

新規分子 Singar の同定と
神経細胞極性形成における機能解析

森 達也

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

主指導教官 伊東 広

提出年月日 平成 19 年 5 月 22 日

目次

	ページ番号
序論	… 3
方法と材料	… 6
結果	
1. 神経極性形成・維持に関わる分子のプロテオーム解析による新規分子Singar1の検出と同定	… 21
2. Singar1の脳特異的な発現とリン酸化修飾の検出	… 22
3. 神経細胞の形態形成および脳の発達に伴うSingarの発現量の推移	… 23
4. Singarの神経細胞内局在の解析	… 24
5. Singar1の過剰発現による過剰軸索形成の抑制	… 25
6. Singarの発現抑制による過剰軸索形成の誘導	… 26
7. Singarの発現抑制による極性形成後の神経細胞からの過剰軸索形成	… 27
8. Singar1の神経極性における分子作用機構の解析	… 28
考察	… 30
謝辞	… 37
図の部	… 38
参考文献	… 58

序論

我々の脳を構成する神経細胞の多くは、単一の軸索と複数の樹状突起を形成し、極性を持った形態を有している [1] [2]。この 2 種類の神経突起は、形態的および機能的に大きく異なっている [3]。軸索は時に 1 m 以上にもなる比較的長い神経突起で、他の細胞から伝えられた電氣的興奮を神経伝達物質の放出に置き換え、別の神経細胞へとシグナルを伝播する。一方、樹状突起は枝分かれに富む比較的短い神経突起で、軸索末端から放出される神経伝達物質を受け取り電氣的興奮へと変換する。この様に情報の出力と入力を担当する 2 種類の神経突起を形成することで、神経細胞に伝えられた情報に方向性が生じ、神経細胞は細胞間情報伝達の制御を行うことが可能となる。すなわち、神経極性形成は、神経回路網を形成する神経細胞が、神経回路網において細胞間情報伝達の制御という基本機能を遂行する上で極めて重要な形態形成のプロセスである。

神経細胞の形態形成は大きく 5 つの段階に分類される [1] [4] (図 1)。初めに、神経細胞は Lamellipodium を細胞体から伸展させ (Stage 1)、その後、未分化な Minor process と呼ばれる神経突起を複数形成する (Stage 2)。この段階では細胞は極性を持たないが、時間経過とともに Minor process の一本が急速に伸長して軸索へと分化し (Stage 3) 神経細胞は極性を獲得する。その後、残りの Minor process は樹状突起へと分化、伸長し (Stage 4)、他の神経細胞の軸索とシナプスを形成して神経細胞の形態は成熟する (Stage 5)。この形態形成過程の中で、Stage 2 から Stage 3 の間に一本の神経突起が選択的に軸索へと分化し神経細胞が極性を獲得することから、この期間が神経極性形成にとって非常に重要な時期であると考えられている。この軸索形成期において、CRMP2 [5]、APC [6]、Par3/Par6/aPKC 複合体 [7]、Rap1B [8]、Cdc42 [8]、PIP3 [9]、Akt [10]、KIF3 [11]、STEF [12]、Shootin1 [13] などの機能を阻害すると軸索形成の遅延や軸索伸長の抑制が起きることが報告されている。このことから、これらの分子は軸索形成に促進的に機能していることが予想され、軸索形成の分子メカニズムの解析として、これらの分子の相互作用分子の同定と機能解析が現在盛んに行われている。

しかしながら、どのように一本の Minor process だけが選択的に軸索へと分化するのかという、軸索の単一化に関わる分子メカニズムについては不明な点が多い。これまでの解析から、先に述べた軸索形成のポジティブレギュレーターが Stage2 の後期に一本の Minor process に濃縮することが報告されている。このことから、軸索の単一化には、選択された一つの神経突起において局所的に軸索形成のシグナルが活性化されることが重要であると考えられてきた [14]。しかしながら、最近になり、GSK3 β や PTEN、MARK2 の機能を阻害した神経

細胞において過剰軸索の形成が認められることが報告された [15] [16]。GSK3 β や PTEN は、軸索形成に必須とされる PI 3-kinase のシグナルに拮抗的に作用し、神経突起の形成と伸長に抑制的に機能することが知られている [17] [18]。また、Rap1B や Akt は、将来軸索になる神経突起以外で Proteasome 系を介した分解を受けていること、Proteasome 阻害剤の添加より Rap1B、Akt の局在が変化し複数の神経突起に濃縮すること、そしてその結果、神経細胞に過剰軸索が形成されることも報告されている [19] [20]。これらのことは、神経細胞が一本の神経突起を選択的に軸索へと分化させ正常な極性を形成するためには、局所的に活性化される軸索形成促進因子と共に、その抑制因子やタンパク質分解系をはじめとする様々な分子機構が細胞全体で協調的に機能することが必要であることを示唆している。

さらに、神経細胞が一度獲得した極性をどのように維持しているのか、その分子メカニズムについても知見は乏しい。Jiang らは極性形成後の神経細胞においても、GSK3 β の阻害剤の添加により過剰軸索の形成が誘導されることを報告した [15]。このことは、極性を獲得した神経細胞においても、単一の軸索を持つ極性のある形態を維持する分子メカニズムが存在すること、そして樹状突起において軸索への転換を積極的に抑制する分子メカニズムが存在する可能性を示唆している。

これまでに、極性を獲得した神経細胞内において特定のタンパク質、特定の翻訳後修飾を受けたタンパク質が軸索、あるいは樹状突起に選択的に局在することが知られている [5] [7] [21] [22]。これらの分子は軸索や樹状突起の神経伝達を行う機能に重要であると共に、神経細胞の極性を持った形態の形成と維持に深く関わっている可能性が考えられる。このことから、神経極性の形成と維持には、特定の分子が関与するだけでなく、局所における特異的なシグナルと、細胞全体に広く分布するシグナルが時空間的に制御され、その中で多くの分子が協調して機能することが重要であると考えられる。そして、神経極性の形成、維持の分子メカニズムを理解するためには、細胞内におけるタンパク質全体を把握し、タンパク質分子の局在や翻訳後修飾、時間的な発現量の変動などを網羅的に検出する必要がある。しかしながら、従来行われてきた分子生物学的手法ではこれらを検出することは難しい。

近年、細胞内のタンパク質全体を網羅的に検出できる手法として、プロテオーム解析が盛んに行われており、その中でも二次元電気泳動法はプロテオーム解析の中核を担う技術である。二次元電気泳動法はタンパク質を固有の等電点と分子量によって平面ゲル上に分離する技術であり、組織や細胞に含まれるタンパク質を二次元ゲル上に同時に検出し、そのタンパク質マップを手に入れることができる。二次元電気泳動法によるプロテオーム解析において、より網羅

的にサンプルに含まれるタンパク質を検出するためには、高分解能、高感度の検出技術が求められる。これまでに我々は様々な二次元電気泳動法の改良を試み、超大型二次元電気泳動ゲルを用いて、一般に分離が困難とされる不溶性タンパク質 [23]、塩基性タンパク質 [24] においても高解像度二次元電気泳動パターンを得る手法を確立してきた [25] [26] [27]。

我々の研究グループは、神経極性の形成と維持に重要な機能を担う分子群の網羅的探索を目的とした高解像度二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析を行った。本研究において、私は神経細胞の極性形成期に発現量が変動するタンパク質、および軸索または樹状突起・細胞体に特異的に濃縮するタンパク質の探索を行い、その中で、分子量約 57 kDa の新規タンパク質 Singar1 (Single axon related 1) (KIAA0871/RUFY3/Rap2 interacting proteinX) を同定した [28]。この分子はプロテオーム解析において、極性形成に伴い発現量が上昇する分子、そして軸索に濃縮する分子の一つとして検出されたことから、神経極性の形成と維持に深く関与すること示唆された。Singar1 は 469 アミノ酸からなり、N 末端に近年見出された機能未知のドメインである RUN (Rap2 interacting protein8, UNC-14, NESCA homology) ドメイン [29] を有している。RUN domain を持つ分子は Genome project から複数その存在が予測されているが、具体的な分子機能は明らかにされていない。本研究では、神経極性形成の分子レベルの理解を目指し、新規分子 Singar1 の発現および細胞内局在解析、神経極性形成における Singar の分子機能の解析、および神経極性形成における分子作用機構の解析を行った。

方法と材料

1, 抗体

抗 Myc ポリクローナル抗体 (562)、抗 Myc モノクローナル抗体 (M047-3) は MBL より購入した。抗非リン酸化型 Tau 抗体 (Tau-1, MAB3420) は Boehringer Mannheim より購入した。抗 Synaptophysin 抗体 (SY38) は Progen より購入した。抗 MAP-2 抗体 (HM-2)、抗 Flag M2 抗体 (F3165) は Sigma Aldrich より購入した。抗 β III-tubulin 抗体 (TUJ-1, MMS-435P) は Covance より購入した。抗 Shootin 抗体は [13] のように作成した。Anti-rabbit-IgG HRP conjugated (NA9340)、Anti-mouse-IgG HRP conjugated (NA931) は GE Healthcare より購入した。Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (A11032)、Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (A11029)、Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (A11037)、Rhodamine Phalloidin (R415) は Molecular probes より購入した。

2, cDNAs

pCAGGS-myc-shootin1 は [13] のように作成した。恒常活性化型 PI 3-kinase p110 α (pUseamp-Myr-mouse-p110 α) は Upstate より購入した。

pCMV-FLAG-p110 α 、pCMV-Myc-p110 α は以下のように作成した。pUseamp-Myr-p110 α を鋳型とし、5'端プライマー 5'-GCGGATCCATGCCTCCACGACCATCTTCGG-3'および 3'端プライマー 5'-GCGGATCCGTTCAAAGCATGCTGCTTGATG-3'を用いた PCR により増幅された DNA を pBluescript II SK(+) の BamH I サイトにサブクローニングした。塩基配列を確認した後、再度 BamH I により切り出した p110 α を、pCMV (Stratagene)-Myc および pCMV-FLAG のマルチクローニングサイトにある BamH I または Bgl II サイトにサブクローニングした。

pCMV-FLAG-p85、pCMV-Myc-p85 は以下のように作成した。P8 ラット脳から RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて RNA を回収し、逆転写反応により cDNA を作成した。作成した cDNA を鋳型とし、5'端プライマー 5'-GAGGATCCATGAGCGCAGAGGGGTACCAG-3'および 3'端プライマー 5'-GAGGATCCTCATCGCCTCTGTTGTGCATATAC-3'を用いた PCR により増幅された DNA を pBluescript II SK(+) の BamH I サイトにサブクローニングした。塩基配列を確認した後、再度 BamH I により切り出した p85 を、pCMV-Myc および pCMV-FLAG のマルチクローニングサイトにある BamH I サイトまたは Bgl II サイトにサブクローニングした。得られた Plasmid は Plasmid Maxi Kit (Qiagen) により精製し、哺乳類細胞発現用 Plasmid とした。

3, 細胞培養

3-1, HEK293T 細胞

HEK293T 細胞は、10% FCS 含む Dulbecco modified eagle medium (DMEM) (Sigma) 中、CO₂ 濃度 5%、37°C のインキュベータ内で培養した。

3-2, 海馬組織のブロック培養

胎生 18 日目の Wister 系ラット (日本 SLC) 全脳を 0.4% の Glucose (Sigma) を含む PBS (pH 7.4) 中に回収した。速やかに海馬を摘出し、注射針を用いて、1 mm 角のブロックに断片化した後、大腸菌用プラスチックシャーレ上で Neurobasal Medium (Gibco Invitrogen) 中、浮遊状態で 2 日間、CO₂ 濃度 5%、37°C の CO₂ インキュベータ内で培養を行った。この後、予め Poly-D-Lysine (Sigma) および Laminin (旭テクノガラス) でコートしたプラスチックディッシュに移し、2% B27 supplement (Gibco invitrogen), 1 mM L-Glutamine (Sigma), 2.5 μM Cytosine β-D-Arabinofuranoside (Sigma) を含む Neurobasal Medium 中 [30] [31]、CO₂ 濃度 5%、37°C の CO₂ インキュベータ内で培養を行った。培養 Medium は 3 日に 1 度、全体の 3 分の 2 量を交換した。

