GILASQ

```

図8. 質量分析法によるShootin1 (KIAA1598) の同定

質量分析法により検出されたペプチド断片の質量をMascot検索した結果アミノ酸配列内の赤字の箇所が検出されたペプチド断片をしめす。

A



B

1 MNSSEEEKQL QLITSLKEQA IGEYEDLRAE NQKTKEKCDK IRQERDEAVK
 51 KLEEFQKISH MVIEEVNFMQ NHLEIEKTCR ESAEALATKL NKENKTLKRI
 101 SMLYMAKLGPDVITEEINID DDDPATDTDA AAETCVSVQC QKQIKELRDQ
 151 IVSVQEEKKV LAIELENLKS KLGEVMEEVN KVKQEKAVLN SEVLEQRKVL
 201 EKCNRVSMLA VEEYEELQVN LELEKDLRKK AESFAQEMFI EQNKLKRQSH
 251 LLLQSSLPDQ QLLKALDEN KLIQQLEEEER IQHQKKVKEL EERLENEALH
 301 KEIHNLRQQL ELLEDDKREL EQKYQSSEEK ARNLKHSVDE LQKRVNQSEN
 351 **SVPPPPPPP PLPPPPNP**I RSLMSMIRKR SHPSGNSAKK EKTTPETAE
 401 EVTDLKRQAV EEMMDRIKKG VHLRPVNQTA RPKAKPDSLK GSESAVDELK
 451 GILASQ

図9. 新規分子Shootin1のDomain構造およびアミノ酸配列

A : Shootin1のDomain構造を模式的に現した図

B : Shootin1 (Rat) のアミノ酸配列

青字で示す箇所はCoiled-coil領域、赤字で示す箇所はProline-rich region、下線はLeucine zipperを示す。

