

神経細胞が極性を獲得する機構

稲垣 直之

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

研究のねらい

神経細胞は、1本の軸索と複数の樹状突起を有し神経極性を形成する。神経極性は、神経細胞の基本的な機能であるシグナルの入出力や統合に重要な役割を果たすにも関わらず、その形成および維持の分子機構は未だよくわかっていない。本研究の目的は、神経細胞の極性形成に関わる分子群を同定し機能解析を行うことにより、神経極性形成・維持の分子ネットワークを明らかとすることである。

研究の成果と考察

I) CRMP-2の軸索形成作用の解析

- 1) 培養海馬神経細胞の軸索形成を担う分子のひとつとしてCRMP-2を見だし、これが細胞内で微小管の重合促進を介して作用することが明らかとなった。
- 2) 大阪市立大学、木山博教授との共同研究により、ラット舌下神経が再生の過程でCRMP-2を高レベル発現すること、またアデノウイルスを用いてCRMP-2を切断後のラット舌下神経に遺伝子導入すると神経再生の速度が上昇することがわかった。

II) プロテオミクスを用いた神経細胞の極性形成に関わる分子群の網羅的解析

- 1) 神経極性形成分子群の網羅的検出のために、高解像度二次元電気泳動法を確立した。確立した二次元電気泳動法は93 cm x 103 cmの巨大ゲルを用いたシステムで、通常の約5倍の1万個以上の蛋白質スポットを検出することが可能となった。また、質量分析法による高感度タンパク質同定のためのタンパク質前処理法および消化法を確立した。以上により、本研究での高感度のプロテオミクスを用いた神経極性形成分子群の解析が可能となった。
- 2) 確立した高解像度二次元電気泳動システムを用いてラット培養海馬神経細胞の軸索あるいは樹状突起・細胞体に濃縮する蛋白質のディファレンシャル解析を行った。その結果、培養海馬神経細胞に発現するタンパク質5,164個のうち4%にあたる200個のタンパク質が軸索に、27%にあたる1,414個のタンパク質が樹状突起・細胞体に濃縮することがわかった。これら200個の軸索に濃縮するタンパク質スポットのうち80個のタンパク質を質量分析装置を用いて同定した。
- 3) 同様の二次元電気泳動解析により、海馬神経細胞に発現するタンパク質6,197個のうち4.5%にあたる277個のタンパク質が神経極性形成に伴って、発現が上昇することが明らかとなった。またこれらのうち92個のタンパク質を質量分析装置を用いて同定した。

III) プロテオミクスで同定された分子の機能解析

- 1) 以上の研究から特に興味深い分子として、3個のコイルドコイルドメインと1個のプロリンリッチドメインを有する60kDの新規タンパク質が同定された。この分子はCRMP-2と同様に軸索に濃縮するのみならず神経細胞の極性形成にともなって発現が上昇することがわかった。また、Mycタグを付加した遺伝子を発現させて細胞内局在を調べたところ神経軸索の先端部の成長円錐に強く濃縮していた。
- 2) 神経軸索に濃縮するものとして同定された分子の中には、RNA結合タンパク質、翻訳終結因子等のタンパク質の翻訳に関与するタンパク質が含まれていた。また、

実際に軸索で局所的に翻訳を受けるタンパク質の存在を示唆するデータが得られた。

IV) 考察

本さきがけ研究よりサポートを受け神経極性形成機構の一端に触れることができた。今後プロテオーム解析に加えて、前述の新規分子と軸索特異的なタンパク質翻訳機構にフォーカスを絞った研究を進めてゆきたい。また、本研究が神経軸索再生等の神経疾患の治療法の開発につながればと考えている。

主な論文

- 1) 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. *Nature Neurosci.* 4, 781-782.
- 2) Taya, S., Inagaki, N., Sengiku, H., Makino, H., Iwamatsu, A., Urakawa, I., Nagano, K., Kataoka, S., and Kaibuchi, K. (2001) Direct Interaction of Insulin-like growth factor-1 receptor with leukemia-associated RhoGEF, *J. Cell Biol.* 155, 809-819.
- 3) Canossa, M., Gartner, A., Campana, G., Inagaki, N., and Thoenen, H. (2001) Regulated secretion of neurotrophins by metabotropic glutamate group I (mGluRI)- and Trk-receptor activation is mediated via phospholipase C signaling pathways, *EMBO J.* 20, 1641-1650.
- 4) 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.
- 5) Inagaki, N., Katsuta, K., Nomura, E., Ueda, T., Toriyama, M., and Mori, T. (2002) High resolution large gel two-dimensional electrophoresis for proteomics, *BIOforum Int.* 6, 324-325.
- 6) Fukata, Y., Itoh T.J., Kimura T., Menager C., Nishimura T., Shiromizu T., Watanabe H., Inagaki, N., Iwamatsu A., Hotani H., Kaibuchi K. (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly, *Nature Cell Biol.* 4, 583-591.
- 7) Suzuki, Y., Nakagomi, S., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., Inagaki, N., Kaibuchi, K., Aizawa, H., Kikuchi, K., and Kiyama, H. (2003) Collapsin response mediator protein-2 accelerates axon regeneration of nerve-injured moter neurons of rat, *J. Neurochem.* 86, 1042-1050.
- 8) Inagaki, N. and Katsuta, K. (2003) Large gel two-dimensional electrophoresis: improving recovery of cellular proteome, *Curr. Proteomics*, in press.

その他：出版物

- 1) 稲垣直之 (2003) ポストシナプス・樹状突起スパインにおける CaMKII の空間的シグナリング、*生体の科学* 54 (2)、90-96.
- 2) 稲垣直之、稲垣昌樹、単一スパインにおける CaMKII シグナリングの可視化 (2003) *動くシナプスと神経ネットワーク* (塩坂貞夫 編) 金芳堂、p103-110
- 3) 勝田和大、野村英子、稲垣直之 (2003) Multiple Large gel two-dimensional electrophoresis for proteomics, *J. Electrophoresis* 47, 27-31.
- 4) 稲垣直之 (2002) 細胞内の空間シグナル、*細胞工学* 21 (4) 345.
- 5) 稲垣直之 (2002) 高解像度ラージゲルを用いた二次元電気泳動法による細胞内発現蛋白質の網羅的検出、*実験医学* 20 (1) 85-88.
- 6) 有村奈利子、稲垣直之、貝淵弘三 (2001) CRMP-2 による神経極性形成の制御機構、*実験医学*. 19 (17)、2309-2311.
- 7) 稲垣直之、貝淵弘三 (2001) CRMP-2 は海馬神経細胞の軸索形成を誘導する、*細胞工学* 20 (10)、1408-1409.
- 8) 稲垣直之、貝淵弘三 (2001) 神経細胞の軸索および極性形成の分子機構、*生体の科学* 52 (3)、230-234.