3-3, 海馬神経細胞の初代培養

胎生 18 日目の Wister 系ラット全脳を 0.4% の Glucose を含む PBS (pH 7.4) 中に回収した。速やかに海馬を摘出し、0.18% Glucose, 0.1% BSA (Sigma), 0.0012% DNase (Sigma), 0.05% Papain (ナカライ) 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。37°C で 20 分インキュベートした後、上清を除いて 0.18% Glucose, 0.1% BSA, 0.0012% DNase を含む PBS (pH 7.4) 3 ml 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および 37°C でのインキュベートを 10 分を行った。海馬組織より Dissociate された細胞を含んだ上清は、氷上の別のチューブに回収し、沈澱している海馬組織には新たな 0.18% Glucose, 0.1% BSA, 0.0012% DNase 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 度でのインキュベートを、海馬組織の細胞が完全に Dissociate されるまでくり返し行った。遠心分離 (1,000 rpm, 20 分, 4°C) により回収した神経細胞を、10% FCS を含む Neurobasal medium 5 ml に再度懸濁し、細胞数をカウント後、Transfection をはじめとした目的の実験に用いた。神経細胞は、約 $1.2 \times 10^3 / \text{mm}^2$ の濃度で培養し、培養 Medium として、2% B-27 supplement (Gibco), 1 mM Glutamine (Sigma) を含む Neurobasal medium を用いた [30] [31]。また、CO₂ 濃度 5%、37°C のインキュベータ内で培養し、培養 Medium は 3 日に 1 度、半量を交換した。

4, 海馬神経細胞の軸索および樹状突起・細胞体のプロテオーム解析

4-1, 海馬組織ブロックの^[35S]標識

海馬組織ブロックを上述のように 2 週間培養した後、海馬ブロックから軸索がシート状に広がっているのを確認し、Promix L-^[35S] in vitro cell labeling mix (containing ~70% L-^[35S] methionine and ~30% L-^[35S] cysteine) (GE Healthcare) を含む培地中で 24 時間培養し、神経細胞内のタンパク質を ^[35S]Cysteine および^[35S]Methione で標識した。

4-2, 軸索および樹状突起・細胞体の分離サンプルの調製

標識した海馬ブロックおよび軸索シートを Neurobasal Medium で数回洗浄した。その後ピペッティングによる水流で海馬ブロックのみをプラスチックディッシュ底面から剥離させ、海馬ブロックに多く含まれる樹状突起・細胞体とディッシュに残った軸索シートを分離した。剥離させた海馬ブロックはピペットで集め、プラスチックチューブに回収した。ディッシュ底面に残った軸索シートは再度 Neurobasal Medium で数回洗浄した。洗浄液を完全に除去した後、ラット全脳不溶性画分のタンパク質 60 µg を含む 650 µl のタンパク質抽出用 Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 6 mM 2-Mercaptoethanol, 2 mM PMSF, 20 mg/ml Leupeptin) をディッシュに加え、スクレーパーを用いて底面に残った軸索シートを採取し、プラスチックチューブに回収した。先に回収してあった海馬ブロックにも、ラット全脳不溶性画分のタンパク質 60 µg を含む 750 µl のタンパク質抽出用 Buffer を加えた。それぞれのプラスチックチューブを氷上に置き、細胞膜および細胞内オルガネラを破碎するために超音波処理を行った。温度上昇を避けるため、氷上で短時間の処理を数回に分けて行い、プラスチックチューブ内の海馬組織が十分破碎されるまで行った。超音波処理後、遠心分離 (15,000 rpm, 30 分, 4°C) を行い、不溶性画分をペレットとして回収した。回収されたペレットにサンプル調製液 (7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS, 0.5% Triton X-100, 0.5% IPG buffer pH 3-10, 100 mM DTT, Traser Orange G) を加え、超音波処理を行い、回収したペレット中のタンパク質を溶解させた。2D Clean Up Kit (GE Healthcare) による脂質、塩類の除去を行った後、タンパク質を再度サンプル調製液に溶解し、二次元電気泳動用サンプルとした。調製後は使用するまで -80°C で保存した。

4-3, 軸索および樹状突起・細胞体サンプルの二次元電気泳動

二次元電気泳動は [25] [26] [27] に基づき行った。調製した軸索および樹状突起・細胞体の二次元電気泳動用サンプル少量を液体シンチレーションカウンタ (Beckman) にかき、それぞれのサンプルに含まれる放射線量を測定した。

等電点電気泳動を pH 4.5-5.0, 4.5-5.5, 5.0-6.0, 5.5-6.7 の範囲で行う場合は、2 つのサンプルの放射線量が等しくなるようにサンプル調製液で 360 μ l にメスアップし、このタンパク質溶液で乾燥状態の IPG Strip (GE Healthcare) を膨潤させてタンパク質を添加した。等電点電気泳動を pH 6.0-9.0 の範囲で行う場合は放射線量が等しくなるようにサンプル調製液で 100 μ l にメスアップし、サンプル調製液で事前に膨潤させておいた IPG Strip にサンプルカップを用いて酸性側よりタンパク質を添加した。等電点電気泳動を pH 4.5-5.0, 4.5-5.5, 5.0-6.0, 5.5-6.7 の範囲で行う場合は、まず 500 V で 2 時間泳動し、6 時間で緩やかに 3500 V まで電圧を上げ、その後 3500 V で 37 時間の泳動を行った[14]。等電点電気泳動を pH 6.0-9.0 の範囲で行う場合は、300 V で 3 時間泳動を行った後、6 時間で緩やかに 1400 V まで電圧を上げ 16 時間泳動を行い、その後 3 時間で 3500 V まで電圧を上げた後 3 時間泳動を行った。

等電点電気泳動終了後の IPG Strip を還元化用平衡化 Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M Urea, 30% Glycerol, 2% SDS, 65 mM DTT, Traser Bromophenol Blue) およびアルキル化用平衡化 Buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M Urea, 30% Glycerol, 2% SDS, 135 mM Iodoacetamide, Traser Bromophenol Blue) 内でそれぞれ 20 分間震盪し、13.5% ポリアクリルアミドゲル上に気泡が入らないように密着させた。その後電気泳動用 SDS Buffer に溶解させた 0.5% Agarose で封入し、SDS-PAGE を行った。泳動槽は、幅 24 cm \times 高さ 70 cm 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。

二次元目 SDS-PAGE 終了後、ゲルをゲルドライヤー (RAPIDRY, ATTO) 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、BAS-2500 IP Reader (富士フィルム) で読み取り、ゲルイメージを得た。

4-4, 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を複数の人間が目視により確認し、軸索サンプルを用いたゲルイメージでスポット強度が増加しているものを選択した。その中で、3 回から 7 回の試行のうち、半分以上で再現性があるものを有意なものとして判定した。また特に再現性が高いスポットや、スポット強度の上昇が著しいものに関しては、ゲルイメージのスポット強度を、ImageGauge software (富士フィルム) を用いて定量化し、統計学的な評価を行った。

5, 神経細胞極性形成に伴い発現量が変動するタンパク質の探索

5-1, [³⁵S]標識 Stage 2/Stage 3 サンプルの調製

5.0×10^6 個の神経細胞をあらかじめ Poly-D-lysine および Laminin でコートした 60 mm プラスチックディッシュ上で前述の条件下で培養した。RI 標識ア

ミノ酸は、Pro-mix L-[³⁵S] in vitro cell labeling mix を用いた。上述の条件で 10 時間培養を行った後、RI 標識アミノ酸を含む培地に交換し 4 時間標識した神経細胞のタンパク質を Stage 2 サンプルとした。一方、58 時間培養を行った後同様に標識培養を行った神経細胞のタンパク質を Stage 3 サンプルとした。4 時間の標識後、細胞を通常の Neurobasal Medium 5 ml で 2 回洗浄し、500 μ l のサンプル調製液に溶解させた。細胞を溶解して回収する際、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 60 μ g を加え共に回収した。1 時間、室温でインキュベートした後、15,000 rpm、1 時間、室温で遠心分離を行った。回収した上清から 2D Clean-Up Kit により不純物を除いた後、サンプル調製液に再溶解させ二次元電気泳動用サンプルとした。調製後は使用するまで -80°C で保存した。

5-2, Stage2/Stage3 サンプルの二次元電気泳動およびディファレンシャル解析

放射線量を合わせた Stage 2 サンプル、Stage 3 サンプルは、上述のように IPG Strip への添加、等電点電気泳動、二次元目 SDS-PAGE を行い、ゲルイメージを得た。得られたゲルイメージは、複数の人間の目視により解析し、明らかに発現が上昇あるいは減少しているスポットを変動があるものとした。Stage 3 において発現が上昇あるいは減少しているスポットは、3 回から 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スポットを発現の変動した分子と判定した。スポットの定量解析には ImageGauge software を用いた。

6, 質量分析用サンプルの調製

6-1, RI 標識サンプルと非標識サンプルの二次元電気泳動ゲルでの二重染色

樹状突起・細胞体から得られた RI サンプルと生後 14 日目ラット全脳タンパク質を 400 μ g から 1.5 mg 混合し、二次元電気泳動を行った。同様に、Stage2/Stage3 の神経細胞から得られた RI サンプルと生後 1 日目ラット全脳タンパク質を 400 μ g から 1.5 mg 混合し、二次元電気泳動を行った。二次元目 SDS-PAGE 後、銀染色を行い、ゲルを乾燥させ、イメージングプレートに 2 週間感光させた。感光させ得られたイメージと銀染色により得られたイメージを重ね合わせ、タンパク質スポットの対応付けを行った。銀染色には、グルタルアルデヒドを使用しない Mortz らの Vorum silver staining protocol [32] に基づいて行った。以下の質量分析用に行った銀染色は全てこの方法を用いた。

6-2, 質量分析用タンパク質スポットの回収

微量なタンパク質スポットを銀染色で検出するためには目的とするスポット

に含まれるタンパク質量を増やす必要があったため、一部の二次元電気泳動にはラット全脳不溶性画分をゲルろ過法 (Hiload 26/60 Superdex 200 Prep Grade) により分画し、アセトン沈殿により濃縮したものをサンプルとして用いた。2D Clean Up Kit による脂質、塩類の除去を行った後、100 μ l または 360 μ l にタンパク質可溶化バッファーに溶解し、二次元電気泳動に用いた。

7, 質量分析

7-1, In-gel Digestion

二次元電気泳動後、銀染色を行ったゲルから切り出したタンパク質スポットを、銀染色脱色溶液 (100 mM Thiosodium Sulfate, 30 mM Potassium Ferrioxalate) に浸し、銀染色の脱色を行った。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% Acetonitrile (WAKO) を加えて 15 分間静置した。上清を除いて 100% Acetonitrile を加えて 20 分間チューブミキサー (TOMY) により震盪して脱水した。上清を除き、100 mM NH_4HCO_3 でゲル断片を平衡化した後、終濃度 60% になるように Acetonitrile を加えて 15 分間チューブミキサー (TOMY) で震盪し脱水させた。上清を除き、遠心エバポレーター (TOMY) により 15 分間真空乾燥を行った。乾燥させたゲル断片に 0.1% RapiGest (Waters), 50 mM NH_4HCO_3 を加えゲルを膨潤させ、37°C、10 分インキュベートした [33]。反応後 RapiGest 溶液を吸い取り、再び 30 分間真空乾燥を行い、ゲル断片を完全乾燥させた。その後氷上で Trypsin 溶液 (12.5 ng/ μ l Trypsin/50 mM NH_4HCO_3) を少しずつゲル断片が完全に膨潤するまで加え、45 分氷上でインキュベートした。余った Trypsin 溶液を除き、新たに 50 mM NH_4HCO_3 を加えて 37°C インキュベータ内で一晚酵素消化反応を行った。