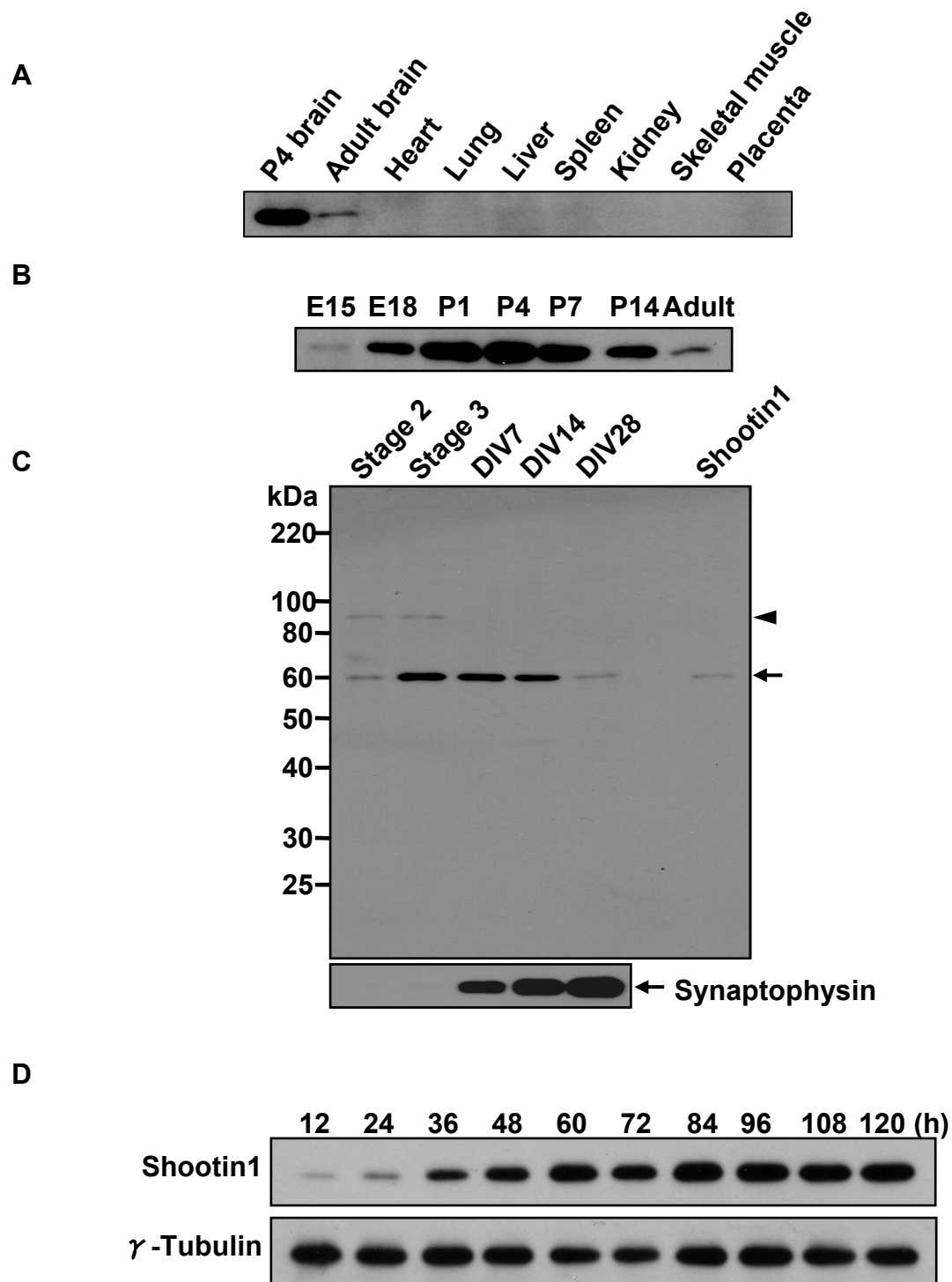


図10. Shootin1の発現組織および発現時期の解析

A：成体ラットの各組織におけるShootin1の発現

B：ラット全脳の発生段階の違いにおけるShootin1の発現

C：初代培養海馬神経細胞におけるShootin1の発現（矢印）、およびShootin2の発現（矢頭）

右端のレーンは大腸菌で発現させ精製したShootin1を泳動

D：初代培養海馬神経細胞の極性形成時期におけるShootin1の発現

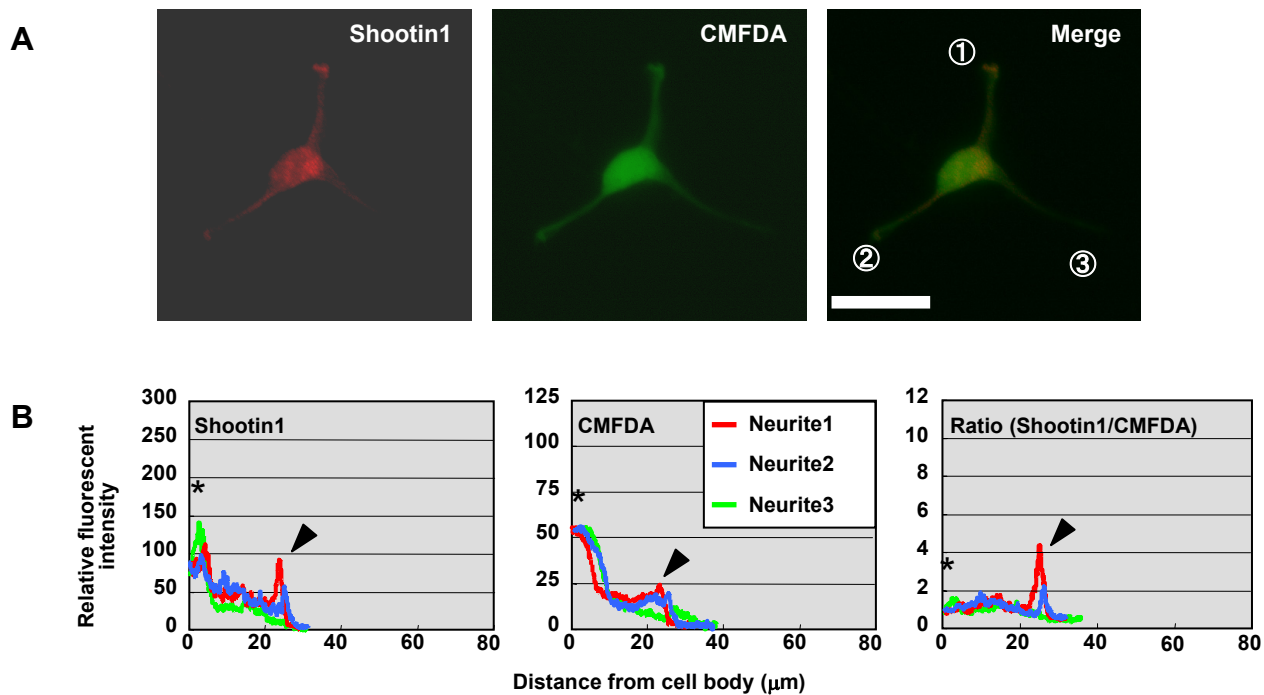


図11. 神経極性前の培養海馬神経細胞におけるShootin1の細胞内局在

A：極性形成前の神経細胞におけるShootin1の細胞内局在

写真左（赤）：抗Shootin1抗体による免疫染色

写真中央（緑）：CMFDA染色像

写真右：抗Shootin1抗体による免疫染色像とCMFDA染色像を重ね合わせたもの

Bar：20 μm

B：蛍光強度をグラフ化したもの

グラフ左：抗Shootin1抗体による免疫染色

グラフ中央：CMFDA染色像

グラフ右：Ratio（Shootin1の蛍光強度をCMFDAの蛍光強度で除算したもの）

*は細胞体中心、矢頭は神経突起の先端部を示す

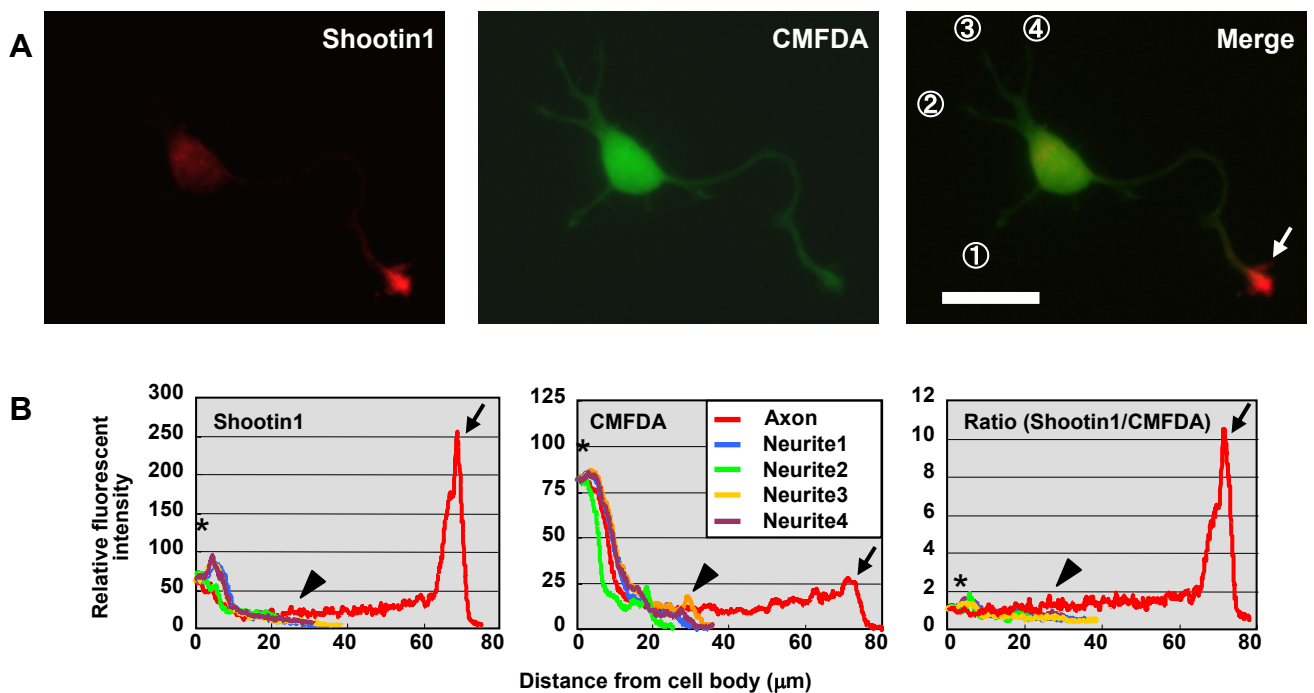


図12. 神経極性後の培養海馬神経細胞におけるShootin1の細胞内局在

A：極性形成後の神経細胞におけるShootin1の細胞内局在

写真左（赤）：抗Shootin1抗体による免疫染色

写真中央（緑）：CMFDA染色像

写真右：抗Shootin1抗体による免疫染色像とCMFDA染色像を重ね合わせたもの

Bar：20 μm

B：蛍光強度をグラフ化したもの

グラフ左：抗Shootin1抗体による免疫染色

グラフ中央：CMFDA染色像

