平成23年度科学研究費助成事業(科学研究費補助金)実績報告書(研究実績報告書)

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 基盤研究(B) 4. 研究期間 平成23年度～平成25年度

5. 課題番号

2	3	3	7	0	0	8	8
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 アクチン線維の重合・脱重合による遅い軸索輸送の新しい分子機構

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名				
20223216	<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>イ</td><td>ガキ</td></tr> <tr><td>稲垣</td><td>直之</td></tr> </table>	イ	ガキ	稲垣	直之	バイオサイエンス研究科	准教授
イ	ガキ						
稲垣	直之						

8. 研究分担者(所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。)

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

本研究は、遅い神経軸索輸送の分子機構の解明を目指す。速い軸索輸送は、微小管上を動くキネシンファミリータンパク質によってなされることが解っているが、遅い軸索輸送(Slow component b)の分子機構は未だ不明である。本研究では、Slow component bがアクチン線維の重合・脱重合とShootin1のクラッチ作用を介して起こることを示唆する応募者らの予備データを基盤として、その分子メカニズムに迫る。

培養海馬神経細胞に、蛍光タンパク質を融合させたアクチンおよびアクチン結合タンパク質であるCortactinを発現させ、タイムラプス観察を行ったところ、それらがWaveと呼ばれるアクチン線維に富む構造体に濃縮して移動する様子が観察された。次に、Shootin1のRNAiを行なってタイムラプス観察と細胞内一分子計測を行い、Shootin1の発現が抑制された神経細胞におけるWaveの移動速度及びWave内のアクチン線維の逆行性流動速度を計測した。その結果、Shootin1の発現が抑制された神経細胞においては、Waveの移動速度が遅くなり、Waveの速度とは反対にWave内のアクチン線維の逆行性流動速度は速くなっていた。これはShootin1によるアクチン線維の細胞外基質へのつなぎ止めが弱くなりスリップが生じている可能性を示唆している。また、アクチン線維の脱重合を促進するCofilinの恒常活性型を神経細胞に遺伝子導入し、同様にタイムラプス観察及び細胞内一分子計測を行った。その結果、S3A変異体を発現させた神経細胞ではWaveの速度が速くなり、アクチン線維の重合速度も速くなっていた。以上の結果から、Waveによって輸送されるSlow component bがアクチン線維の重合・脱重合とShootin1のクラッチ作用を介して起こることがさらに示唆された。

10. キーワード

- (1) 脳・神経 (2) 発生・分化 (3) 神経科学 (4) 軸索輸送
 (5) 細胞骨格 (6) 分子クラッチ (7) Shootin1 (8) アクチン線維

11. 現在までの達成度

下欄には、交付申請書に記載した「研究の目的」の達成度について、以下の区分により自己点検による評価を行い、その理由を簡潔に記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。
 <区分>①当初の計画以上に進展している。 ②おおむね順調に進展している。 ③やや遅れている。 ④遅れている。

(区分) ①当初の計画以上に進展している。
(理由) 現時点で、「神経軸索輸送 Slow component b がアクチン線維の重合・脱重合と Shootin1 のクラッチ作用を介して起こる」という我々のモデルを支持する実験データが順調に揃ってきているため。また、次年度に予定していた分子クラッチの効率を変化させた場合のアクチン移動速度の解析のデータもすでに一部得られている。

12. 今後の研究の推進方策

本研究課題の今後の推進方策について簡潔に記述すること。研究計画の変更あるいは研究を遂行する上での問題点があれば、その対応策なども記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

クラッチ機構では、前方方向に重合してゆくアクチン繊維の進行を力学的に支えるために、Shootin1とL1-CAMを介して細胞外基質に対して進行方向と反対向きの力がかかると考えられる。そこでこの力を計測する。具体的には、L1-CAMでコートした直径1マイクロmのマイクロビーズをレーザーピンセットで軸索のWave上に静置する。L1-CAMどうしはホモフィリックに結合するので、反作用による細胞膜上のL1-CAMの移動とともにマイクロビーズも移動する。力の計測に成功した場合、サイトカラシンでアクチン線維の重合を抑制してアクチン繊維の進行をストップさせた場合この力が実際に消失するのかわを確認する。次に、RNAiでWaveにおけるShootin1やL1-CAMの発現量を抑制して、アクチン線維の細胞外基質へのつなぎ止めに弱めた場合に実際にビーズにかかる力が弱まるのかわを調べる。また、逆にShootin1の過剰発現はクラッチによるアクチン線維の細胞外基質へのつなぎ止めに強めると考えられるので、この点も検証する。また、アクチンとShootin1がWaveでクラッチシステムを形成するためには、これらの分子がWave内で十分早い速度で拡散する必要がある。そこで、アクチンとShootin1の拡散速度を定量し、この点を調べる。以上の一連の解析によって、Shootin1がアクチンとともにWave内でクラッチシステムを構成するかが検証できる。
--

13. 研究発表（平成23年度の研究成果）

※ 「13. 研究発表」欄及び「14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況」欄において記入欄が不足する場合には、適宜記入欄を挿入し、それによりページ数が増加した場合は、左端を糊付けすること。

〔雑誌論文〕 計 (0) 件 うち査読付論文 計 (0) 件

著者名	論文標題				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)					

〔学会発表〕 計 (4) 件 うち招待講演 計 (1) 件

発表者名	発表標題		
稲垣直之	プロテオミクスを基礎にした神経細胞が非対称性を獲得する機構の解析		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第62回 日本電気泳動学会シンポジウム「電気泳動を基礎にした臨床プロテオミクス最近の話題」(招待講演)	2011年11月13日	神奈川県横浜市	

発表者名	発表標題		
Yusuke Kubo, Michinori Toriyama, Naoyuki Inagaki	Cortactin functions as a clutch molecule to promote axon outgrowth		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第34回日本分子生物学会年会	2011年12月16日	神奈川県横浜市	

発表者名	発表標題		
Takanori Maeno, Michinori Toriyama, Naoyuki Inagaki	Mechanisms for the axon-specific accumulation of an axonal protein JIP1		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第34回日本分子生物学会	2011年12月16日	神奈川県横浜市	

発表者名	発表標題		
Hiroko Katsuno, Michinori Toriyama, Naoyuki Inagaki	Analysis of the mechanism of axonal transport slow component		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第34回日本分子生物学会年会	2011年12月15日	神奈川県横浜市	

〔図書〕 計(0)件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

http://nippon.naist.jp/inagaki_g/