7-2, ペプチド抽出と脱塩

酵素消化反応を行った後、上清を別のマイクロチューブに集め、新たに 25 mM NH_4HCO_3 を加え 15 分間超音波処理を行った。さらに等量の 100% Acetonitrile を加え 15 分間超音波処理を行った。上清を回収後、5% HCOOH (Sigma) をゲル断片に加えて 15 分間超音波処理を行った。上清マイクロチューブに回収し、遠心エバポレーターにより 10 μ l 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 μ g/ μ l α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma) を含む 70% Acetonitrile/0.1% TFA で溶出し、MALDI プレート上で結晶化させた。

脱塩カラムは Poros RP R2 (逆相カラム, ビーズサイズ 20 μ m, Applied Biosystems) [34] を GELoder tip (Eppendorf) 内に 5mm 長になるよう充填

させたものを用いた。

7-3, 質量分析および Database Search

質量分析は MALDI-TOF-MS (Voyager, Applied Bio Systems) および LC-MS/MS (LC-Q DECA,サーモクエスト) により行った。Database には NCBI(nr)を用いた。

8, Singar のクローニング

Human singar1 の Open reading frame を含む cDNA (KIAA0871) は、かずさ DNA 研究所の小原収博士、長瀬隆弘博士より頂いた。この cDNA を鋳型として、5'端プライマー5'-GCGGATCCATGTCTGCTCTGACGCTCCGAC-3'、および 3' 端 プ ラ イ マ ー 5'-GCGGATCCCTAATGATGTTTTGGGATCAGTTTATTTG-3'を用いて PCR を行い、増幅された約 1.4 kbp の DNA を pBluescript II SK(+) (東洋紡) のマルチクローニングサイトにある BamH I サイトにサブクローニングした。DNA 配列を確認した後、再度 BamH I で切り出した Human singar1 を pGEX-6P-1 (GE Healthcare) の BamH I サイトにサブクローニングし、大腸菌における Human singar1 リコンビナントタンパク質の作成に用いた。

Rat singar1 および Rat singar2 は以下のようにクローニングを行った。P8 ラット脳から RNeasy mini kit を用いて RNA を回収し、逆転写反応により cDNA を作成した。作成した cDNA を鋳型とし、5' 端 プ ラ イ マ ー 5'-GCGGATCCATGTCTGCCCTGACGC-3'、および 3' 端 プ ラ イ マ ー 5'-GCGGATCCCTAATGATGTTTTGGGATCAGTTTATTTG-3'を用いて PCR を行い、増幅された約 1.4 kbp の DNA を、pBluescript II SK(+)のマルチクローニングサイトにある BamH I サイトにサブクローニングした。DNA 配列を確認した後、再度 BamH I で切り出した Rat singar1 および Rat singar2 を pCMV-Myc、pCMV-FLAG、pCAGGS-Myc (大阪大学・宮崎純一博士から分与) [35] の BamH I サイトまたは Bgl II サイトにサブクローニングし、HEK293T 細胞および培養海馬神経細胞での発現用 Plasmid として用いた。

9 抗 Singar 抗体の作成

9-1, 抗原タンパク質の調製

上述のように作成した pGEX-6P-human-singar1 を *E. coli*. BL21(DE3)CodonPlus (Stratagene) に形質転換し、終濃度 0.1 mM IPTG でタンパク質の発現誘導を行った。4 時間、20°C で発現誘導をかけた菌体を遠心分離 (5,000 rpm, 15 分, 4°C) により回収し、冷却した PBS で菌体ペレットを

洗浄後、再び遠心分離により菌体を回収した。得られた菌体を、菌体重量の 5 倍重量の Buffer A (50 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl₂, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 25 μM PMSF, 10 μg/ml Leupeptin) 内で超音波処理により破砕し、30 分間氷上で静置した。未破砕菌体および不溶性タンパク質を超遠心分離 (100,000×g, 1 時間, 4°C) により取り除き、さらに上清を 0.45 μm pore filter に通し不溶性タンパク質を取り除いた。Glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) を加え、3 時間、4°C でローテーションにより混合し、GST 融合タンパク質を樹脂に結合させた。オープンカラムに樹脂を充填し、樹脂の 10 倍容量の Buffer A でカラムを洗浄した後、GST 融合タンパク質を Elution buffer (10 mM 還元型 Glutathione を含む BufferA, pH 8.0) で溶出した。溶出の際には、充填した樹脂と等量の Elution buffer で 5 回溶出し、各溶出フラクションに含まれるタンパク質を Bradford 法および SDS-PAGE にて確認した。目的タンパク質を多く含むフラクションをまとめ、Buffer B (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT) で透析を行った。透析外液は 6 時間おきに 3 回交換した。透析終了後の GST 融合タンパク質溶液に PreScission Protease (GE Healthcare) を 1 unit/100 μg の濃度で加え、12 時間、4°C でインキュベートした後、Glutathione sepharose を加え GST と未切断 GST 融合タンパク質を取り除いた。回収した上清は、GST 融合タンパク質から GST が除けていることを SDS-PAGE で確認した。PBS で透析し、免疫抗原タンパク質とした。

9-2, 抗体の Affinity 精製

上記のように大腸菌に発現させた GST-singar1 を Coupling buffer (0.1M NaHCO₃, 500 mM NaCl) により透析した。膨潤させた CNBr-activated sepharose 4B (GE Healthcare) 0.7ml に 3.5 mg の GST-singar1 を含む透析後タンパク質溶液を加え、4°C、Over night でローテーションにより混合しタンパク質を結合させた。上清を取り除き、Blocking buffer (100 mM Tris-HCl pH8.0) を加え、さらに 4°C、Over night でローテーションにより混合した。上清を取り除いた後、樹脂を 5 倍容量の Washing buffer A (0.1M CH₃COOH-NaOH pH4.0, 500 mM NaCl) および Washing buffer B(100 mM Tris-HCl pH8.0, 500 mM NaCl) で交互に 3 回洗浄した。30 分、56°C で処理し非動化した抗血清を樹脂に添加し、4°C、Over night でローテーションにより混合した。オープンカラムに樹脂を充填し、5 倍容量の TBS、および 10 倍容量の Washing buffer C (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 1% TritonX-100) でカラムを洗浄した。再度、5 倍容量の TBS でカラムを洗浄した後、Elution buffer (0.1M Glycine-HCl pH2.5, 10% Ethyleneglycol) で抗体を溶出させた。溶出の際には、樹脂の 1/2

容量の Elution buffer で 5 回し、各フラクションの OD280 を測定後、最も高い値を示すものを抗体溶液とした。また、溶出の際には、回収するチューブに中和用 Buffer (1 M Tris-HCl pH8.0) を予め入れておき、回収した溶液が pH7.5 付近になるようにした。GST に Affinity を示す抗体を除去するため、回収した抗体溶液を TBS で透析し、GST を結合させた CNBr-activated sepharose 4B と 4°C、Over night でローテーションにより混合した。上清を回収し、抗 Singar 抗体として以後の実験に用いた。

10, Immunoblot

SDS-PAGE 後のゲルから PVDF 膜 (Millipore) へタンパク質の転写には Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell (Bio-Rad) を用い、2 mA/cm² で室温、90 分行った。転写後の PVDF 膜は 5% Skim milk を含む TBS で室温、1 時間ブロッキングした後、2% Skim milk, TBS で希釈した抗体液で 1 晩、4°C で 1 次抗体反応を行った。1 次抗体反応後、PVDF 膜は 0.05% Tween 20 を含む TBS で 3 回洗浄し、0.05% Tween 20 を含む TBS で希釈した Anti-rabbit IgG-HRP または Anti-mouse IgG-HRP で 2 次抗体反応を 1 時間、室温で行った。0.05% Tween 20 を含む TBS で 3 回洗浄し、ECL 試薬 (GE Healthcare) を用いて、タンパク質のシグナルを X 線フィルム (富士フィルム) に感光させ検出した。

11, HEK293T 細胞への Transfection

HEK293T 細胞への Transfection はリン酸カルシウム法により行った。遺伝子導入前に培養 Medium を交換し、4 時間、37°C の 5% CO₂ インキュベータ内で培養を行った。プラスミド DNA を含む 250 mM CaCl₂ 溶液に、等量の 2×BES (pH 7.00) をオートピペッターで泡立てながら滴下し、滴下後 30 分間静置した。プラスミド DNA 溶液を、細胞培養液に加え、インキュベータ内で 24 時間培養した。24 時間後、新しい培養 Medium に交換し、さらに 24 時間培養した後目的の実験に用いた。

12, Singar の発現解析

12-1, 成体ラットにおける Singar の発現分布

Wister 系成体ラットより脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、肺、骨格筋、および胎盤を回収し、1×SDS サンプルバッファーを用いてタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質 5 µg を SDS-PAGE により分離し、抗 Singar 抗体による Immunoblot を行った。

12-2, 脳タンパク質の λ Phosphatase 処理

P5 ラット脳を Homogenize buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, 2 mM MnCl₂, 25 μ M PMSF, 10 μ g/ml Leupeptin) 中でポッターホモジナイザーを用いて破碎した。 λ Phosphatase (New England Biolabs) を 4 unit/ μ l の濃度で加え、室温で 30 分静置した。その後、等量の 2 \times SDS サンプルバッファーを加え、抗 Singar 抗体による Immunoblot に用いた。

12-3, HEK293T 細胞の CalyculinA 処理

HEK293T 細胞 (60 mm ディッシュ) に pCMV-Myc-singar1 (5 μ g) を導入した。48 時間経過後、培養 Medium に CalyculinA (終濃度 100 nM) または DMSO を加え、37 $^{\circ}$ C の CO₂ インキュベータ内で 20 分静置した。CalyculinA の作用により細胞が Medium 中に浮いてきたことを確認し、細胞を Medium と共にプラスチックチューブに回収した。遠心分離 (1,000 rpm, 10 分, 4 $^{\circ}$ C) 後、上清を除き、冷却した PBS を加え細胞を Suspend した後、再度遠心分離を行い細胞を回収した。上清を除いた後、1 \times SDS サンプルバッファーを加え細胞内のタンパク質を回収した。その後抗 Myc 抗体による Immunoblot を行った。

12-4, 培養海馬神経細胞における Singar の発現変動解析

上記のように回収した 1.0 \times 10⁶ 個の海馬神経細胞を、Poly-D-lysine/Laminin でコートした 35 mm プラスチックディッシュに撒いた。培養開始後 14 時間、62 時間、7 日、14 日、28 日の神経細胞から 1 \times SDS サンプルバッファーを用いてタンパク質を回収し、3 μ g のタンパク質を SDS-PAGE により分離した。抗 Singar 抗体による Immunoblot を行い、検出した Singar のバンド強度を ImageGauge により定量した。

12-5, ラット脳における発生に伴う Singar の発現解析

E15、E18、P1、P4、P7、P14、および成体ラットより摘出した全脳を、RIPA buffer (20 mM Tris-HCl pH7.4, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% TritonX-100, 0.1% Sodium deoxycholate, 5 mM DTT, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 25 μ M PMSF, 10 μ g/ml Leupeptin) 中でポッターホモジナイザーにより破碎した。30 分氷上で静置した後、遠心 (15,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15 分) により未破碎組織を解き除いた。上清に等量の 2 \times SDS サンプルバッファーを加え、SDS-PAGE、抗 Singar 抗体による Immunoblot を行い、検出した Singar のバンド強度を ImageGauge により定量した。