グラフ右：Ratio（Shootin1の蛍光強度をCMFDAの蛍光強度で除算したもの）

*は細胞体中心、矢印は軸索先端、矢頭は軸索以外の神経突起の先端を示す。

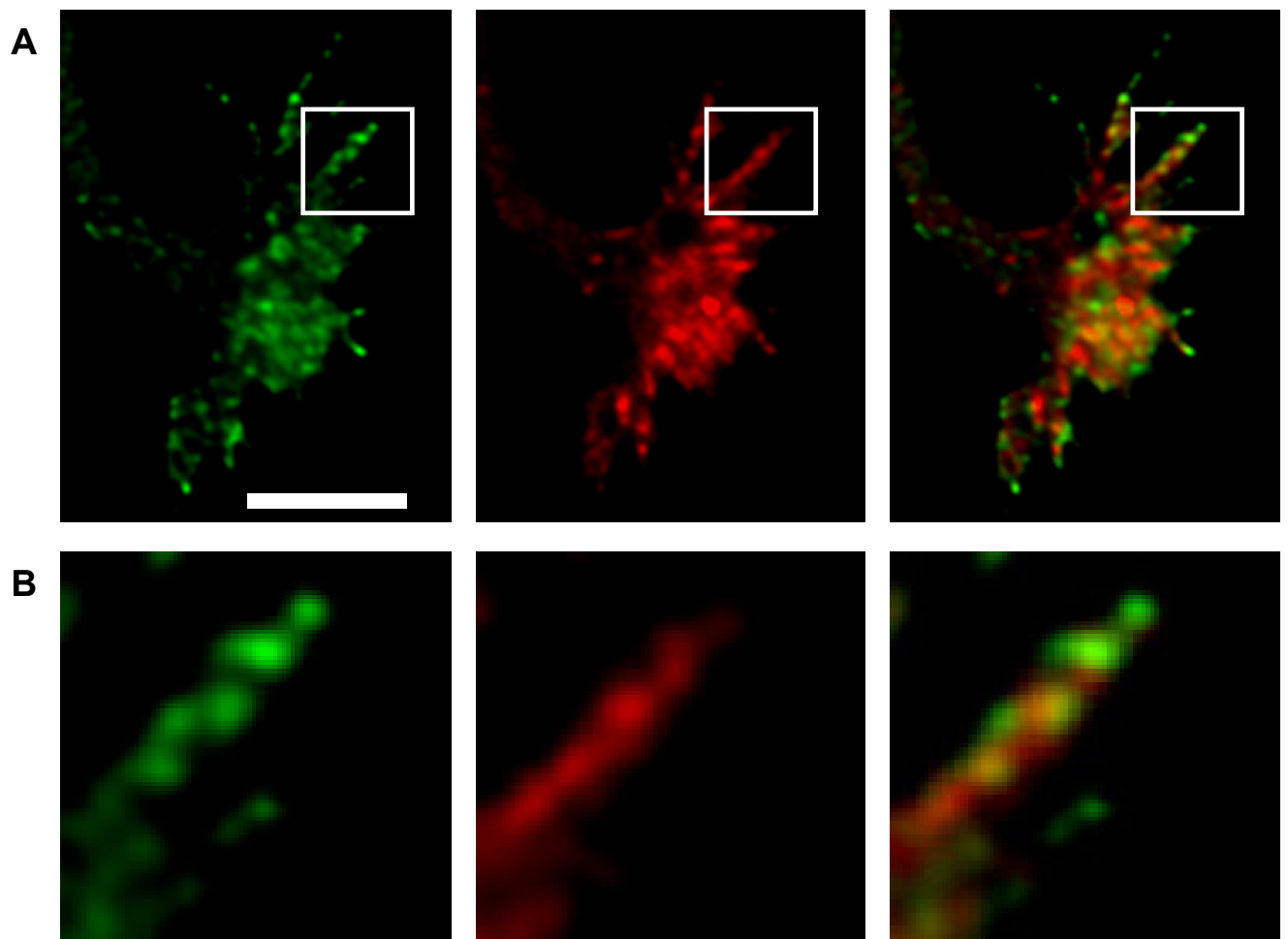


図13. 成長円錐におけるShootin1の局在

A : 軸索の成長円錐におけるShootin1およびF-Actinの局在の比較

写真左 : 抗Shootin1抗体による免疫染色像

写真中央 : Rhodamin-PhalloidinによるF-Actinの染色像

写真右 : 抗Shootin1抗体による免疫染色像とF-Actinの染色像を重ね合わせたもの

Bar : 5 μ m

B : Aの白枠内に存在するFilopodiaを拡大したもの

写真左 : 抗Shootin1抗体による免疫染色像

写真中央 : Rhodamin-PhalloidinによるF-Actinの染色像

写真右 : 抗Shootin1抗体による免疫染色像とF-Actinの染色像を重ね合わせたもの

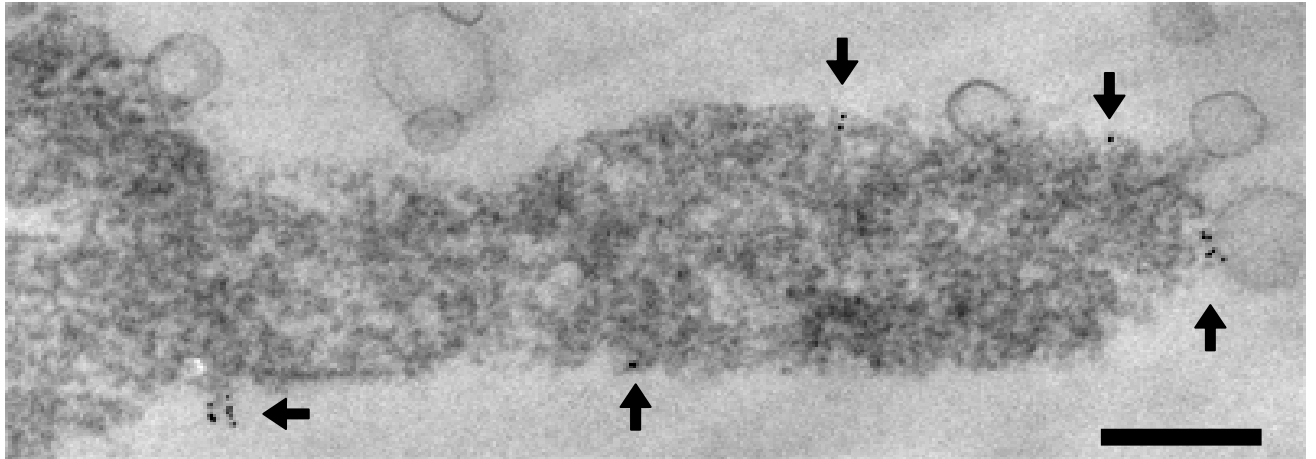


図14. 成長円錐Filopodia内におけるShootin1の局在

成長円錐のFilopodiaにおける免疫電子顕微鏡像

金コロイドで間接的にラベルされたShootin1の局在を矢印で示す。

Bar : 200 nm

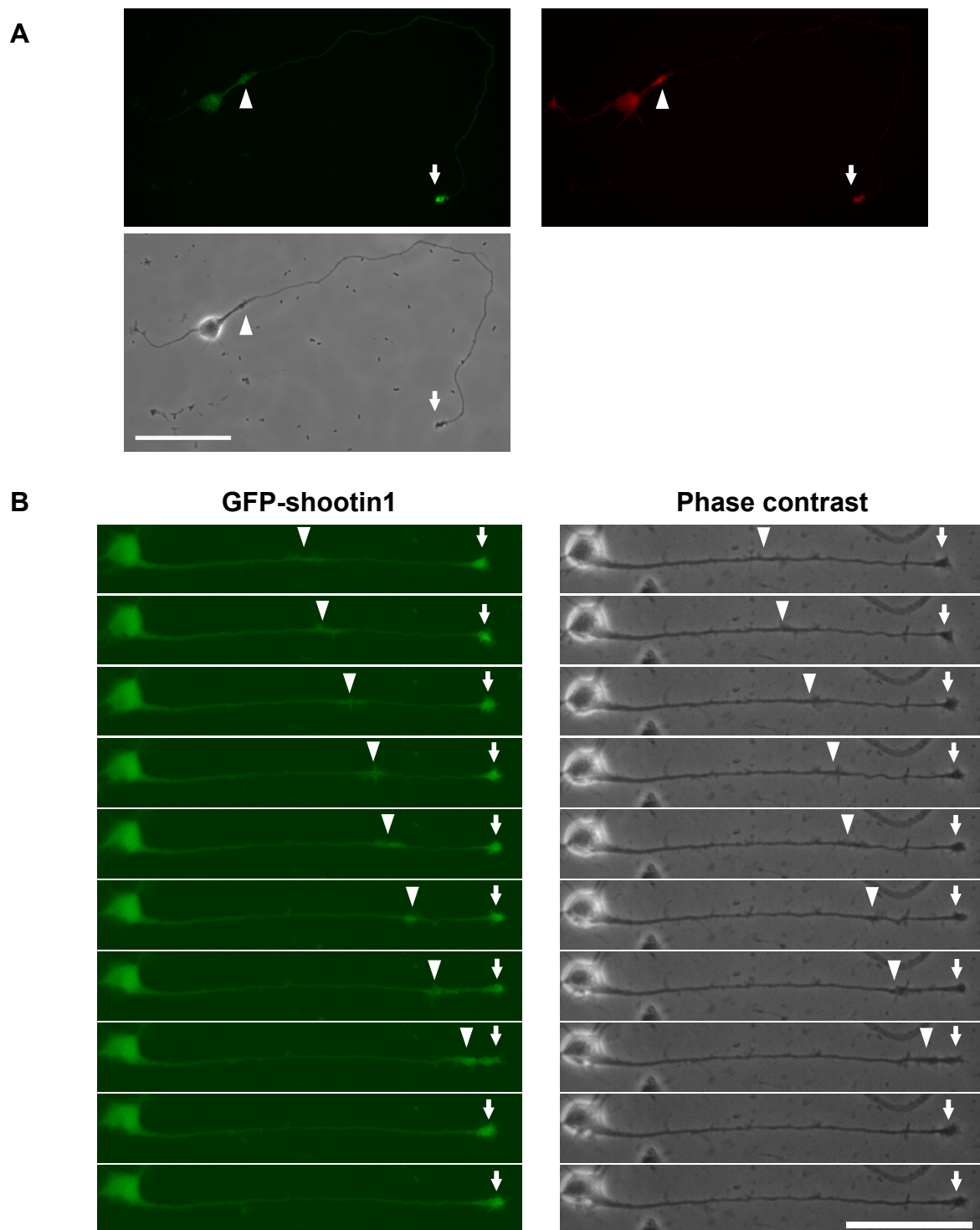


図15. WaveにおけるShootin1の局在およびその移動

A : 培養開始48時間後の神経細胞を抗Shootin抗体（緑）およびPhalloidinでF-Actin（赤）を染色 Wave内に存在するShootin1を矢頭、軸索の成長円錐を矢印で示す

B : EGFP-Shootin1を発現する神経細胞の軸索をTimelapseで2分おきに観察