13,免疫細胞染色

免疫細胞染色は〔5〕のように行った。培養 Medium と等量の 7.4% ホルムアルデヒドを含む PBS を加え、氷上で 10 分間静置し細胞を固定した。2 ml の氷冷した PBS を加え、アスピレータで吸出し、新たな PBS を 2 ml 加えた。この操作を 3 回繰り返す、氷上で 10 分間静置した。完全に PBS を吸い取り、素早く -20°C で冷却したメタノールを加え、 -20°C で 10 分間静置し、透過処理を行った。完全にメタノールを吸い取り、素早く 10% 正常ヤギ血清 (フナコシ) を含む PBS を加え、1 時間、室温で静置しブロッキングを行った。カバースリップを 24 穴マイクロプレートの上蓋に取り出し、10% NGS を含む PBS で希釈した一次抗体を加え 1 晩、 4°C でインキュベートした。一次抗体反応後、上蓋に静かに冷却した PBS を流し込み、カバースリップを 3 ml の PBS を入れた 24 穴マイクロプレートに戻し、氷上で 1 時間静置した。カバースリップを 24 穴マイクロプレートの上蓋に取り出し、PBS で希釈した二次抗体を加え、暗所で 1 時間、室温で静置した。二次抗体反応後、上蓋に静かに冷却した PBS を流し込み、カバースリップを 3 ml の PBS を入れた 24 穴マイクロプレートに戻し、室温で 1 時間静置した。スライドガラス上にマウントし、カバーガラスをかけ、50% Glycerol を含む PBS を隙間から流し込み、マニキュアで密閉した。

14, Singar の細胞内局在解析

14-1, CMFDA 標識

培養 50 時間 (Stage2 および Stage3 の細胞観察)、または培養 5 日 (Stage4 の細胞観察) の神経細胞の培養液に、CMFDA (終濃度 0.2%) (Molecular probes) を加え、30 分間 CO_2 インキュベータ内で静置した。その後、細胞を固定し、一次抗体に抗 Singar 抗体 ($0.2 \mu\text{g/ml}$)、二次抗体に Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (1,000 倍希釈) を用いて免疫染色を行った。

14-2, 染色強度の定量

免疫染色強度は、Axioplan2 (Plan-NEOFLUAR $\times 40$, 0.75 NA, or $\times 20$, 0.50 NA objective, AxioCamMRm CCD camera, Axiovision3 imaging software, Carl Zeiss) により得た細胞の蛍光イメージを、MetaMorph imaging system (Universal imaging company) により、1 pixel 幅のラインで、 $0.32 \mu\text{m}$ 間隔で測定し解析した。

14-3, Rhodamin/phalloidin との二重染色

培養 50 時間の神経細胞を固定し、一次抗体に抗 Singar 抗体、二次抗体に Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1,000 倍希釈) を用いて免疫染色を行っ

た。二次抗体の洗浄後、カバースリップを 24 穴マイクロプレートの上蓋に取り出し、10%正常ヤギ血清を含む PBS で希釈した Rhodamine Phalloidin (150 倍希釈) を加え、暗所で 30 分、室温で静置した。反応後、PBS を入れた 24 穴プレートに移し、暗所で 30 分、室温で静置した。その後、上述の様にマウントし、観察に用いた。

15, 神経細胞への遺伝子導入

神経細胞への遺伝子導入には、リン酸カルシウム法、Lipofection2000 (Gibco Invitrogen)、Nucleofector (Amaxa) を用いた。

リン酸カルシウム法は以下のように行った。HEK293T 細胞への遺伝子導入と同様に DNA/カルシウムの沈殿を作成し、24 穴プレートで培養中の神経細胞の培養 Medium に添加した。90 分、インキュベータ内で静置した後、37°C に温めた 4 ml の DMEM により DNA/カルシウムの沈殿物を洗浄した。洗浄後、2% B27 supplement, 1 mM Glutamine を含む Neurobasal medium に培地を交換し、実験に用いるまで培養を行った。

Lipofectamine2000 による遺伝子導入は以下のように行った。Plasmid DNA または RNA を含む 50 μ l Neurobasal medium を、2 μ l の Lipofectamine2000 を含む 50 μ l Neurobasal medium と混合し、室温で 30 分静置した。海馬より回収した 1×10^6 個の細胞を含む 300 μ l の Neurobasal medium/10% FCS を、先に混合した Lipofectamine2000 溶液に加え、CO₂ インキュベータ内で 90 分静置した。2 ml の Neurobasal medium/10% FCS が入ったチューブに細胞溶液を移し、遠心 (1,000 rpm、15 分、4°C) により細胞を回収した。上清を除いた後、1 ml の Neurobasal medium/10% FCS に再度懸濁し、Poly-D-lysine および Laminin であらかじめコートしたカバースリップに細胞をプレートした。3 時間 CO₂ インキュベータ内で静置した後、培養 Medium を 2% B27 supplement および 1 mM Glutamine を含む Neurobasal medium に交換し、その後、実験に用いるまで培養を行った。

Nucleofector による遺伝子導入は以下のように行った。海馬より回収した細胞は、10%FCS を含む Neurobasal medium に代え PBS に Suspend した。2.5 $\times 10^6$ 個の細胞を含む PBS を遠心 (1,000 rpm、15 分、4°C) にかけて、上清を取り除いた後、回収した細胞を siRNA または scRNA を含む Rat Neuron Nucleofector Solution (Amaxa)/ Supplement (Amaxa) 混合溶液 (容量比 4 : 1) 100 μ l に再度 Suspend した。専用キュベットに移し、Nucleofector 装置の Program O-03 により RNA を導入した。キュベットから回収した細胞を 1.5 ml の 10%FCS を含む Neurobasal medium に Suspend し、Poly-D-lysine および Laminin であらかじめコートした 35 mm プラスチックディッシュに細胞をプ

レートした。3 時間 CO₂ インキュベータ内で静置した後、培養 Medium を 2% B27 supplement および 1 mM Glutamine を含む Neurobasal medium に交換し、その後、実験に用いるまで培養を行った。

16, 神経細胞における Singar の過剰発現

16-1, Singar 単独過剰発現による表現型解析

遺伝子導入は上述のように Lipofectamine2000 を用いて行った。pCAGGS-myc-GST (1.0 µg)、pCAGGS-myc-singar1 (1.0 µg)、pCAGGS-myc-singar2 (1.0 µg) を Transfection した神経細胞を、培養開始後 62 時間、または 6 日で固定し、免疫染色を行った。一次抗体には抗 Myc モノクローナル抗体 (7,000 倍希釈)、二次抗体には抗 Mouse-IgG Alexa488 conjugate (1,000 倍希釈) を用い、抗 Myc 抗体陽性の細胞について形態的評価を行った。

16-2, Shootin1 が誘導する過剰軸索形成に対する Singar の影響の解析

遺伝子導入は上述のように Lipofectamine2000 を用いて行った。pCAGGS-myc-shootin1 (0.5 µg) + pCAGGS-myc-GST (1.5 µg)、pCAGGS-myc-shootin1 (0.5 µg) + pCAGGS-myc-singar1 (1.5 µg)、pCAGGS-myc-shootin1 (0.5 µg) + pCAGGS-myc-singar2 (1.5 µg) をそれぞれ Transfection した神経細胞を、培養開始後 6 日で固定し、免疫染色を行った。一次抗体には抗 Myc モノクローナル抗体および抗 Shootin 抗体 (濃度)、二次抗体には Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG および Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (1,000 倍希釈) を用いた。抗 Myc 抗体陽性の細胞で、且つ Transfection されていない周囲の細胞に比べ抗 Shootin 抗体の染色が十分に強いものについて形態的評価を行った。Myc-Shootin1 の発現量は、同様に Transfection を行った神経細胞から 1×SDS サンプルバッファーを用いてタンパク質を回収し、抗 Myc モノクローナル抗体 (10,000 倍希釈) による Immunoblot を行い解析した。

17, RNAi 法による Singar の発現抑制

17-1, siRNA

siRNA (5'-GGCAAAGUAGAUGCGUUA-3') は Rat singar1 ORF の 846-864 (Singar2 に対しては 900-918) の塩基配列をターゲットとして設計した。コントロール RNA (scRNA, 5'-AGCGAAGGUUGACGCUCUU-3') は、siRNA のターゲット領域と同じアミノ酸をコードする異なる塩基配列として設計した。これらの RNA は Dharmacon より購入した。

17-2, siRNA による Singar の発現抑制効果の確認

siRNA および scRNA の神経細胞への導入は上述のように Nucleofector を用いて行った。40 pmol の RNA を導入した神経細胞を、予め Poly-D-lysine および Laminin でコートした 35 mm プラスチックディッシュに撒き、上述のように培養を行った。培養 Medium には、2% B-27 supplement、1 mM Glutamine、および 2.5 μ M cytosine β -D-arabinofuranoside (Sigma) を含む Neurobasal medium を用いた。培養 48 時間後、細胞を 1 \times SDS サンプルバッファーを用いてタンパク質を回収し、抗 Singar 抗体により Immunoblot を行った。Singar1、Singar2 のバンド強度は ImageGauge software を用いて定量した。

17-3, Singar 発現抑制による表現型解析

極性形成期における発現抑制の表現型解析について、神経細胞への RNA、DNA の導入は、上述のように Lipofectamine2000 を用いて行った。40 pmol RNA および 1.0 μ g pEGFP (Clontech) を導入した神経細胞は、6 日間培養後に固定し、GFP 陽性の細胞について解析を行った。

極性形成後の神経細胞における発現抑制の解析については、3 日間培養した神経細胞にリン酸カルシウム法により RNA、DNA を導入した。遺伝子導入後、さらに 3 日間培養を行い、培養 6 日目に細胞を固定し、GFP 陽性の細胞について解析を行った。

18, 免疫沈降

pCMV-Myc-singar1 (5.0 μ g), pCMV-FLAG-singar1 (5.0 μ g), pCMV-Myc-p85 (5.0 μ g), pCMV-FLAG-p85 (5.0 μ g), pCMV-Myc-p110 α (10 μ g), pCMV-FLAG-p110 α (10 μ g)を、図に示すような組み合わせで HEK293T 細胞に遺伝子を導入した。また、Transfection に用いる DNA 量は、pCMV-Myc empty vector または pCMV-FLAG empty vector を用いて揃えた。Transfection を行った 60 mm プラスチックディッシュで培養している HEK293T 細胞を、冷却した PBS で一度洗浄し、600 μ l の Cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 0.5% NP-40, 2 mM PMSF)に回収した。氷上で 30 分静置した後、超遠心分離 (100,000 \times g, 30 分, 4 $^{\circ}$ C)を行い、上清に 30 μ l の ProteinG-sepharose 4B (GE Healthcare) を加え、30 分、4 $^{\circ}$ Cでローテーションさせた。遠心後、回収した上清に 1.5 μ g の抗 FLAG M2 抗体を加え、2 時間、4 $^{\circ}$ Cでローテーションさせた。30 μ l の ProteinG-sepharose 4B を加え、さらに 30 分、4 $^{\circ}$ Cでローテーションさせ、抗 FLAG 抗体を樹脂に結合させた。Cell lysis buffer で 3 回樹脂の洗浄を行った後、30 μ l の SDS サンプルバッファーを加え、抗体と FLAG 融合タ

ンパク質複合体を可溶化した。95°Cで 5 分処理した後、SDS-PAGE および Immunoblot により細胞内における相互作用を解析した。抗 Myc ポリクローナル抗体は 1,000 倍希釈、抗 FLAG M2 抗体は 5,000 倍で使用した。

19, Singar 発現抑制に対する PI 3-kinase の解析

19-1, Singar 発現抑制による過剰軸索形成に対する PI 3-kinase 阻害剤の効果

上述のように Lipofectamine2000 を用いて siRNA および pEGFP を導入した神経細胞（培養 24 時間）の培養 Medium に LY294002（終濃度 20 μ M, Calbiochem）、または DMSO を添加した。さらに 5 日間培養を行った後に固定し、GFP 陽性の細胞について形態の解析を行った。

19-2, Singar 発現抑制に対する恒常活性化型 p110 α の効果

上述のように Lipofectamine2000 を用いて RNA、pEGFP、Myr-p110 α (1.0 μ g) を Transfection した神経細胞を培養 6 日目に固定し、GFP 陽性の細胞について形態の解析を行った。