Wave内のEGFP-Shootin1を矢頭、軸索の成長円錐を矢印で示す

Bars : 50 μ m

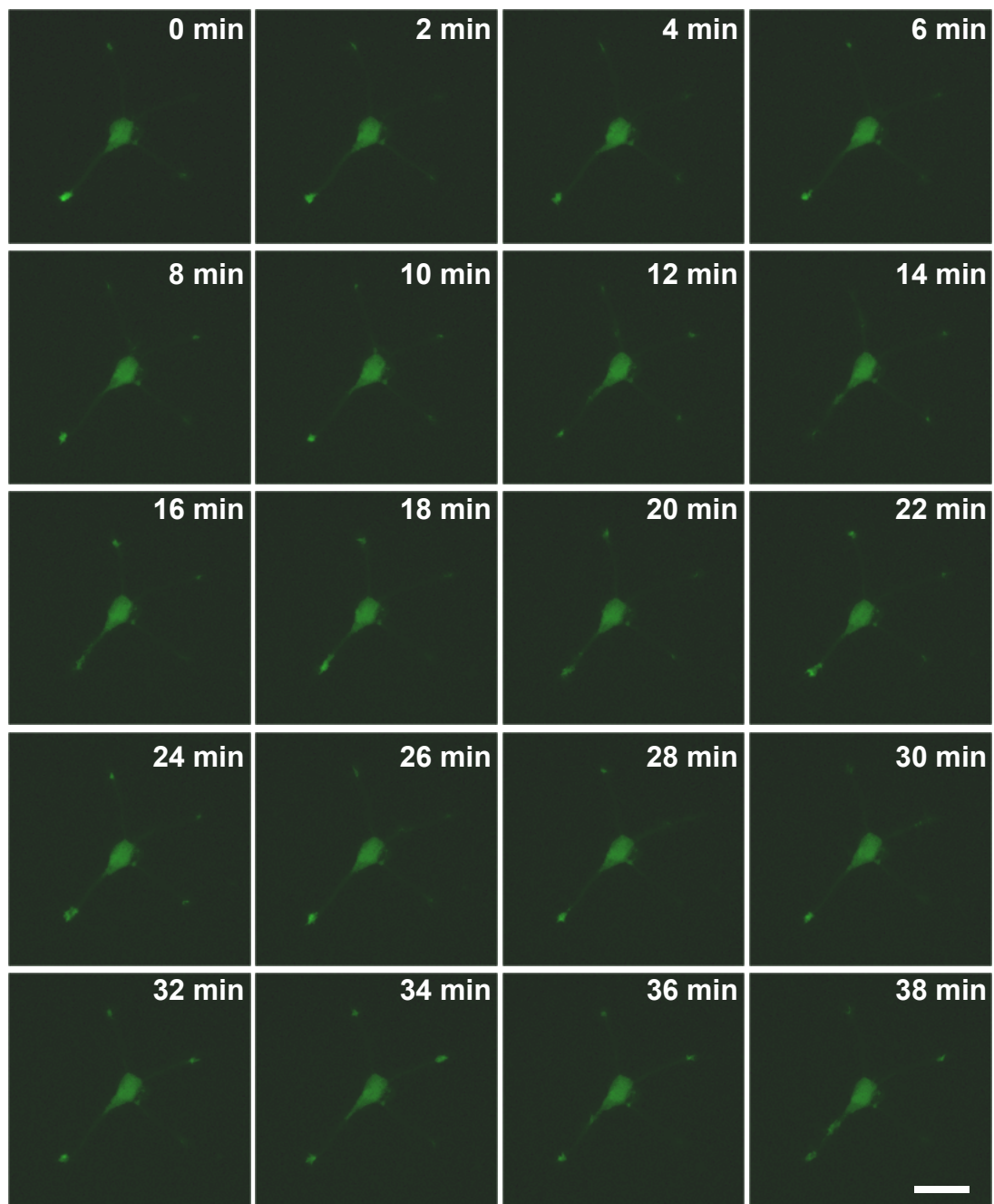
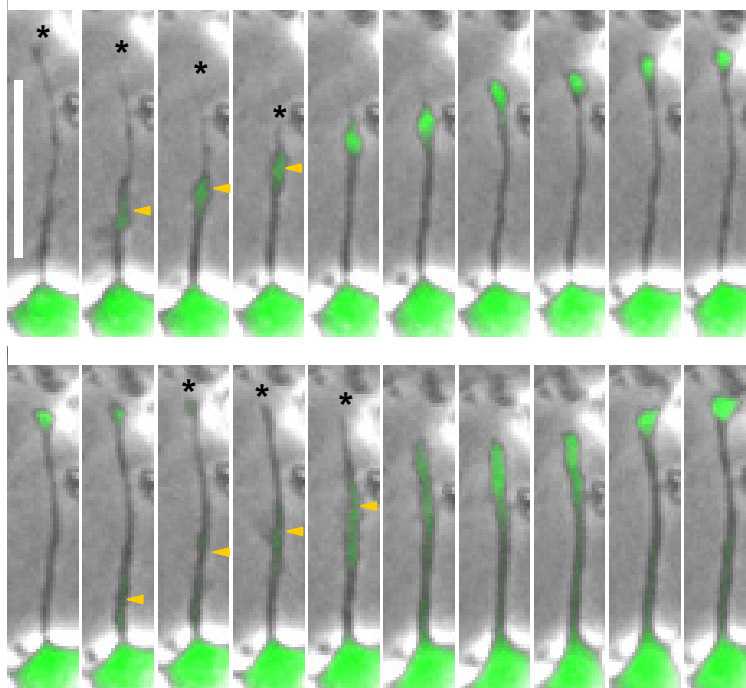


図16. 極性形成前の神経細胞におけるShootin1の局在変化

EGFP-Shootin1を発現する神経細胞を2分おきに観察

Bar : 20 μ m

A



B

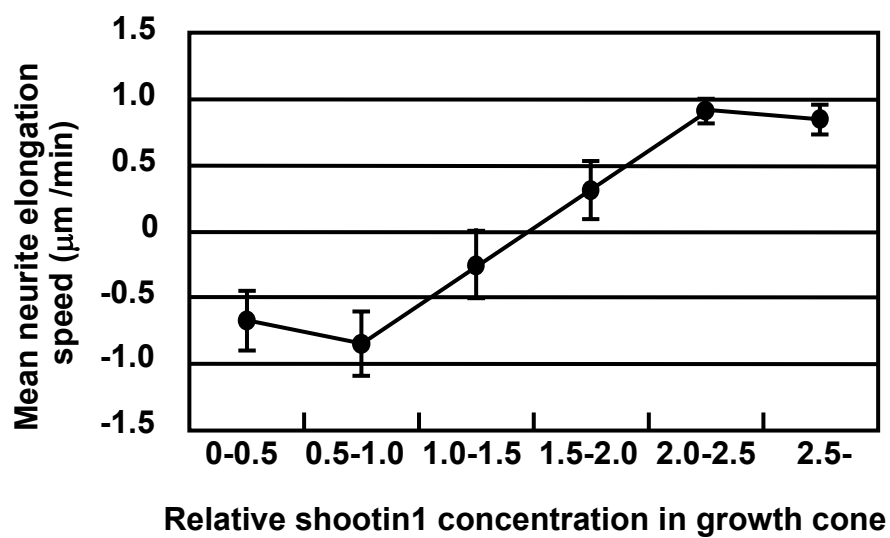


図17. 神経突起先端へのShootin1の濃縮と神経突起の伸長速度の関係

A : EGFP-Shootin1を発現する極性形成前の神経細胞を2分おきにタイムラプス観察
Waveを矢頭で、Shootin1が局在していない神経突起先端を*で示す。

Bar : 25 μm

B : 神経突起先端におけるShootin1の濃度と突起の伸長速度の相関をグラフ化したもの

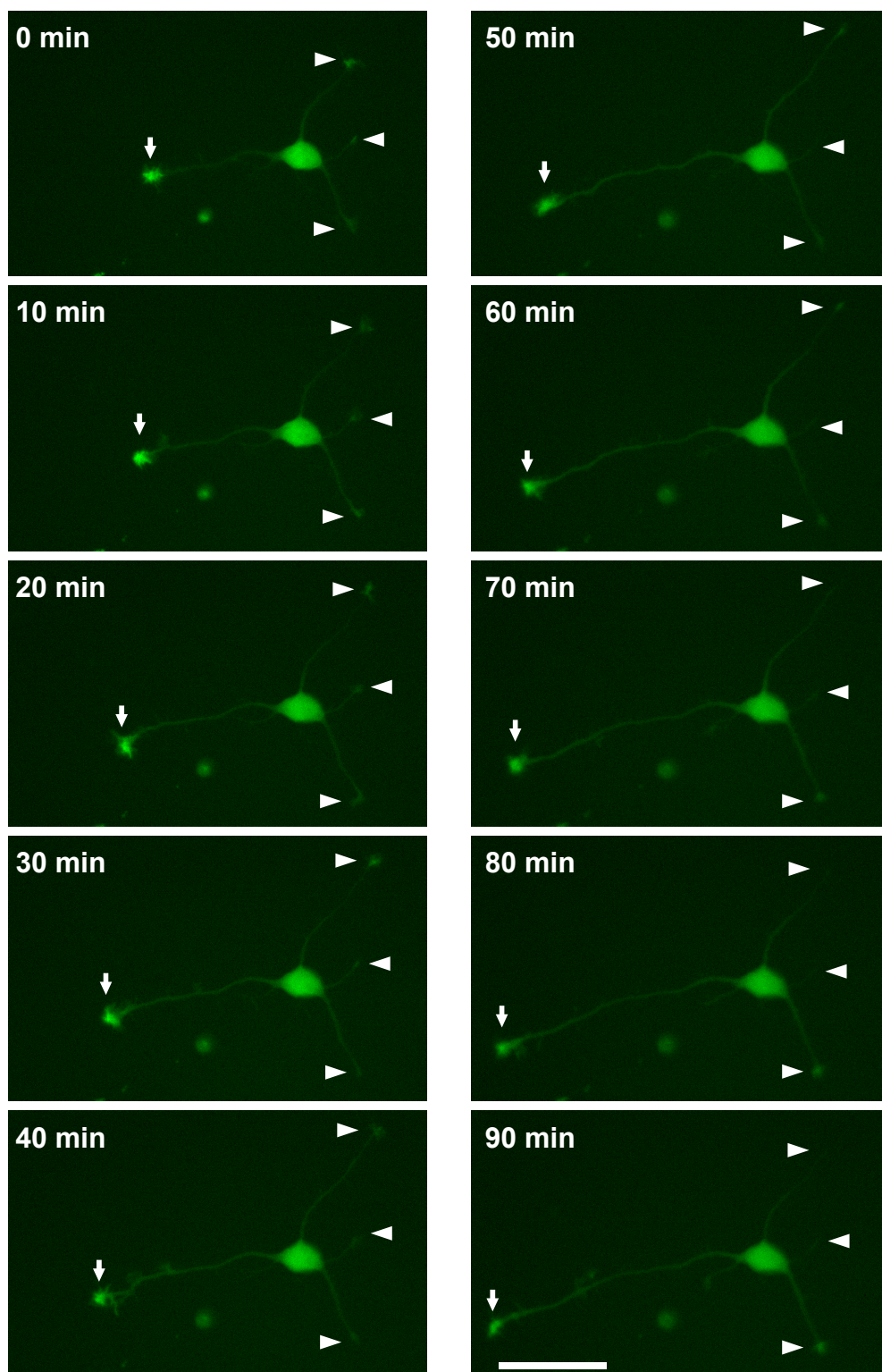


図18. 神経極性時期におけるShootin1の局在と神経突起の伸長

EGFP-Shootin1を導入した海馬神経細胞を10分おきに観察

軸索になる神経突起の先端を矢印、それ以外の神経突起先端を矢頭で示す。

Bar : 25 μ m

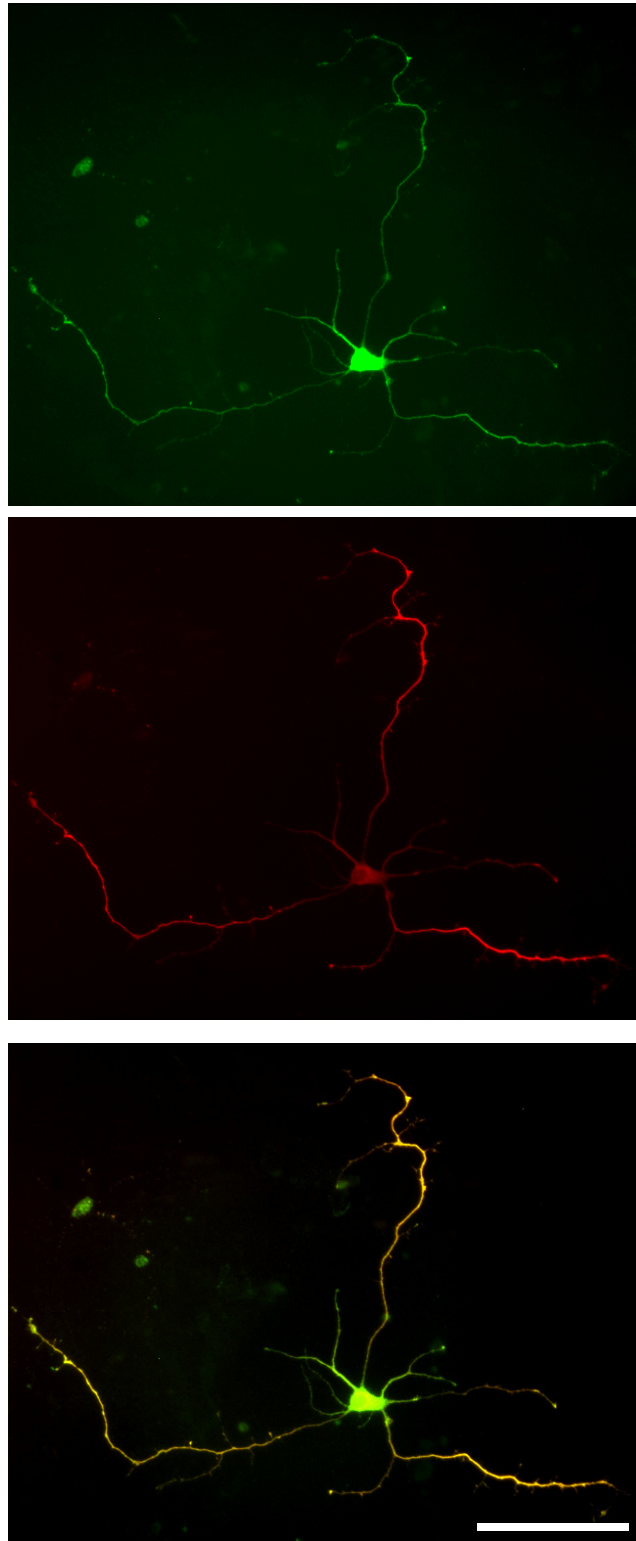


図19. Shootin1過剰発現細胞の形態（培養開始4日目）

Myc-tagを付加したShootin1過剰発現させ、培養開始4日後に抗myc抗体（緑、写真上）、軸索マーカーであるTau-1抗体（赤、写真中央）で免疫染色した。写真下に抗myc抗体による染色像およびTau-1抗体による染色像を重ね合わせたものを示す。

Bar : 50 μ m