結果

1, 神経極性形成・維持に関わる分子のプロテオーム解析による新規分子 Singar1 の検出と同定

神経細胞の極性の形成と維持に重要な分子群の探索として、我々は軸索と樹状突起・細胞体に濃縮するタンパク質、ならびに神経極性形成に伴い発現量が変動するタンパク質の二次元電気泳動法によるプロテオーム解析を行った。軸索と樹状突起・細胞体から RI 標識したタンパク質をそれぞれ回収し、二次元電気泳動により展開したゲルイメージを Autoradiography で検出した。得られたゲルイメージのディファレンシャルディスプレイ解析を行った結果、分子量約 55 kDa、pI 5.2 のタンパク質スポットが、軸索サンプルを含むゲルでより強く検出された (図 2A)。このスポット強度を定量的に解析した結果、樹状突起・細胞体と比べて軸索側で平均 2.7 倍 ($n=3$, $p<0.01$) 上昇していた。また、このスポットは、神経細胞の極性形成の前後で発現量が変動するタンパク質のプロテオーム解析において、極性形成後の神経細胞のタンパク質を含むゲル上で平均 2.3 倍 ($n=5$, $p<0.01$) 強く検出された (図 2B)。このことから、このスポットに含まれるタンパク質が神経細胞の軸索に濃縮し、また極性形成に伴い発現量が上昇することが示唆された。

神経極性形成の重要なステップである軸索形成時に発現量が上昇し、また機能的に特化した神経突起である軸索に濃縮することが示唆されたため、このスポットに含まれるタンパク質が神経極性の形成と維持に重要な機能を担っているのではないかと考えた。そこで、このタンパク質スポットについて、質量分析法による同定を試みた。ディファレンシャル解析に用いた RI 標識サンプルに含まれるタンパク量が少なかったため、銀染色による検出と質量分析法による同定を行うには不十分であった。質量分析法による同定を行うためには、多くのタンパク質を二次元電気泳動にかけ、1つのスポットに含まれるタンパク質量を増やす必要があった。そこで、ラット脳より回収したタンパク質とディファレンシャル解析に用いた RI 標識されたタンパク質を混合し二次元電気泳動を行った。そして銀染色と Autoradiography の 2 種類の方法でタンパク質スポットを検出し、タンパク質スポットの位置関係を対応付けた。これにより、銀染色のゲルイメージにおける、ディファレンシャル解析で検出された目的とするスポットの位置情報が得られた。続いて、より多くのラット脳タンパク質を用いて二次元電気泳動を行い、銀染色でタンパク質スポットを検出した。このゲルから目的のスポットを切り出し、In-gel digestion、および酵素消化によって得られたペプチドの MALDI-TOF MS による解析を行った。その解析により 16 本のペプチドが検出され (図 3A)、これらを Query としてペプチドマスフィン

ガープリント法によるデータベース検索を行った結果、KIAA0871 (RUFY3/Rap2 interacting proteinX) (gi:7662352) が同定された。Query に用いた 16 本のペプチドのうち 8 本がこのタンパク質にヒットしており、全体の Sequnce coverage は 18%であった (図 3B)。我々は、この分子を最初に GeneBank (NCBI) に登録していたかずさ DNA 研究所の小原収博士、長瀬隆弘博士と共同でこの分子を Singar1 (Single axon related 1) と名づけた。データベースによるドメイン検索の結果、Singar1 は機能未知ある RUN ドメイン、および 2 つの Coiled coil モチーフを持つタンパク質であった (図 4A)。また、ラットおよびマウスのゲノムデータベースにおいて、N 末端に 18 アミノ酸の挿入を持つ Splicing variant が登録されており、これを Singar2 と命名した (図 4A)。一方、ヒトのデータベースにはこの 18 アミノ酸を含む遺伝子は登録されていなかった。他のタンパク質とのアミノ酸配列の相同性検索を行った結果、Singar1 は他の RUN ドメインを持つタンパク質のなかでも、特に RUFY1/Rabip4 および RUFY2 と RUN ドメインで高い相同性を示した (図 4B)。ヒト、マウス、ラット間の Singar1 のアミノ酸配列を比較したところ、ヒト・マウス間で 98.7%、ヒト・ラット間で 99.2%、ラット・マウス間で 99.4% と非常に高い相同性を示し (図 5)、哺乳類の間で高度に保存されたタンパク質であることが示唆された。また、データベース検索では、*Pan troglodytes*, *Macaca mulatta*, *Bos taurus*, *Canis familiaris*, 及び *Gallus gallus* に Singar1 ortholog が存在しており、また *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Fugu rubripes*, 及び *Drosophila melanogaster* のデータベースに Singar1 ORF の部分断片が登録されていた。

2, Singar1 の脳特異的な発現とリン酸化修飾の検出

Singar1 の成体ラット各臓器におけるタンパク質の発現分布を解析するため、はじめに Singar に対する特異抗体を作成した。その抗体を用いて、成体ラットの脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、肺、骨格筋、および胎盤における Singar1 の発現を Immunoblot により解析した。その結果、脳由来のサンプルにおいて、55、56、60kDa 付近に 3 本のバンドが特異的に検出された (図 6A)。一方、その他の組織由来のサンプルでは Singar 抗体で認識されるバンドは全く認められなかった。

次に、脳特異的に検出された 3 本のバンドの中で、Singar1 に対応するものの同定を試みた。ラット脳から単離した Singar1 の cDNA を HEK293T 細胞に導入し、HEK293T 細胞に外来的に発現させた Singar1 の SDS-PAGE における移動度を脳由来サンプルで検出される 3 本のバンドと比較した。その結果、HEK293T 細胞に発現した Singar1 は最も移動度の大きい約 55 kDa のバンドと

同じ分子量に検出された (図 6B)。一方、HEK293T 細胞に外来的に発現させた Singar2 の SDS-PAGE の移動度を調べた結果、Singar2 は脳由来サンプルで検出されるバンドの中で最も高分子量のものと同じ移動度を示した (図 6B)。タンパク質は細胞内において様々な翻訳後修飾を受けており、リン酸化されたタンパク質は SDS-PAGE において高分子量へのバンドシフトを示すことが知られている。このことから、脳サンプルで検出される 3 本のバンドの中央のものは Singar1 がリン酸化修飾を受けたものではないかと考えた。これを検証するため、ラット脳から調製したタンパク質を λ -Phosphatase で脱リン酸化処理し、抗 Singar 抗体で認識されるバンドの泳動パターンの変化を調べた。その結果、3 本の中で中央のバンドの強度が減少し、逆に下のバンドの強度が増加した (図 6C)。さらに、Singar1 を発現させた HEK293T 細胞を Serine/Threonine phosphatase inhibitor である CalyculinA で処理した結果、Immunoblot で検出した Singar1 のバンドが高分子量側へシフトした (図 6D)。このことから、Singar1 は脳特異的に発現しており検出される 3 本のバンドのうち最も下のバンドと対応すること、Singar1 の Splicing variant である Singar2 も脳特異的に発現していること、そして Singar1 は生体内においてリン酸化修飾を受けていることが示唆された。

さらに、ディファレンシャル解析において同定したスポットが抗 Singar 抗体で認識されるのか、またディファレンシャル解析で検出した Singar1 がリン酸化修飾を受けたものであるのかを調べるため、成体ラット脳由来のタンパク質を二次元電気泳動法により展開したゲルで、抗 Singar 抗体による Immunoblot を行った。その結果、分子量 55-56 kDa、pI 5.0-5.3 の間に抗 Singar 抗体で認識される一連のタンパク質スポット群 (合計 22 個) が検出された (図 6E)。この検出パターンを、二重染色を行ったゲルイメージと対応付けたところ、質量分析により同定したスポットは酸性側にシフトした位置に検出されるスポット群の 1 つと対応するものであった (図 6E)。このように、質量分析法により同定したスポットが抗 Singar 抗体で認識されたことから、ディファレンシャル解析で検出したスポットが確かに Singar1 であり、さらにはリン酸化修飾を受けた Singar1 であったことが示唆された。そして Singar1 はリン酸化修飾をはじめとする複雑な翻訳後修飾を受けていることが示唆された。

3, 神経細胞の形態形成および脳の発達に伴う Singar の発現量の推移

Singar1 は極性形成に伴い発現量が上昇するタンパク質として検出、同定された。そこで、培養海馬神経細胞の極性形成に伴う Singar1 の発現量の変化を調べるため、異なる期間培養を行った海馬神経細胞からタンパク質を調製し、各 Time point における Singar1 の発現量を Immunoblot により解析した。その結

果、極性形成前（培養 14 時間）と極性形成後（培養 62 時間）の間で Singar1（2.0 倍, n=4, p<0.01）および Singar2（2.5 倍 n=4, p<0.01）の発現量の上昇が認められた（図 7A）。リン酸化 Singar1 は、極性形成に伴い発現量は増加したが（3.6 倍, n=4, p<0.05）、Singar1 や Singar2 と比較しその存在量は少なかった。7 日間培養を行ったサンプル (DIV7) では、Singar1、リン酸化 Singar1、Singar2 はいずれも最も高い発現レベルを示した（図 7A）。14 日間 (DIV14) または 28 日間 (DIV28) 培養を行ったサンプルでは、Singar2 は発現が低下しているのに対し、Singar1 とリン酸化 Singar1 は発現量が維持されていた（図 7A）。

次に、ラット脳の発達に伴う Singar1 の発現量の推移を解析した。胎生 15 日 (E15)、胎生 18 日 (E18)、生後 1 日 (P1)、生後 4 日 (P4)、生後 7 日 (P7)、生後 14 日 (P14)、および成体ラットの脳からタンパク質を回収し、Singar1 の各発生過程における発現量を Immunoblot により解析した。その結果、Singar1、リン酸化 Singar1、Singar2 は神経突起伸長が盛んな P4 サンプルで最も高い発現量を示した（図 7B）。Singar1 および Singar2 は胎生期から発現が認められ、生後直後から発現量が増加した（図 7B）。リン酸化 Singar1 は生後直後までは比較的存在量が少なく、P4 以降に存在量の増加が認められた。培養海馬神経細胞での発現量の推移と異なり、Singar1 およびリン酸化 Singar1 は P14 から成体にかけて緩やかに発現量が低下した（図 7B）。

4, Singar の神経細胞内局在の解析

Singar1 は軸索に濃縮するタンパク質の一つとして検出、同定されたことから、軸索に多く存在することが示唆された。このことを検証するため、免疫染色法により Singar1 の細胞内局在を解析した。抗 Singar 抗体は Singar1 および Singar2 の両方を認識する抗体である。そのため、内在性 Singar1 の神経細胞内局在を解析するためには、Singar1 と Singar2 の細胞内局在の違いについて検討しておく必要があった。そこではじめに、Singar1 と Singar2 の細胞内局在を調べるため、Myc-singar1 と Myc-singar2 を神経細胞に導入し、抗 Myc 抗体により免疫染色を行った。その結果、Stage2 および Stage3 の神経細胞において、Myc-singar1 と Myc-singar2 は同様に細胞に広く分布し、Stage3 の神経細胞では軸索や樹状突起の成長円錐に濃縮していた（図 8A,B）。このことから、Singar1 と Singar2 は同様の神経細胞内分布を示すと考えられ、抗 Singar 抗体による免疫染色で得られる局在の情報は Singar1 の細胞内局在を反映していると考えられた。そこで、Stage2、Stage3、Stage4 の神経細胞を抗 Singar 抗体と CMFDA で二重染色し Singar1 の神経細胞内の局在を解析した。CMFDA は細胞質を均一に染色し細胞各部位の厚みによる染色強度の差を補正することができる染色試薬である。抗 Singar 抗体で神経細胞を染色したところ、特異的な