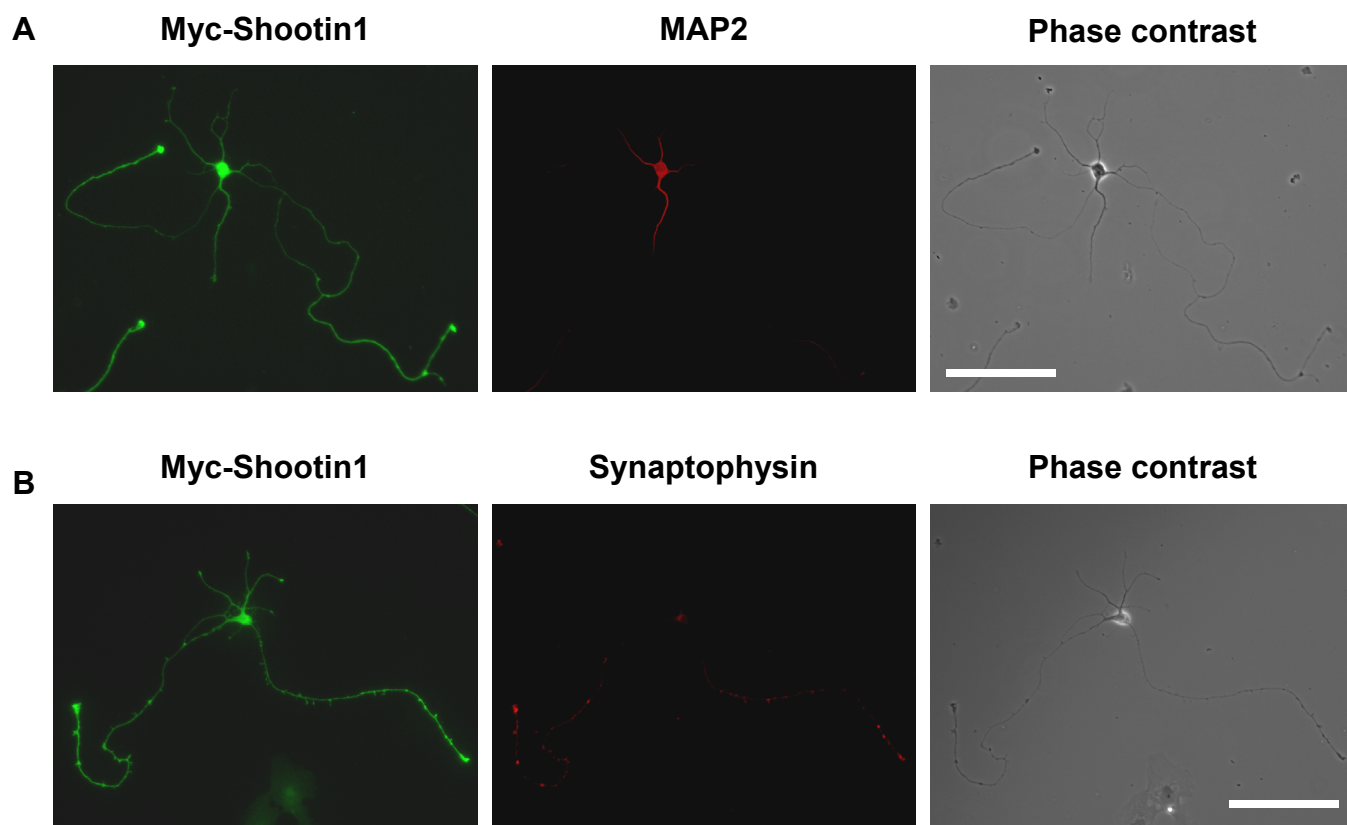


図20. Shootin1過剰発現細胞における軸索の性質（培養開始4日目）

Myc-tagを付加したShootin1を過剰発現させ、培養開始4日後免疫染色

A: 写真左：抗myc抗体での免疫染色像

写真中央：抗MAP2抗体（樹状突起マーカー）での免疫染色像

写真右：位相差像

B: 写真左：抗myc抗体での免疫染色像

写真中央：抗Synaptophysin抗体（軸索マーカー）での免疫染色像

写真右：位相差像

Bars : 50 μm

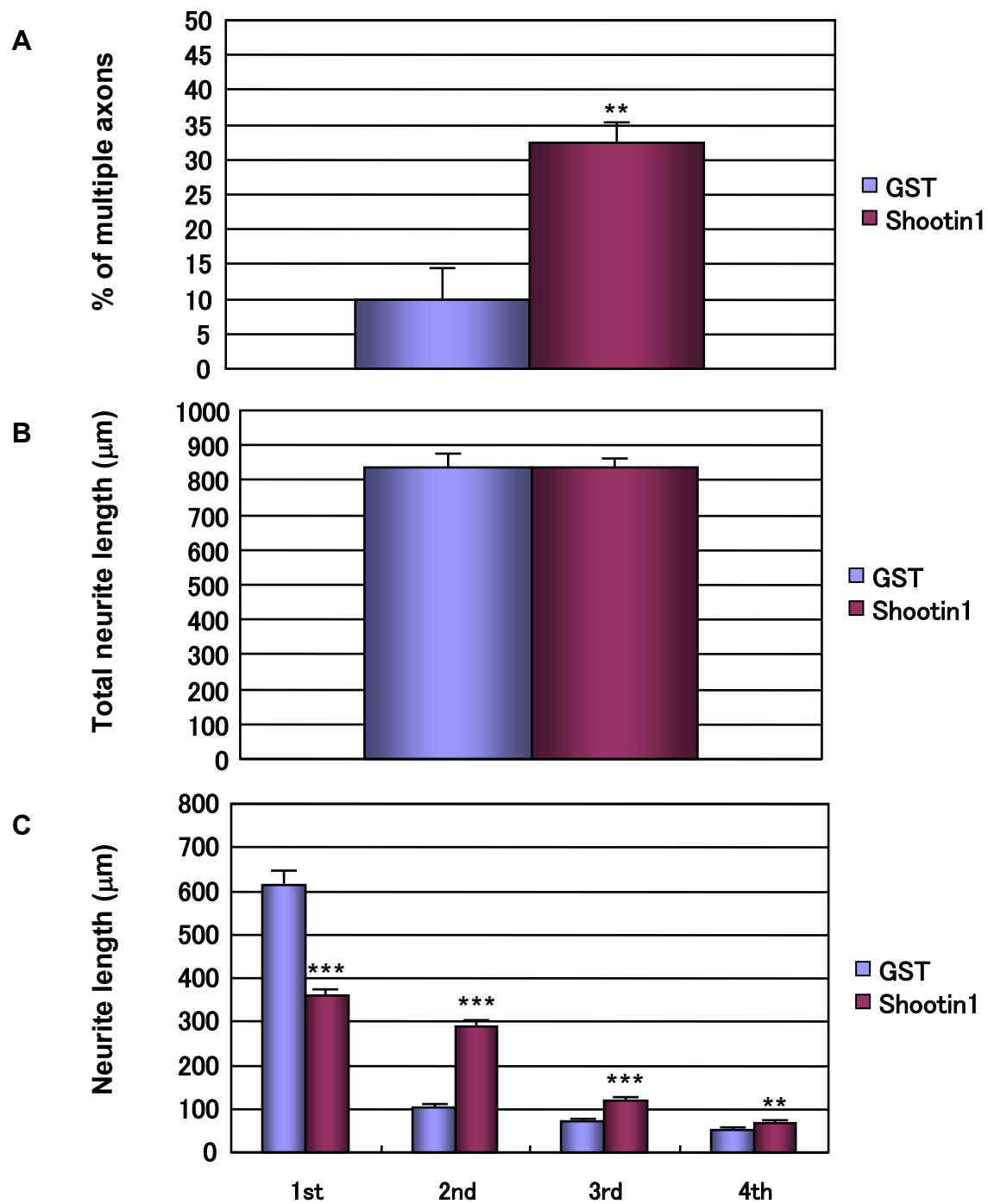


図21. Shootin1過剰発現が培養海馬神経細胞に及ぼす表現型

培養開始4日目のShootin1もしくはGSTを過剰発現させた細胞を抗myc抗体で免疫染色し、神経細胞の形態を定量

A：過剰軸索を形成している細胞の割合をグラフ化したもの

B：1細胞あたりの全神経突起の長さの平均をグラフ化したもの

C：1細胞あたりの4番目までに長い神経突起の長さの平均をグラフ化したもの

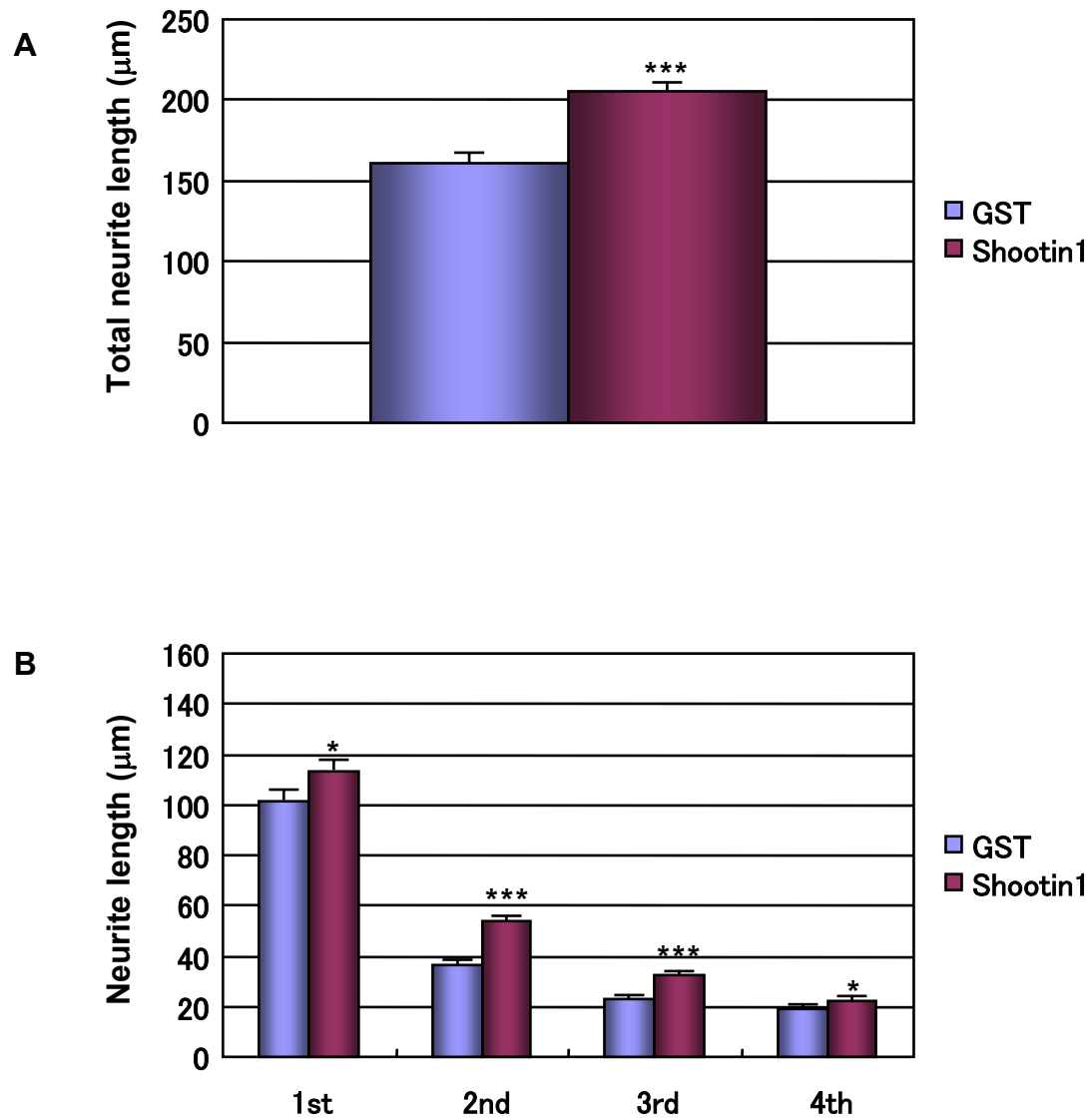


図22. Shootin1の過剰発現が神経突起の長さに及ぼす影響

Myc-Shootin1およびmyc-GSTを導入し、培養開始24時間後の神経細胞が有する神経突起の長さを定量

A : 1細胞あたりの全神経突起の長さの平均をグラフ化したもの

B : 1細胞あたりの4番目までに長い神経突起の長さの平均をグラフ化したもの

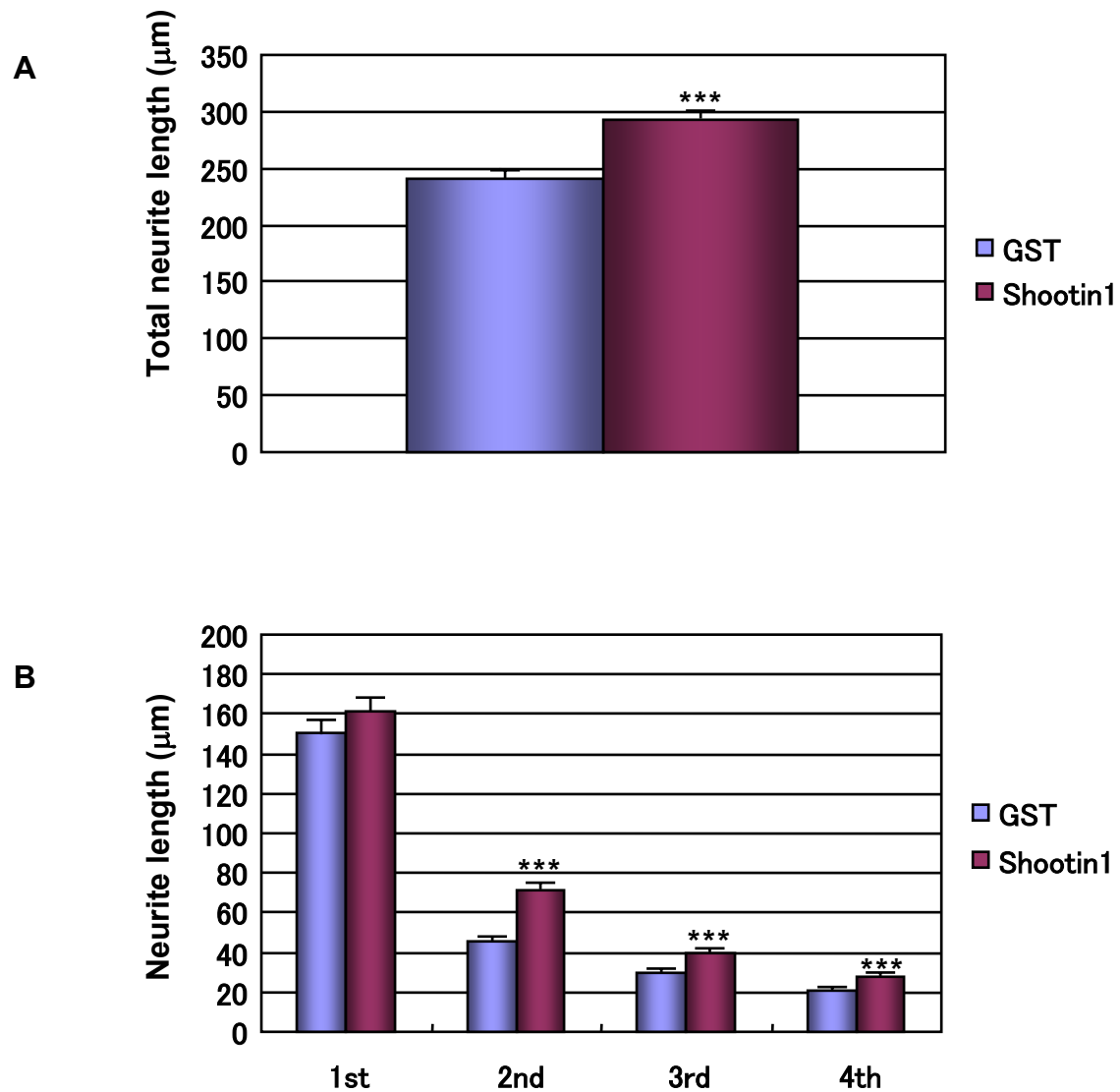


図23. Shootin1の過剰発現が神経突起の長さに及ぼす影響

Myc-Shootin1およびmyc-GSTを導入し、培養開始48時間後の神経細胞が有する神経突起の長さを定量

A : 1細胞あたりの全神経突起の長さの平均をグラフ化したもの