染色が認められた。そして、抗 Singar 抗体と CMFDA の染色強度を定量的に解析した結果、Stage2 の神経細胞の 52% の Minor process の成長円錐 (n=120) に Singar の濃縮が認められた (図 9A)。Stage3 の神経細胞では 77% の軸索成長円錐 (n=56) および 52% の Minor process の成長円錐 (n=83) に Singar の濃縮が認められた (図 9B)。CMFDA の染色強度で補正した場合、抗 Singar 抗体の染色強度から予想される軸索成長円錐への Singar の濃縮の程度は細胞体に対し約 2.9 倍 (n=15)、Minor process の成長円錐では細胞体に対し約 2.3 倍 (n=15) であった。また、Stage4 の神経細胞では 31% の軸索成長円錐 (n=55) に濃縮が認められ、一方樹状突起の成長円錐部位への濃縮は認められなかった。Stage4 の神経細胞の軸索においては、Stage2 や Stage3 の細胞に比べ神経突起中央部の染色強度が細胞体に比べ増加していた (図 9C)。Singar1 と Singar2 が同様の細胞内局在が示すと考えられたことから、この結果、Singar1 が上記のような局在を示すことが示唆された。

成長円錐は Actin をはじめとする細胞骨格に富んだ領域である [36]。そこで、Singar1 の軸索成長円錐内の局在を F-Actin を染色する Phalloidin との共染色により比較した。その結果、Singar1 は軸索の成長円錐部において F-Actin が豊富な Filopodia に局在した (図 9D)。

5, Singar1 の過剰発現による過剰軸索形成の抑制

Singar1 の神経細胞の極性形成における分子機能を調べるため、Singar1 を過剰発現した神経細胞の表現型解析を行った。はじめに、軸索形成に対する Singar1 過剰発現の影響を調べるため、Myc-singar1 を過剰発現した神経細胞を、Stage2 から Stage3 への過渡期にあたる培養開始後 62 時間で固定し、抗 Myc 抗体で免疫染色し Singar1 を過剰発現した細胞の形態を可視化した。この神経細胞について、軸索を形成している細胞の割合、および軸索の長さを定量的に解析した。しかしながら、培養開始後 62 時間において、コントロールとして Myc-GST を Transfection した細胞と比較し、Myc-singar1 を過剰発現した神経細胞の軸索を形成した細胞の割合、および形成された軸索の長さに有意な差は認められなかった (図 10A)。同様に Myc-singar2 を過剰発現した神経細胞についてもコントロールと有意な差は認められなかった (図 10A)。

続いて、極性形成後の軸索や樹状突起の伸長での Singar1 の分子機能を調べるため、Myc-singar1 を過剰発現した Stage4 の神経細胞について、軸索と樹状突起の長さ、神経突起長の総計、樹状突起の本数を調べた。しかし、コントロールとして Myc-GST を Transfection した細胞と比較し、Myc-singar1 を過剰発現した神経細胞の軸索と樹状突起の長さ、神経突起長の総計、樹状突起の本数に有意な差は認められなかった (図 10B,C)。同様に Myc-singar2 を過剰発現

した神経細胞についてもコントロールと有意な差は認められなかった (図 10B,C)。このことから、**Singar1** および **Singar2** の過剰発現は、正常な極性形成や神経突起伸長に影響を与えないことが示唆された。

我々は、これまでに極性形成に関わる分子として **Shootin1** を同定している [13]。**Shootin1** の過剰発現は、神経細胞に過剰軸索の形成を誘導することから、軸索形成を促進する分子であることが示唆されている [13]。次に、**Singar1** の神経極性形成における機能解析として、**Shootin1** が誘導する過剰軸索の形成に対する効果を解析した。**Shootin1** と **Singar1**、**Shootin1** と **GST** を共発現させた神経細胞を培養 6 日目に固定し、過剰軸索を形成する細胞の割合を評価した。その結果、**Singar1** を共発現させた神経細胞では、**Shootin1** による過剰軸索の形成が有意に抑制された (図 11A,B, **Shootin1+GST**:27%, **Shootin1+Singar1**:16%, $p<0.01$)。また、**Singar1** を共発現した際の **Shootin1** の発現量は、**GST** を共発現した時と比べ差は認められなかった (図 11C)。このことから、**Shootin1** の過剰軸索形成に対する **Singar1** の抑制効果は、**Shootin1** の発現量の低下ではなく、**Singar1** の分子機能によるものであることが示唆された。さらに、**Singar2** には **Singar1** のような、**Shootin1** の過剰軸索形成に対する抑制効果は認められなかった (図 11A,B, **Shootin1+Singar2**:26%)。このことから、**Shootin1** が誘導する過剰軸索形成に対して、**Singar1** が特異的に抑制することが示唆された。

6, **Singar** の発現抑制による過剰軸索形成の誘導

神経極性形成における **Singar** のさらなる機能解析として、**RNAi** 法による **Singar** の発現抑制時の神経細胞の表現型解析を行った。解析に先立ち、神経細胞に **Singar** に対する **siRNA** を導入し、内在的に発現している **Singar** の発現量を調べた。**siRNA** またはコントロール **RNA** (**scRNA**) を **Transfection** した神経細胞からタンパク質を抽出し、抗 **Singar** 抗体による **Immunoblot** を行った。その結果、**scRNA** を導入した神経細胞に対し、**siRNA** を導入した神経細胞では、**Singar1** については約 50%、**Singar2** について約 30%まで発現量が低下した (図 12A, $p<0.01$)。また、**siRNA** と **GFP** を導入した神経細胞について、抗 **Singar** 抗体による免疫染色を行った結果、**GFP** 陽性の細胞の抗 **Singar** 抗体による染色強度が周囲の細胞と比較し低下していた (図 12B)。さらに、**scRNA** と **GFP** を **Transfection** した神経細胞の免疫染色強度と比較した結果、**siRNA** の導入により約 40%程度まで抗 **Singar** 抗体の染色強度が低下した (図 12C, $p<0.01$)。このことから作成した **siRNA** は内在的に発現する **Singar1** および **Singar2** に対し発現抑制効果を示すことが示唆された。

続いて、海馬より回収した神経細胞に **siRNA** と **GFP**、または **scRNA** と **GFP**

を **Transfection** し、6 日間培養を行った。その後、神経細胞を固定し、**GFP** 陽性の細胞について形態の解析を行った。その結果、**siRNA** を導入した神経細胞について、約 15% の細胞に複数の軸索様神経突起の形成が認められた (図 13A,B,C, 図 14A, $p < 0.01$)。これらの神経突起は、軸索マーカーである抗非リン酸化型 **Tau** 抗体 (**Tau-1**) (図 13A) およびプレシナプスのマーカーである抗 **Synaptophysin** 抗体 (図 13B) に陽性であり、一方、樹状突起/細胞体マーカーである抗 **MAP2** 抗体に陰性であった (図 13C)。また、コントロールの **scRNA** を導入した神経細胞について、約 6% の細胞にのみ過剰軸索の形成が認められた。このことから **Singar** の発現抑制により過剰軸索の形成を誘導することが示唆された。

Singar の発現抑制が神経細胞の形態に与える影響についてさらに詳細な解析を行うため、過剰軸索を形成した神経細胞の形態について定量的な評価を行った。その結果、複数形成された軸索様神経突起は樹状突起に比べ十分に長く、神経突起の長さの総計が過剰軸索を形成した神経細胞において増加していた (図 14A, B, C, $p < 0.05$)。しかしながら、各細胞が形成する神経突起の総数についてはコントロールの **scRNA** を導入したものと比較し有意な差は認められなかった (図 14D)。このことから、**Singar** の発現抑制により誘導される過剰軸索は、軸索様神経突起が付加的に形成されるのではなく、存在する複数の神経突起が軸索へと変換され伸長することで形成されることが示唆された。

さらに、**Shootin1** が誘導する過剰軸索の形成に対する **Singar** 発現抑制の影響を解析した。**scRNA** または **siRNA** を **Shootin1** と共に神経細胞に導入し、前の実験と同様に培養 6 日目で固定し、抗 **Shootin** 抗体で強く染色される細胞の形態を評価した。その結果、**siRNA** を導入した神経細胞において、**Shootin1** による過剰軸索の形成が促進された (図 15, $p < 0.01$)。この結果、**Singar** の発現抑制により誘導される過剰軸索は **Shootin1** の機能に依存しており、**Singar** は **Shootin1** の関与する軸索形成促進の分子機構に対し抑制的に機能することが示唆された。

7, **Singar** の発現抑制による極性形成後の神経細胞からの過剰軸索形成

極性形成後の神経細胞において、**GSK3 β** の阻害剤の添加により過剰軸索が形成されることが報告されている [15]。このことは、一度形成された極性は安定ではなく、樹状突起が軸索へと変換されうる可能性を示唆している。そこで、極性形成後の神経細胞において **Singar** の発現抑制を行い、細胞の表現型を解析した。**Stage3** への移行が終了し既に極性を形成していると考えられる培養 3 日目の神経細胞に、**siRNA** または **scRNA** を **GFP** と共に **Transfection** し、さらに 3 日間培養を行った。その後、細胞を固定し、**GFP** 陽性の細胞について形態を

解析した。その結果、siRNAを導入した神経細胞の約20%において複数の軸索様神経突起が認められた(図16A, B, $p < 0.01$)。これらの神経突起は軸索マーカーであるTau-1抗体に陽性であった(図16A)。一方、scRNAを導入した神経細胞において過剰軸索を形成している細胞は約6%のみであった。このことから、Singarは一度極性を形成した神経細胞において、樹状突起が軸索に転換することを抑制し神経極性を安定化する機能を有していることが示唆された。

8, Singar1の神経極性における分子作用機構の解析

これまでの解析から、Singar1はShootin1の過剰軸索の形成を抑制し(図11)、一方Singarの発現抑制はShootin1の過剰軸索の形成を促進した(図15)。このことからSingar1がShootin1と相互作用しShootin1の機能を抑制するのではないかと考え、免疫沈降法による細胞内の相互作用を検討したが、共沈降は認められなかった(Data not shown)。そこで次にShootin1の下流因子とSingar1の関係を調べた。Shootin1の誘導する過剰軸索形成は、PI 3-kinase阻害剤であるLY294002により抑制されることから、Shootin1はPI 3-kinaseの上流で機能することが示唆されている[13]。また、Shootin1は神経細胞内においてPI 3-kinaseと複合体を形成しており、PI 3-kinaseの局在を制御している可能性が示唆されている[13]。またPI 3-kinaseは軸索形成において極めて重要な機能を担っていると考えられていることから[7][9][10]、Singar1とPI 3-kinaseの相互作用について検討した。PI 3-kinaseは活性を持つ触媒サブユニットp110と調節サブユニットp85のヘテロダイマーとして存在する[37]。そこで、Singar1とPI 3-kinase p110およびp85との相互作用について免疫沈降法により検討した。HEK293T細胞にFLAG-singar1とMyc-p110、またはFLAG-singar1とMyc-p85を共発現し、細胞抽出液から抗FLAG抗体による免疫沈降を行った。その結果、沈降したFLAG-singar1と共にMyc-p110およびMyc-p85の共沈降が認められた(図17A左, B左)。また、FLAG-p110とMyc-singar1、FLAG-p85とMyc-singar1とHEK293T細胞に共発現し、同様に抗FLAG抗体で免疫沈降を行った結果、沈降したFLAG-p110またはFLAG-p85と共にMyc-singar1の共沈降が認められた(図17A右, B右)。このことから、Singar1はPI 3-kinaseとHEK293T細胞内において相互作用することが示唆された。

続いて、PI 3-kinaseとSingarの神経極性形成における機能的な関連性を調べるため、Singarの発現抑制により誘導される過剰軸索の形成に対するPI 3-kinase阻害剤の効果を解析した。siRNAによりSingarの発現抑制を行った神経細胞をPI 3-kinase阻害剤LY294002で5日間処理し、過剰軸索形成に対する影響を調べた。その結果、LY294002を添加した神経細胞では、Singarの

発現抑制による過剰軸索の形成が有意に抑制された (図 18A, $p < 0.01$)。これより、**Singar** の発現抑制により誘導される過剰軸索の形成が PI 3-kinase の活性に依存することが示唆された。