B : 1細胞あたりの4番目までに長い神経突起の長さの平均をグラフ化したもの

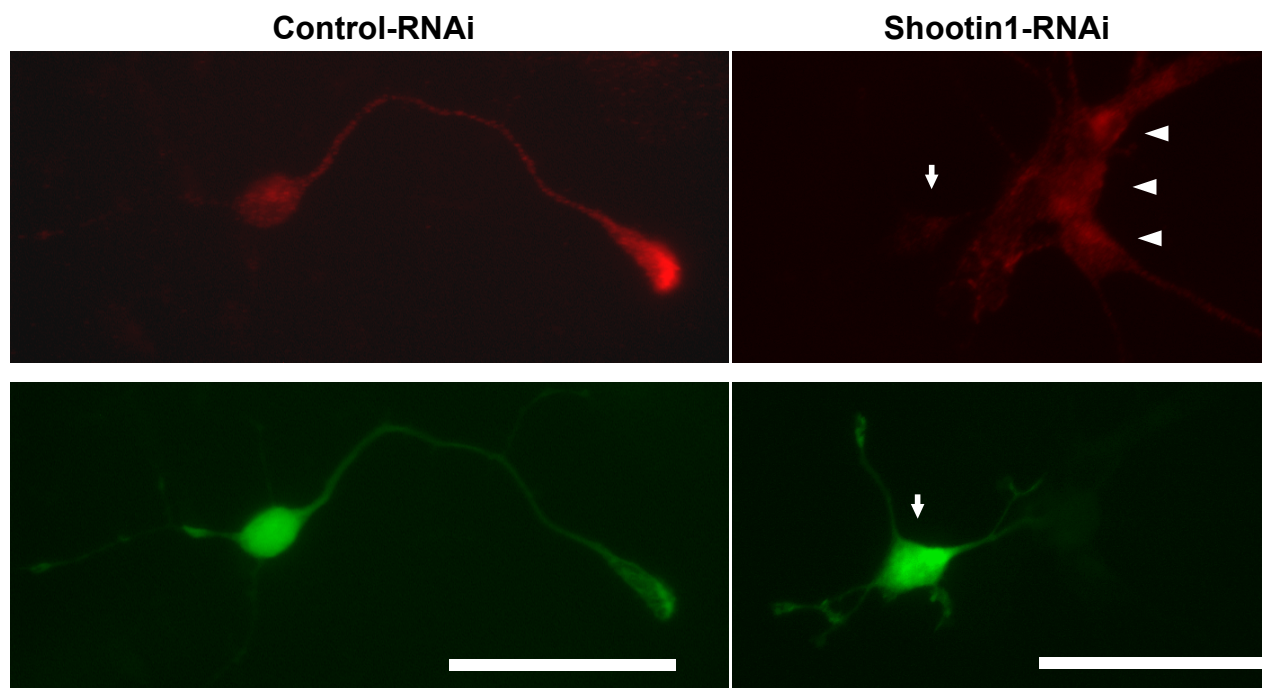


図24. Shootin1の発現抑制による細胞の形態

Shootin1-miRNAおよびControl-miRNA vectorを導入後48時間の神経細胞を免疫染色

左列：Control-miRNA vectorを導入した細胞の免疫染色像

写真上：抗Shootin抗体での免疫染色像（軸索先端を矢印で示す）

写真下：GFP

右列：Shootin1-miRNA vectorを導入した細胞の免疫染色像

写真上：抗Shootin抗体での免疫染色像

(Plasmid vectorが導入された細胞を矢印、導入されていない細胞を矢頭で示す)

写真下：GFP

Bars : 50 μ m

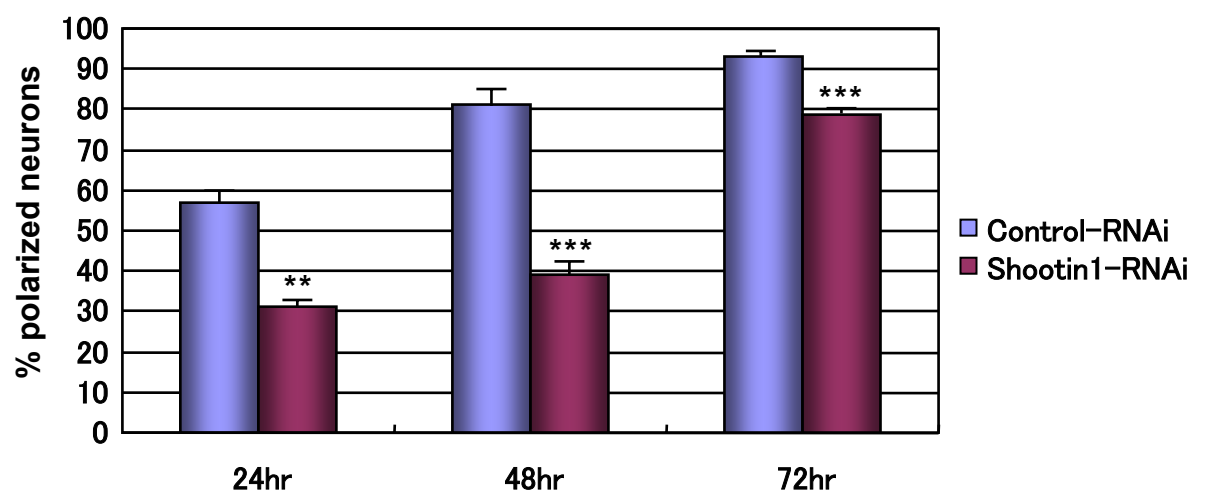


図25. Shootin1の発現抑制が神経細胞の極性形成に及ぼす影響

Shootin1-RNAiおよびControl-RNAiを導入し、培養開始24、48、72時間後の神経細胞において、極性形成後に神経細胞の割合をグラフ化

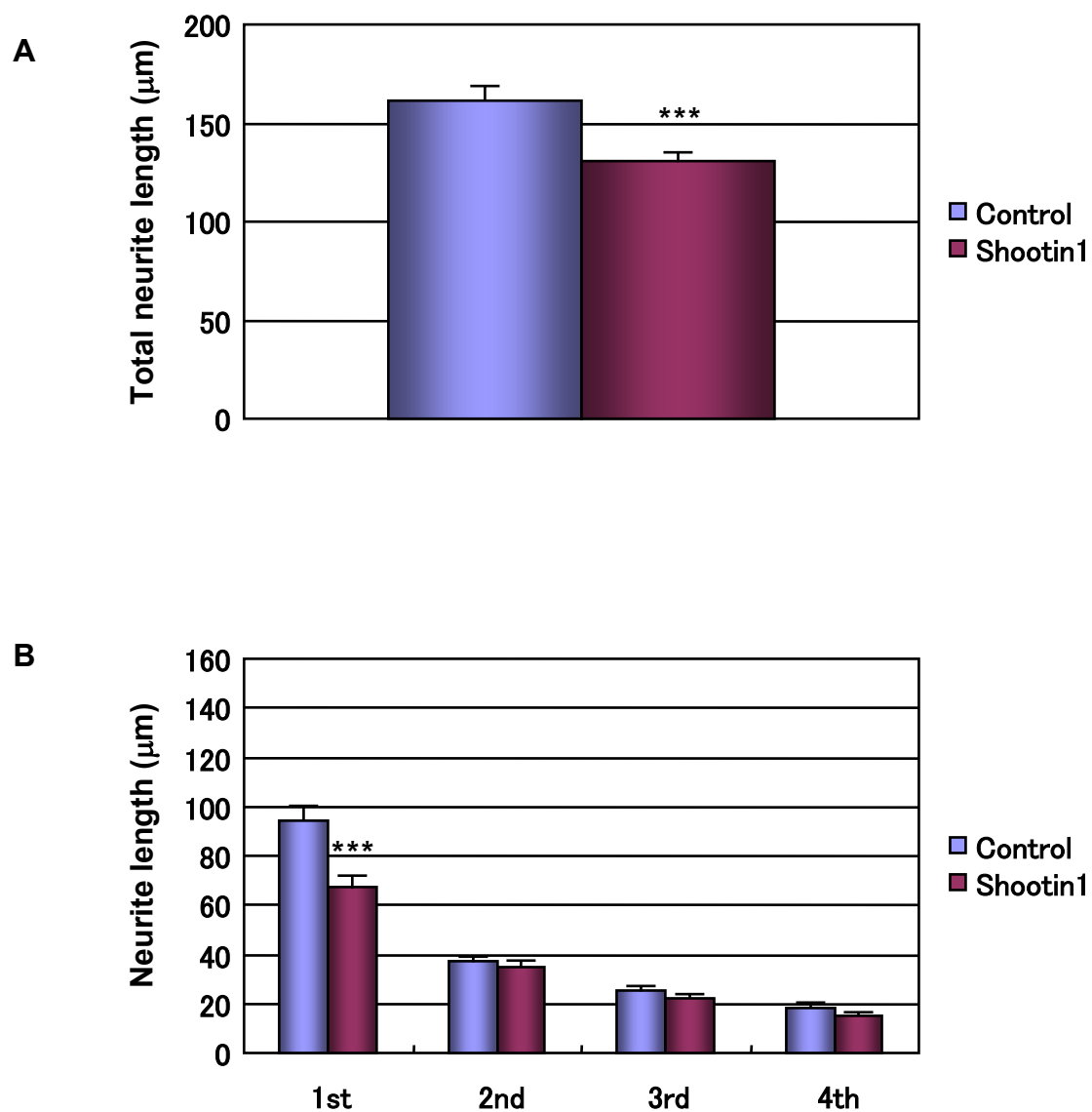


図26. Shootin1の発現抑制が神経突起の長さに及ぼす影響

Shootin1-RNAiおよびControl-RNAiを導入し、培養開始24時間後の神経細胞が有する神経突起の長さを定量

A : 1細胞あたりの全神経突起の長さの平均をグラフ化したもの

B : 1細胞あたりの4番目までに長い神経突起の長さの平均をグラフ化したもの

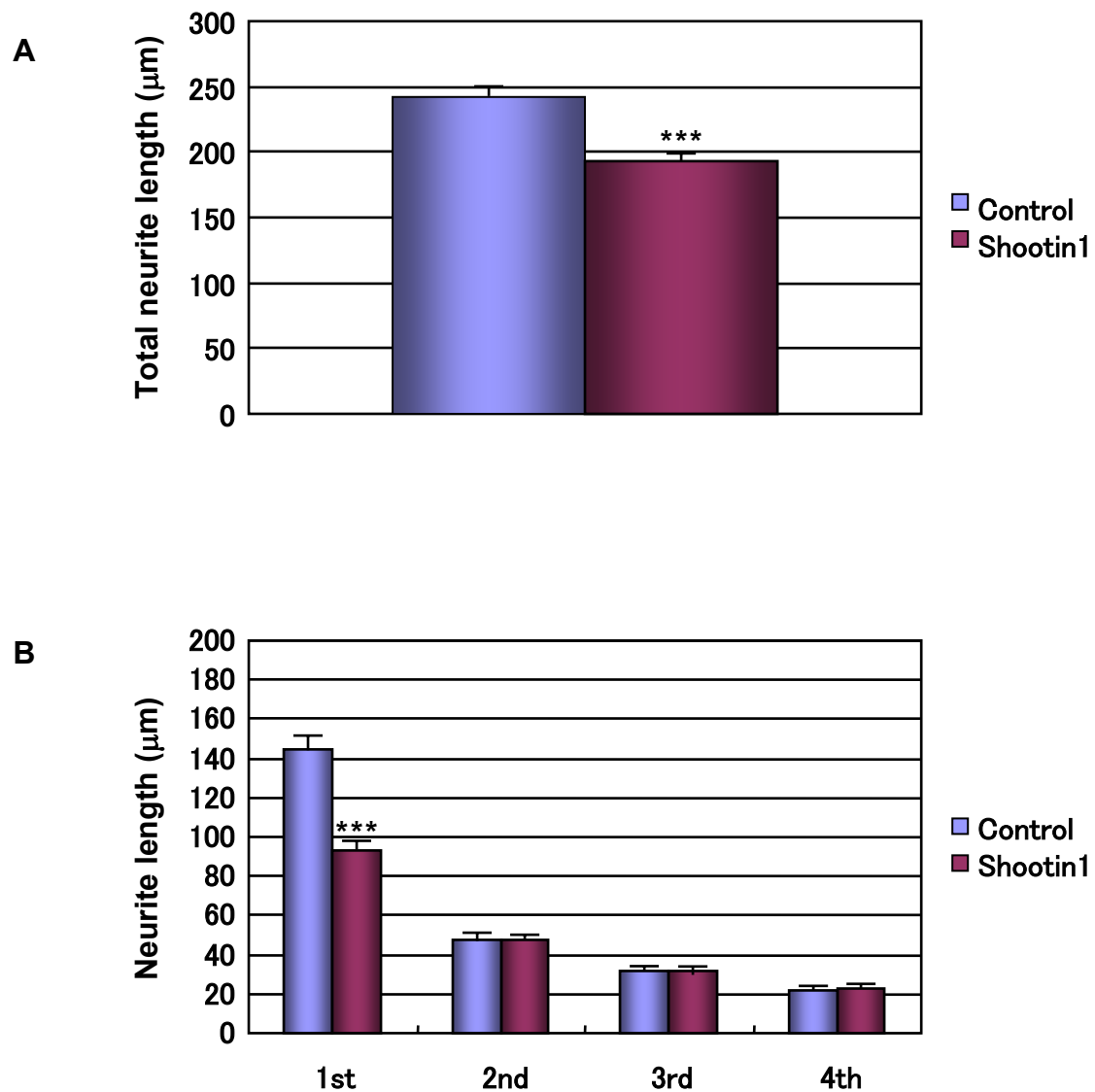


図27. Shootin1の発現抑制が神経突起の長さに及ぼす影響

Shootin1-RNAiおよびControl-RNAiを導入し、培養開始48時間後の神経細胞が有する神経突起の長さを定量

A : 1細胞あたりの全神経突起の長さの平均をグラフ化したもの

B : 1細胞あたりの4番目までに長い神経突起の長さの平均をグラフ化したもの

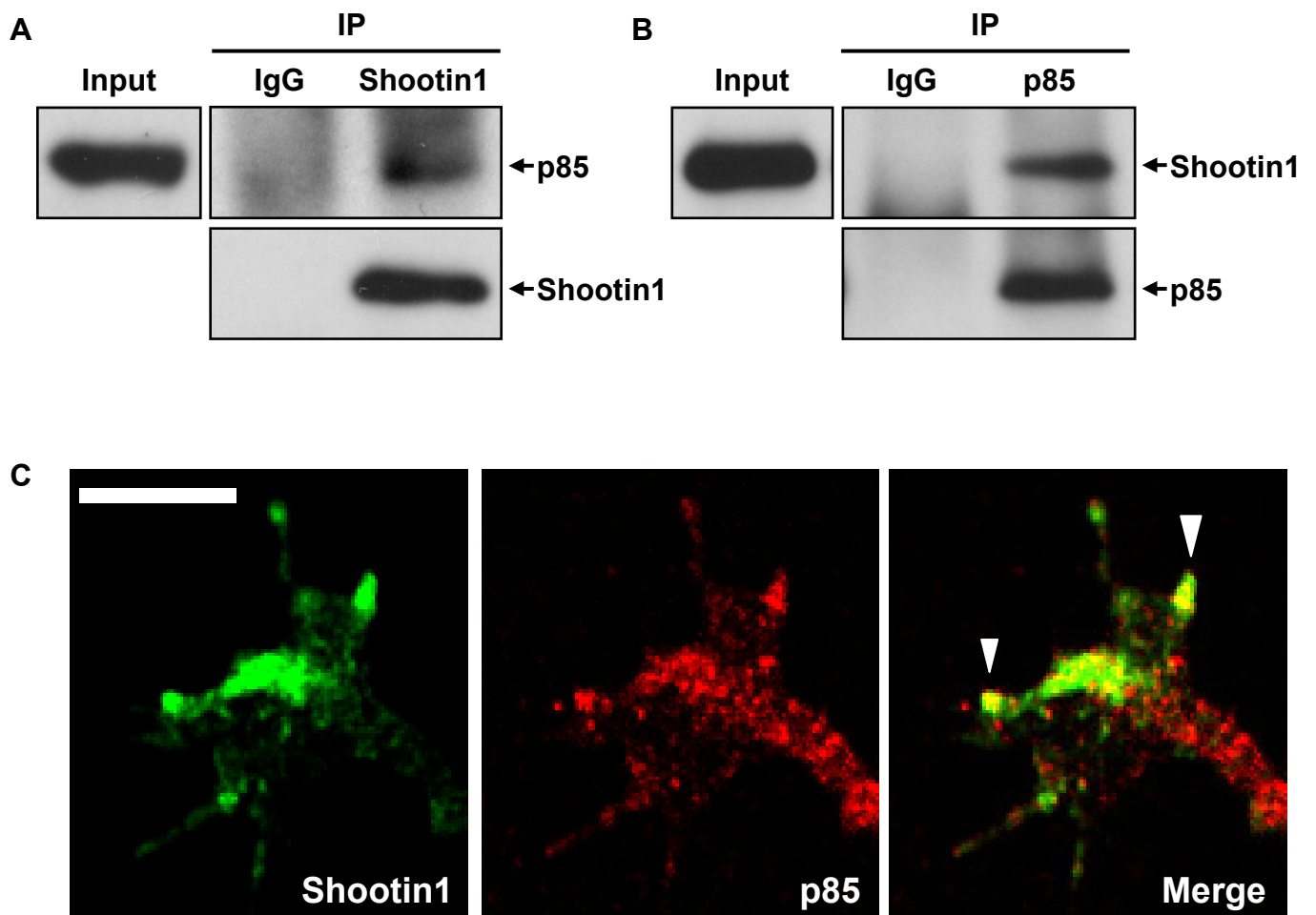


図28. Shootin1とPI3-kinaseとの相互作用および共局在

A: 生後1日目の全脳膜画分を抗Shootin抗体で免疫沈降

抗p85抗体および抗体Shootin抗体でWestern blot

B: 生後1日目の全脳膜画分を抗p85抗体で免疫沈降

抗Shootin抗体および抗体p85抗体でWestern blot

C: 軸索の成長円錐を抗Shootin抗体および抗p85抗体で免疫染色

Bar : 5 μ m

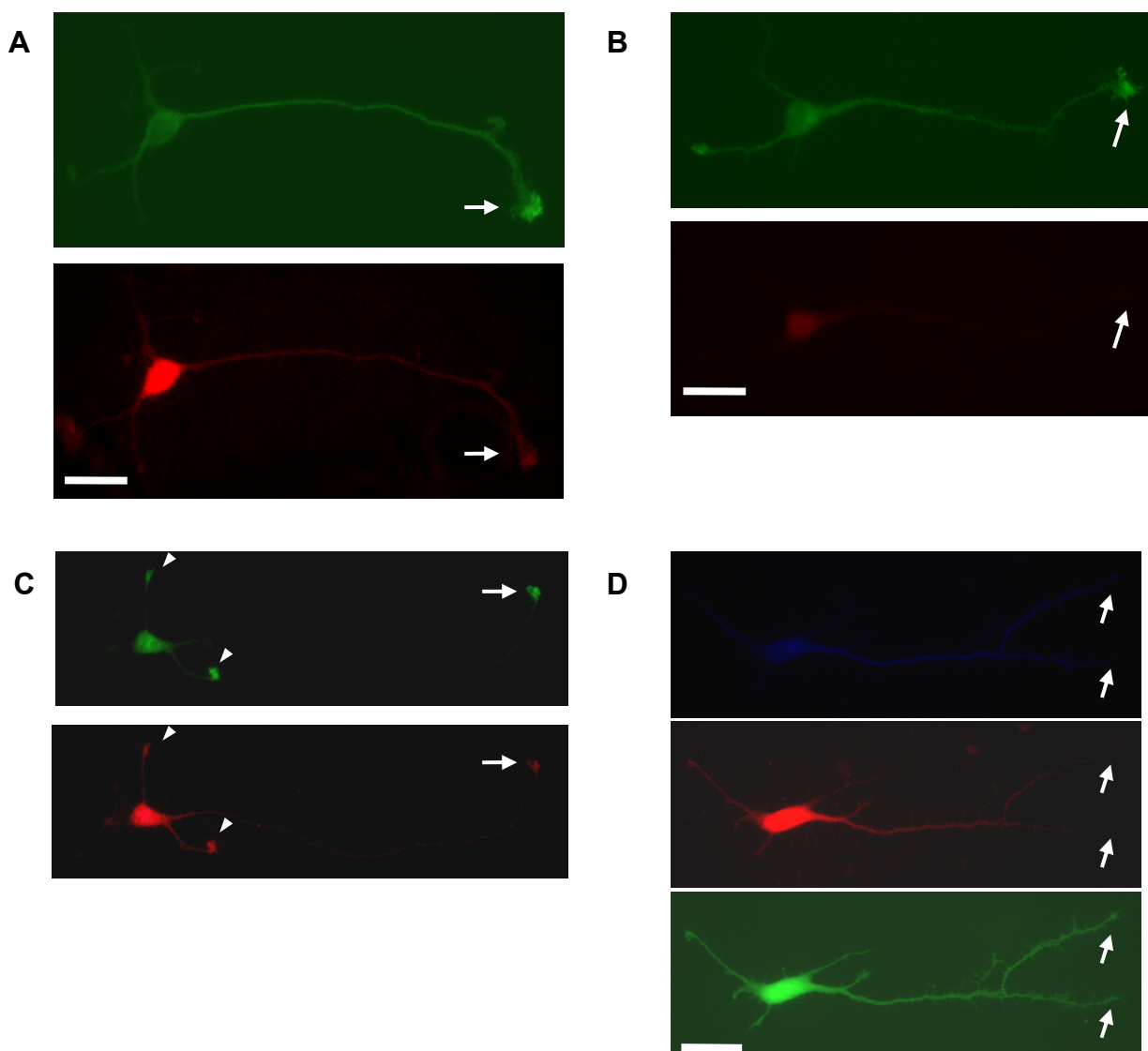


図29. Shootin1の局在とリン酸化Aktの局在の比較

極性形成後の神経細胞を抗Shootin抗体および439番目のセリン残基のリン酸化を認識する抗体（pAKT抗体）で免疫染色

A：コントロール細胞

抗Shootin1抗体による免疫染色像（青）、 pAKT抗体による染色像

B：LY294002で2時間処理した細胞

抗Shootin1抗体による免疫染色像（青）、 pAKT抗体による染色像

C：Shootin1過剰発現細胞

抗Shootin1抗体による免疫染色像（青）、 pAKT抗体による染色像

D：Shootin1発現抑制細胞

抗Shootin1抗体による免疫染色像（青）、 pAKT抗体による染色像、GFP（緑）

Bar：20 μ m

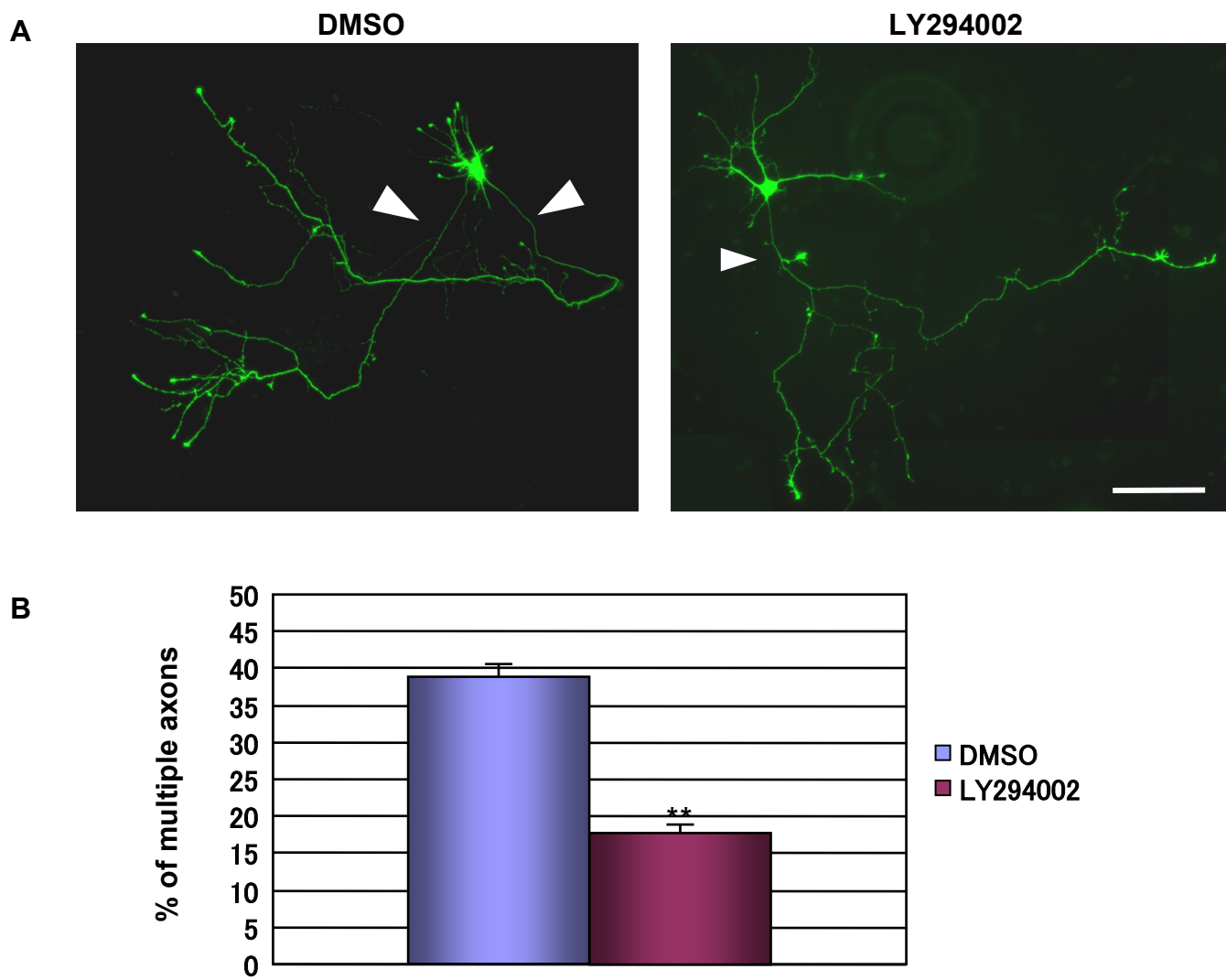


図30. PI3-Kinase阻害剤 (LY294002) が過剰軸索の形成に及ぼす影響