恒常活性化型 PI 3-kinase (p110-CA) の過剰発現は、Shootin1 と同様に神経細胞に過剰軸索の形成を誘導することが知られている [10] [13]。PI 3-kinase と **Singar1** の神経極性形成における機能的関連性を更に調べるため、p110-CA の過剰発現により誘導される過剰軸索形成に対する **singar** の発現抑制の影響を解析した。その結果、p110-CA と scRNA または siRNA を Transfection した神経細胞において過剰軸索の形成に有意な差は認められなかった (図 18B)。

考察

新規分子 Singar の同定

我々は神経細胞の極性形成とその維持に重要な機能を担う分子群の探索として、軸索と樹状突起・細胞体に特異的に濃縮するタンパク質、および極成形性に伴い発現量が変動するタンパク質のプロテオーム解析を行った。本研究において、私は軸索に濃縮し極性形成に伴い発現量が上昇するタンパク質スポットの一つについて質量分析法による同定を行い、機能未知の新規分子 Singar1 を同定した。発現解析の結果、Singar1 は、N 末端に 18 アミノ酸の挿入を持つ Splicing variant である Sinar2 と共に脳特異的に発現していること、また λ Phosphatase 及び Calyculin A を用いた解析から、Singar1 は生体内においてリン酸化修飾を受けていることが示唆された。二次元電気泳動ゲルを用いて抗 Singar 抗体による Immunoblot を行ったところ、横方向にシフトしたタンパク質スポットが複数検出された。このような横方向へのスポットのシフトは、リン酸化修飾を受けたタンパク質が二次元電気泳動ゲル上で示す特徴的なパターンである。また、抗 Singar 抗体で認識されたスポットは非常に多く、Singar1 が複雑な翻訳後修飾を受けている可能性が考えられる。同定したタンパク質スポットは、一次元ゲル上の非リン酸化型 Singar1 と同じ移動度を示したが、二次元電気泳動ゲルでの Immunoblot の結果とディファレンシャル解析の結果を比較したところ、質量分析により同定したスポットは酸性側にシフトしたスポットの一つであった。このことから同定したタンパク質スポットがリン酸化修飾を受けた Singar1 であるかもしれない。このことについては今後 $[^{32}\text{P}]$ を用いて標識した神経細胞のタンパク質を用いて二次元電気泳動を行い、同定したタンパク質スポットがリン酸化修飾を受けたものであるのかを検討する必要があると考えている。

Singar1 は軸索に濃縮する分子の一つとして検出、同定された。免疫染色法による局在解析の結果、Stage3 (培養 62 時間) の神経細胞において Singar1 は軸索の成長円錐に濃縮しているが、樹状突起の成長円錐への濃縮や細胞体における局在も同様に認められた。しかし、Stage4 (培養 7 日) になると、Singar は細胞に広く存在するものの、樹状突起の成長円錐への濃縮はあまり認められず、軸索において成長円錐や突起シャフトに多く局在した。Stage3 と Stage4 の海馬神経細胞における Singar の発現を比較すると、リン酸化型 Singar1 のバンドの強度が Stage4 に移行するに従って増加し、Singar1 および Singar2 のバンドの強度に違いは認められなかった。この結果から、Stage4 の神経細胞内では Stage3 の神経細胞と比べて、リン酸化型 Singar1 の Singar 全体に対する存在比が増加していることが考えられる。そしてこのことから、Stage3 と Stage4

の神経細胞の Singar の染色パターンの違いはリン酸化型 Singar1 の存在量比が増加したことに関係がある可能性が考えられる。本研究の中では、Singar1 のリン酸化部位を特異的に認識する抗リン酸化特異抗体を作成するには至っていないため、Singar1 のリン酸化と細胞内局在の関係について断定することはできない。しかし、軸索に濃縮するタンパク質の探索において同定した Singar1 のタンパク質スポットがリン酸化を受けた Singar1 のものである可能性が考えられる。現在 Singar1 のリン酸化部位とリン酸化酵素の一部を同定しつつあるため、Singar1 のリン酸化部位の変異体を作成し、これらの細胞内局在を野生型 Singar1 の局在等を免疫染色や細胞内タンパク質の分画などの手法で解析することを考えている。そして、Singar1 のリン酸化部位に対する抗リン酸化特異抗体を作成し、この抗体を用いて免疫染色を行うことで、Singar1 のリン酸化修飾と Singar1 の細胞内局在の関係を今後の解析の中で明らかにしていきたいと考えている。

Shootin1 が誘導する過剰軸索形成に対する Singar1 の特異的な抑制効果

Singar の神経極性形成における分子機能解析として、Singar を過剰発現した神経細胞の表現型解析を行った。その結果、Singar1 および Singar2 を単独で過剰発現した神経細胞では、軸索の形成や伸長に対し顕著な影響は認められなかった。しかしながら、Shootin1 が誘導する過剰軸索の形成が、Singar1 の共発現によって一部抑制された。興味深いことに、Singar1 の Splicing variant である Singar2 には Shootin1 が誘導する過剰軸索形成に対する抑制効果は認められなかった。この Singar1 と Singar2 の機能的差異の理由について詳細なことは分かっていない。Singar2 には Singar1 の N 末端に 18 アミノ酸の挿入が存在する。この 18 アミノ酸の配列には少し特徴があり、18 アミノ酸の中で 7 残基が酸性アミノ酸である。これに対し、塩基性アミノ酸は 1 つしか含まれない。このことからこの 18 アミノ酸の配列は全体として負電荷を帯びていることが考えられる。そして、この 18 アミノ酸の挿入は RUN ドメインの約 35 残基上流に存在するが、Singar の RUN ドメインの結晶構造解析から RUN ドメイン N 末端の約 30 アミノ酸の配列が RUN ドメインの構造の安定性に関与することが示唆されている [38]。このことから、この 18 アミノ酸の挿入によって Singar1 と Singar2 の RUN ドメインの構造に違いが生じている可能性があるかもしれない。RUN ドメインはタンパク質間相互作用に関わるドメインであることが予想されていることから [29]、Singar1 と Singar2 の間でタンパク質間相互作用に差が生じているのかもしれない。これを調べるためには、2 つのタンパク質の RUN ドメインの結晶構造解析などを行い、18 アミノ酸の挿入の構造に対する影響を解析する必要がある。

Singar1 と Singar2 の機能的な違いを生み出す別の可能性として、翻訳後修飾が関係しているのかもしれない。Singar1 は一次元 SDS-PAGE においてダブレットのバンドとして検出されたが、Singar2 にはそのような傾向は認められなかった。このことから Singar1 と Singar2 で翻訳後修飾の量に違いが生じているのかもしれない。しかし、Singar2 が Singar1 の全アミノ酸配列を含むことから、Singar2 にも Singar1 の持つ翻訳後修飾されるアミノ酸残基は存在する。そして Singar1 が二次元電気泳動ゲルでは複数のスポットとして検出され複数の翻訳後修飾を受けている可能性があるが、一次元ゲルで検出されるバンドは 2 本である。このことから、おそらく 2 本のバンドの両方に翻訳後修飾を受けた Singar1 が含まれている可能性も考えられる。そして、シングルバンドとして検出される Singar2 にも翻訳後修飾を受けたものが含まれることも考えられる。しかし、同じように翻訳後修飾を受けた場合にも、Singar2 の N 末端に存在する負電荷に富むアミノ酸配列の影響で、Singar1 と Singar2 の間に翻訳後修飾によるタンパク質の構造変化にも違いが生じてくる可能性も考えられる。このことを解析するためには、Singar1 と Singar2 のリン酸化をはじめとする翻訳後修飾部位の同定とその領域を含む構造の違いを解析し比較する必要がある。そして、翻訳後修飾に依存して相互作用が変化する分子の探索と同定を行い、その分子と Singar1 の神経極性形成における機能的な関連性を解析することで、Shootin1 の誘導する過剰軸索形成に対する Singar1 と Singar2 の抑制効果の差を考察する材料になるのではないかと考えている。本研究の中で Singar1 を発現した HEK293T 細胞を CalyculinA で処理することで Singar1 のリン酸化が昂進する可能性が考えられた。リン酸化修飾に依存した相互作用分子は、Singar1 を発現させた HEK293T 細胞を CalyculinA で処理し Singar1 を免疫沈降法などにより Singar1 を回収し、共沈降するタンパク質を CalyculinA で処理しない細胞からの免疫沈降物と比較することで探索できるのではないかと考えている。

Singar1 は Shootin1 の誘導する過剰軸索形成について抑制効果を示したが、一方 Singar1 単独の過剰発現では軸索形成や伸長に顕著な影響はみとめられなかった。なぜ Singar1 が Shootin1 の誘導する過剰軸索形成を抑制し、正常な軸索形成には影響をあたえなかったのか、この理由については全く分かっていない。当初、Singar1 と Shootin1 が相互作用し Singar1 が Shootin1 の機能に影響を与えるのではないかと考え、Singar1 と Shootin1 の相互作用を免疫沈降法により解析したが相互作用は認められなかった (未発表データ)。このことから、Singar1 は過剰発現された Shootin1 に対して相互作用することで過剰軸索の形成を抑制しているのではないと考えられる。Shootin1 は本来軸索先端の成長円錐に強く局在することが報告されている。そして Shootin1 を過剰発現すると軸

索以外の神経突起にも局在するようになり、この **Shootin1** の異所的な局在が過剰軸索を形成するのではないかと考えられている [13]。この際に、**Shootin1** の異所的な局在化によって、**KIF3**、**Par3**、リン酸化 **Akt** といった他の軸索に局在する分子も軸索以外の神経突起にリクルートされると考えられている [13]。これらの分子の局在変化に **Singar1** が関係しているのかもしれない。また、通常の極性形成における軸索形成シグナルと、**Shootin1** がリクルートした分子による異所的な軸索形成シグナルとになんらかの違いがあるのかもしれない。この2つのシグナルの差を見つけることが **Singar1** の **Shootin1** が誘導する過剰軸索形成に対する抑制の作用メカニズムの理解につながるのではないかと考えている。過剰発現した **Shootin1** がどのような分子を複数の神経突起にリクルートするかは分からないが、通常の軸索形成に関わる分子と **Shootin1** がリクルートする分子に違いがあれば、その差が通常の軸索形成と過剰の軸索形成に対し **Singar1** の過剰発現が与える影響の違いの要因の一つとなっているのかもしれない。

新規分子 **Singar** の発現抑制による過剰軸索の誘導

極性形成期における **Singar** の発現抑制により、神経細胞に過剰軸索の形成が認められたことから、**Singar** が過剰軸索の形成を抑制している可能性が考えられた。さらに極性形成後の海馬神経細胞においても、**Singar** の発現抑制により過剰軸索の形成が認められたことから、**Singar** が過剰軸索形成に対し抑制的に機能するだけでなく、一度形成された神経極性を安定化する機能を有している可能性が考えられた。解析の中で、私は神経細胞に発現している **Singar1** と **Singar2** の2つの **Splicing variant** を同定したが、本研究で用いた **siRNA** は **Singar1**、**Singar2** に共通の塩基配列をターゲットとしており、**Singar1** および **Singar2** の両方の発現を抑制した。どちらの分子の発現抑制が過剰軸索の形成に関与するのかを調べるため、**Singar1** または **Singar2** を選択的に発現抑制する **siRNA** の作成を試みたが、それぞれに対し特異的に発現抑制効果を示す **siRNA** を作成することができなかった（未発表データ）。そのため、現段階ではどちらの分子の発現抑制が表現型に寄与しているかを確認できていない。しかし、過剰発現における **Shootin1** 依存的な過剰軸索形成に対して、**Singar1** の過剰発現により特異的に抑制効果が認められたことから、現在は **Singar1** の発現抑制が過剰軸索形成の誘導により影響を与えていたのではないかと考えている。今後、**siRNA** に耐性を持つ **Singar1**、**Singar2** 変異体を作成し、内在性 **Singar** の発現を抑制した細胞への **Rescue assay** 行うことで詳細な解析を行う予定である。