A: Myc-Shootin1を神経細胞に導入後、培養液中にDMSO（写真左）もしくは20 μ M

LY294002（写真右）を添加し培養、培養開始6日目に抗myc抗体により免疫染色（緑）軸索を矢頭で示す

B: 過剰軸索を形成している細胞の割合をグラフ化したもの。

Bar: 50 μ m

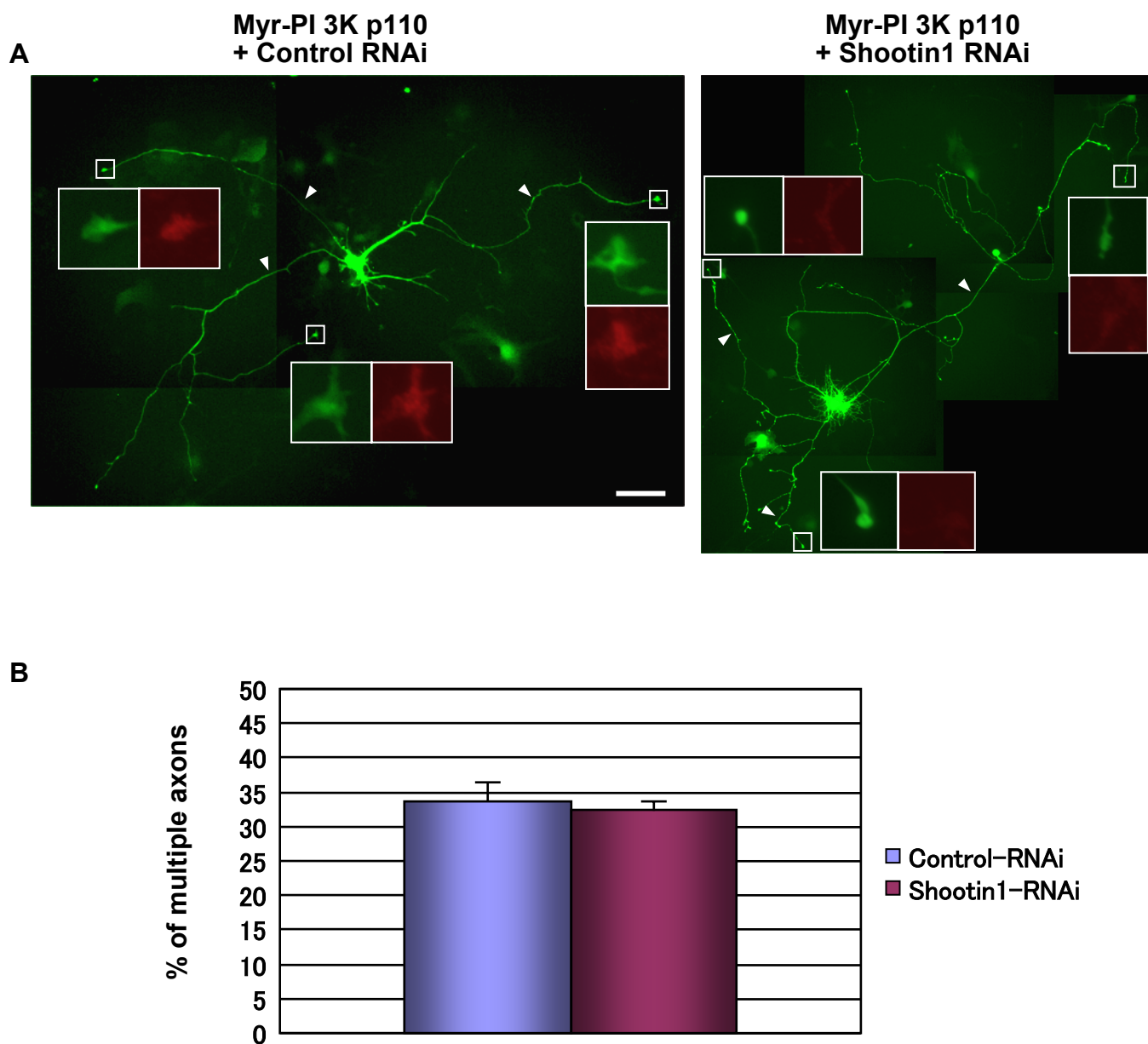


図31. 活性型PI3-kinaseの発現とShootin1の発現抑制が神経細胞の形態に及ぼす影響

A：活性型PI3-KinaseおよびControl-RNAi（左図）もしくはShootin1-RNAi（右図）を導入後、培養6日目の細胞を免疫染色。GFPの蛍光を緑、抗Shootin抗体の染色を赤で示す。

B：過剰軸索を形成している細胞の割合グラフ化したもの。

Bar: 50 μ m

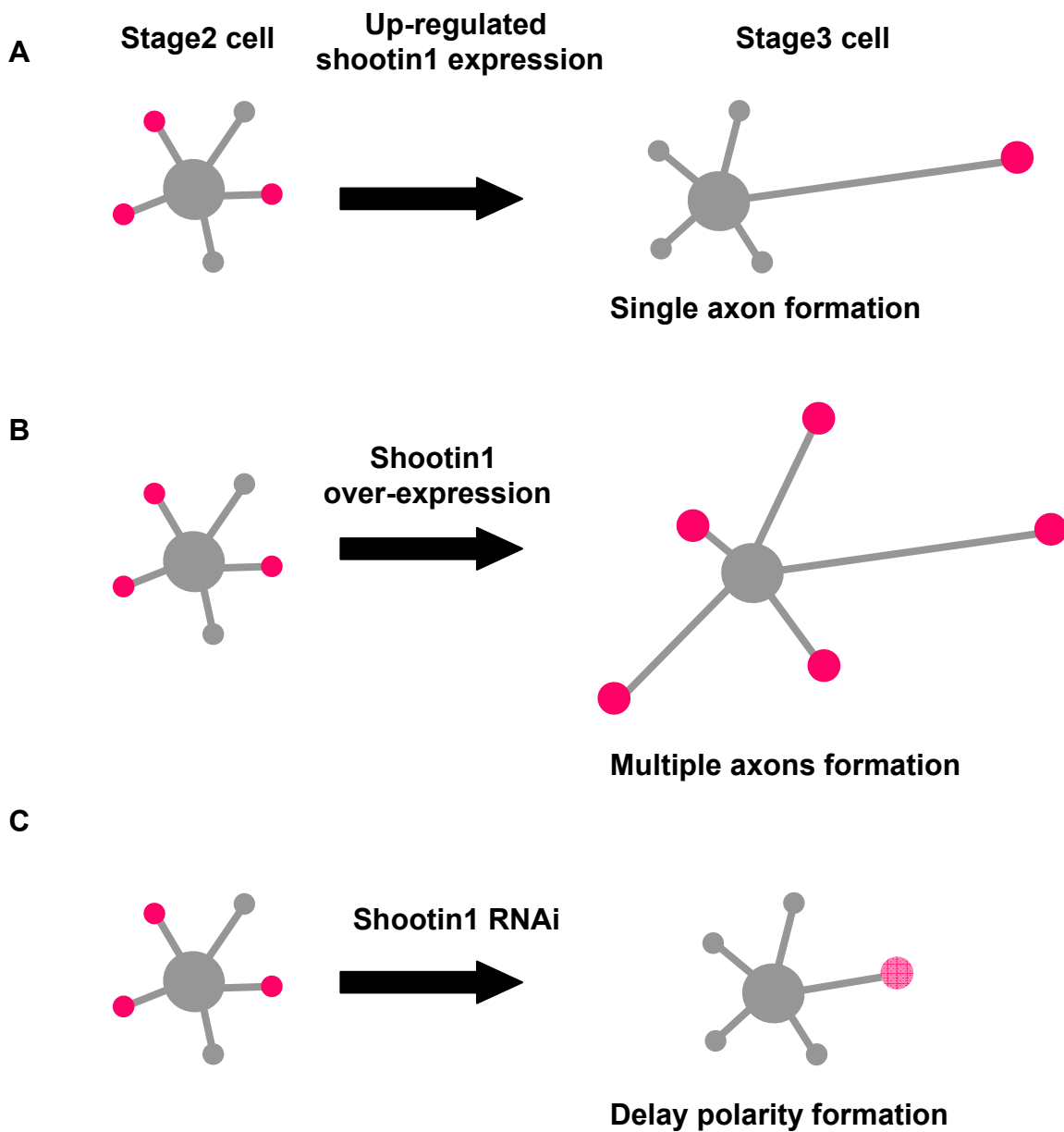


図32. Shootin1の発現量が神経極性形成に及ぼす影響の模式図

A : Shootin1の発現量が通常状態の場合

B : Shootin1の発現量を増加させた神経細胞の場合（過剰発現）

C : Shootin1を発現量を減少させた神経細胞の場合（RNAi）

赤丸はShootin1の局在を示す

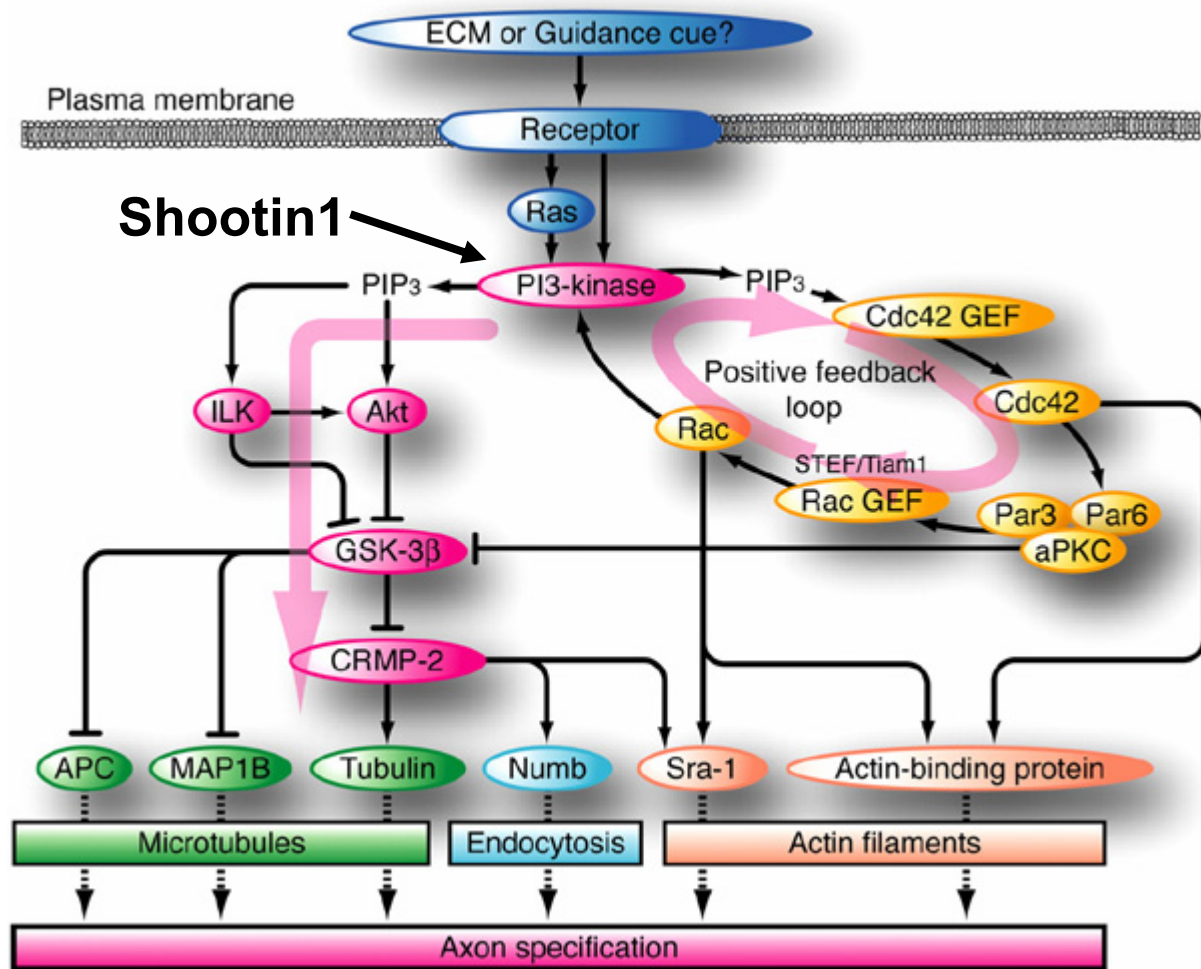


図33. 神経極性形成に関与するシグナル伝達機構

Yoshimura et al., 2006より改変

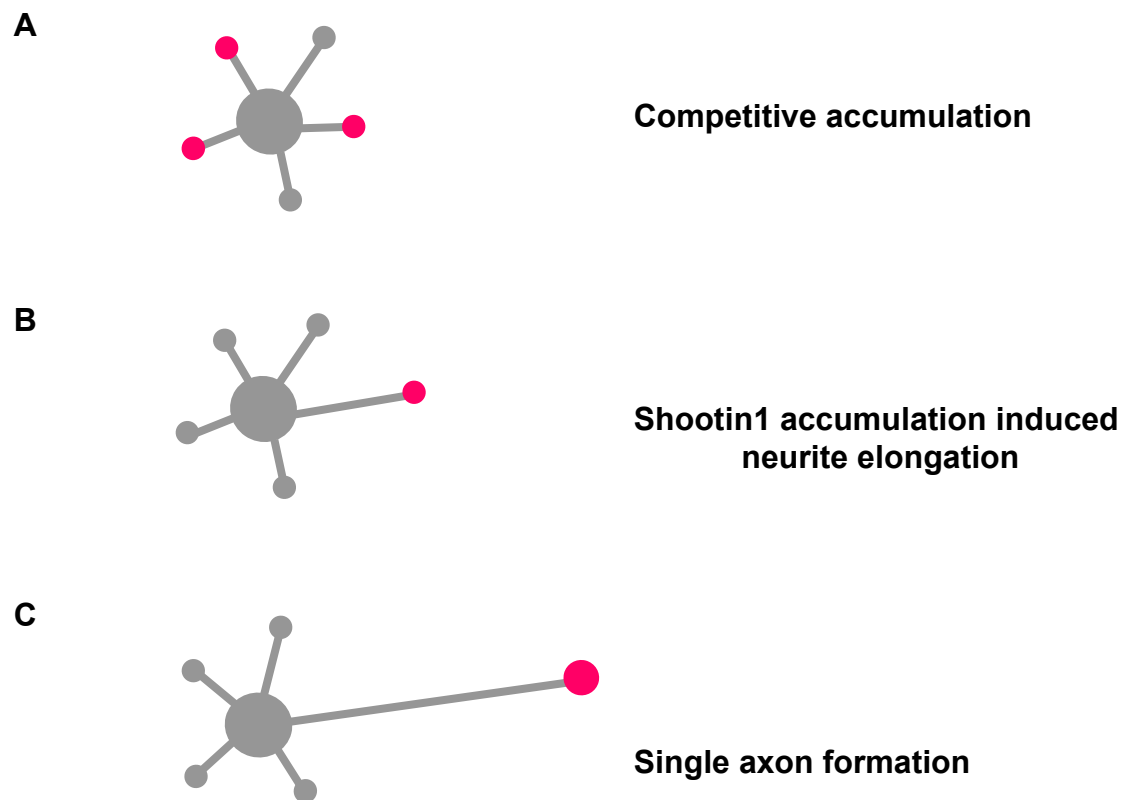


図34. Shootin1の局在と神経極性形成の模式図

A：極性形成前の神経細胞

B：Shootin1が1つの神経突起の先端に濃縮

C：Shootin1が濃縮した神経突起が伸長し軸索に分化。極性が形成される。

赤丸はShootin1の局在を示す。