極性形成後の神経細胞において、**Singar** の発現抑制でも過剰軸索の形成が認められた。このことから、**Singar** は極性形成後の神経細胞の極性の維持にも関

与しているかもしれない。これまでに、**In vitro** では一度極性が形成された神経細胞でも、軸索を短く切断すると別の神経突起が軸索として伸長することが知られている [39]。そして、**GSK3 β** の阻害剤の添加によって一度極性が形成された神経細胞に新たな軸索の形成が認められることが報告されている [15]。このことから神経極性は一度形成された後も安定なものではなく可逆的なものであり、極性形成後の神経細胞からも再度軸索が形成される可能性が考えられる。しかしながら、**In vivo** では軸索の再生は通常起きにくいと考えられており、脊髄損傷で一度切断された軸索を元に戻す治療法の開発に多くの研究者が挑んでいる。この **In vivo** での軸索再生の治療法と現在の研究がつながるかは分からないが、**Singar** の発現抑制によって新たに軸索が形成される分子メカニズムを理解することで、軸索に損傷を受けた神経細胞から軸索を再生する医学的な治療法につながることを期待している。

相互作用分子としての **PI 3-kinase** の同定と機能的関連性について

PI 3-kinase は Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (**PIP2**) の D-3 位をリン酸化し、Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (**PIP3**)を産生する Lipid kinase である [40]。**PI 3-kinase** は、細胞の分化や増殖、生存など多くの生命現象に関わることが知られており [41]、神経突起の形成と伸長のシグナル伝達においては極めて上流に位置する分子と考えられている [7]。また、**Shootin1** の過剰軸索の形成が **PI3-kinase** の阻害剤により抑制されることが報告されている。本研究において、**Shootin1** の形成する過剰軸索の形成に **Singar1** が抑制効果を示す可能性が考えられたことから、**Shootin1** の下流に存在すると考えられる **PI 3-kinase** との相互作用について解析を行った。その結果、**HEK293T** 細胞内において過剰発現した **Singar1** と **PI 3-kinase** が相互作用することが示唆された。また、**Singar** の発現抑制による過剰軸索形成が **PI 3-kinase** 阻害剤により抑制されたことから、**Singar** の発現抑制により誘導される過剰軸索形成は **PI 3-kinase** の活性に依存する可能性が考えられた。しかし、**Shootin1** が誘導する過剰軸索形成と異なり、恒常活性型 **PI 3-kinase** が誘導する過剰軸索形成は **Singar** の発現抑制では促進されなかった。このことから、**PI 3-kinase** の上流で **Singar** が機能している可能性が考えられた。しかし、本当に **Singar1** が **PI 3-kinase** の上流で機能しているかは現段階では不明である。当初、**Singar** が **PI 3-kinase** の活性を制御することが考えられたため、**Singar** の過剰発現や発現抑制を行った神経細胞において、**PI 3-kinase** の下流因子の **Akt** のリン酸化状態を調べたが、**PI 3-kinase** の活性の変化を示す **Akt** のリン酸化量の変化は認められなかった (未発表データ)。そのため **Singar1** が **PI 3-kinase** の上流の分子として機能しているかは分からない。また、精製タンパク質を用いた結合解析に

において、Singar1 と PI 3-kinase の直接の相互作用は認められなかった（未発表データ）。このことから、おそらく Singar1 は直接 PI 3-kinase と相互作用し酵素活性を制御するのではないと現在は考えている。むしろ、他の分子を介して PI 3-kinase と複合体を形成しており、他の分子の機能制御を通じて PI 3-kinase をはじめとする神経極性のシグナル伝達機構に影響を与えているのかもしれない。現在、PI 3-kinase が関与するシグナル伝達機構の中での Singar1 の機能は全く不明である。神経極性形成において、PI 3-kinase が産生する PIP3 の下流エフェクターは Akt 以外にも存在することが知られているため [14]、今後は Singar1 と PI 3-kinase の関係性を解析する上で Akt 以外の下流エフェクターに対する影響も調べる必要があると考えている。

新規分子 Singar による新しい神経極性安定化の可能性

Singar のように機能阻害により過剰軸索を誘導する分子として、GSK3 β [15]、PTEN [15]、MARK2 [16]、Smurf2 [19] などが報告されている。これらの分子は将来軸索へと分化するもの以外の Minor process において、PI 3-kinase をはじめとする神経突起伸長を促進する因子を抑制し、単一の軸索の形成に寄与していると考えられている。しかし、これらの分子の過剰発現は、正常な神経細胞の軸索の形成や伸長をも抑制してしまう。一方、Shootin1 の誘導する過剰軸索形成に対し抑制効果が認められた Singar1 の過剰発現では、正常に極性を形成した神経細胞に対しては軸索形成を抑制する影響は認められなかった。このことから Singar1 は GSK3 β や PTEN、MARK2、Smurf2 とは異なる分子機構で過剰軸索の形成を抑制しているのかもしれない。当然だが、Singar1 の過剰発現が正常な軸索の形成と伸長を抑制しないと断定できない。Singar1 はリン酸化修飾を受けていることが考えられるため、他の分子の制御を受けている可能性が考えられる。Singar1 の今後の解析の方向性として、相互作用分子の同定やリン酸化修飾部位とリン酸化酵素の同定を行い、Singar1 の機能制御機構を調べる必要があると考えている。

総括

これまで、神経極性の解析は、主に軸索形成過程の分子メカニズムにフォーカスを絞り行われてきた。しかしながら、最近の報告から神経極性形成には非常に多くの分子が細胞全体において協調的に機能することが、正常な極性を持った神経細胞の形態を作り出す上で必要不可欠であることが示唆されている。本研究における神経極性の形成と維持に関わる分子のプロテオーム解析の中で、私は新規タンパク質 Singar を同定し、その機能解析を通じて Singar が神経細胞において過剰軸索の形成を抑制し、神経極性を安定なものにするために重要

な機能を担っている可能性を示した。また、これまでも過剰軸索形成を抑制する分子は報告されていたが、それらの分子と異なり **Singar1** は神経突起伸長に影響を与えず、過剰軸索の形成のみを抑制するユニークな機能を有している可能性が考えられた。しかしながら、**Singar1** の制御機構や神経極性形成に対する分子作用機構も不明な点が多く残っている。今後の課題として **Singar** のリン酸化修飾に関わる **Kinase** や **Phosphatase** の同定、相互作用分子の探索を行い、神経細胞内における **Singar** の分子機能とその作用メカニズムに関する理解をより深めていく必要があると考えている。

謝辞

細胞内情報学講座の伊東広教授、稲垣直之准教授、水野憲一助教、多胡憲治助教、島田忠行特任助教に深く感謝申し上げます。特に稲垣准教授には、およそ5年間に渡り、実験技術や研究の進め方だけでなく、研究者としての基本姿勢や社会人としてのモラルも御指導いただきました。伊東教授には、研究を進める上で貴重なディスカッションをしていただき、また多くの励ましをいただきました。水野助教、多胡助教、島田特任助教には、研究に対する助言に加え、研究室における様々な環境を整えていただきました。特に島田特任助教には日々の実験を行う上で多くのサポートをいただきました。秘書の茂木久美子さんには、学生生活を送る上で様々なサポートをいただき感謝申し上げます。細胞内情報学講座の学生の皆様にも感謝申し上げます。特に、同期入学である鳥山道則博士、浦野大輔さん、中田飛鳥さん、西村明幸博士には非常に長い間お世話になりました。さらに勝田和広さん、野村英子さん、上田倫子さんをはじめ、当研究室の卒業生の方々にも非常にお世話になりこの場をお借りして感謝申し上げます。最後に、奈良先端科学技術大学院大学の職員の皆様、友人の皆様、そして私を支えてくださった両親に感謝申し上げます。

図の部

図1

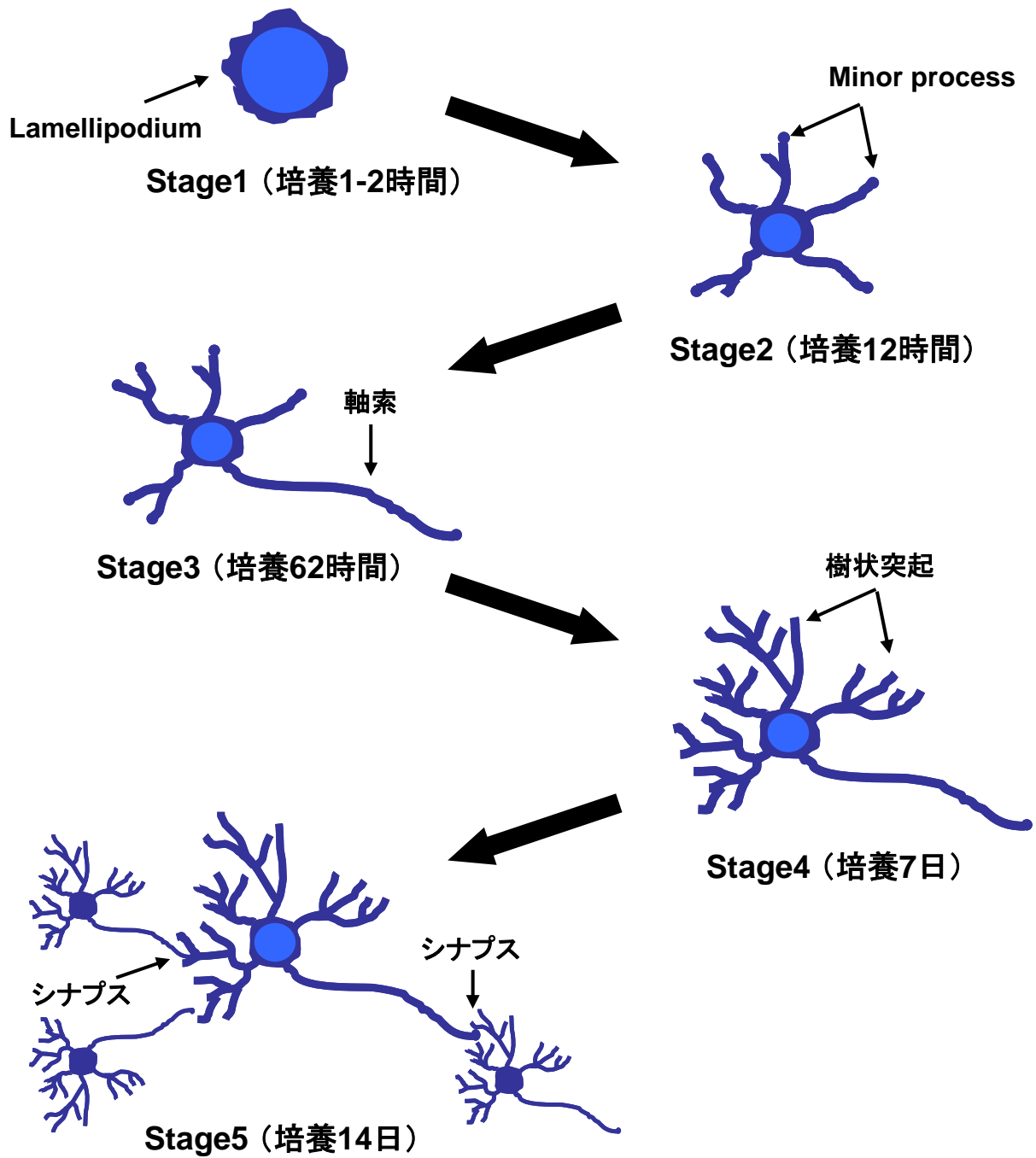


図1 神経細胞の形態形成の過程

神経細胞は最初Lamillipodiaを形成し(Stage1)、その後未分化なMinor processを形成する(Stage2)。しばらくするとMinor processの中の本が急速に伸長し軸索へと分化する(Stage3)。時間経過とともにMinor processは樹状突起へと分化し(Stage4)、他の神経細胞とシナプスを形成し成熟する(Stage5)。

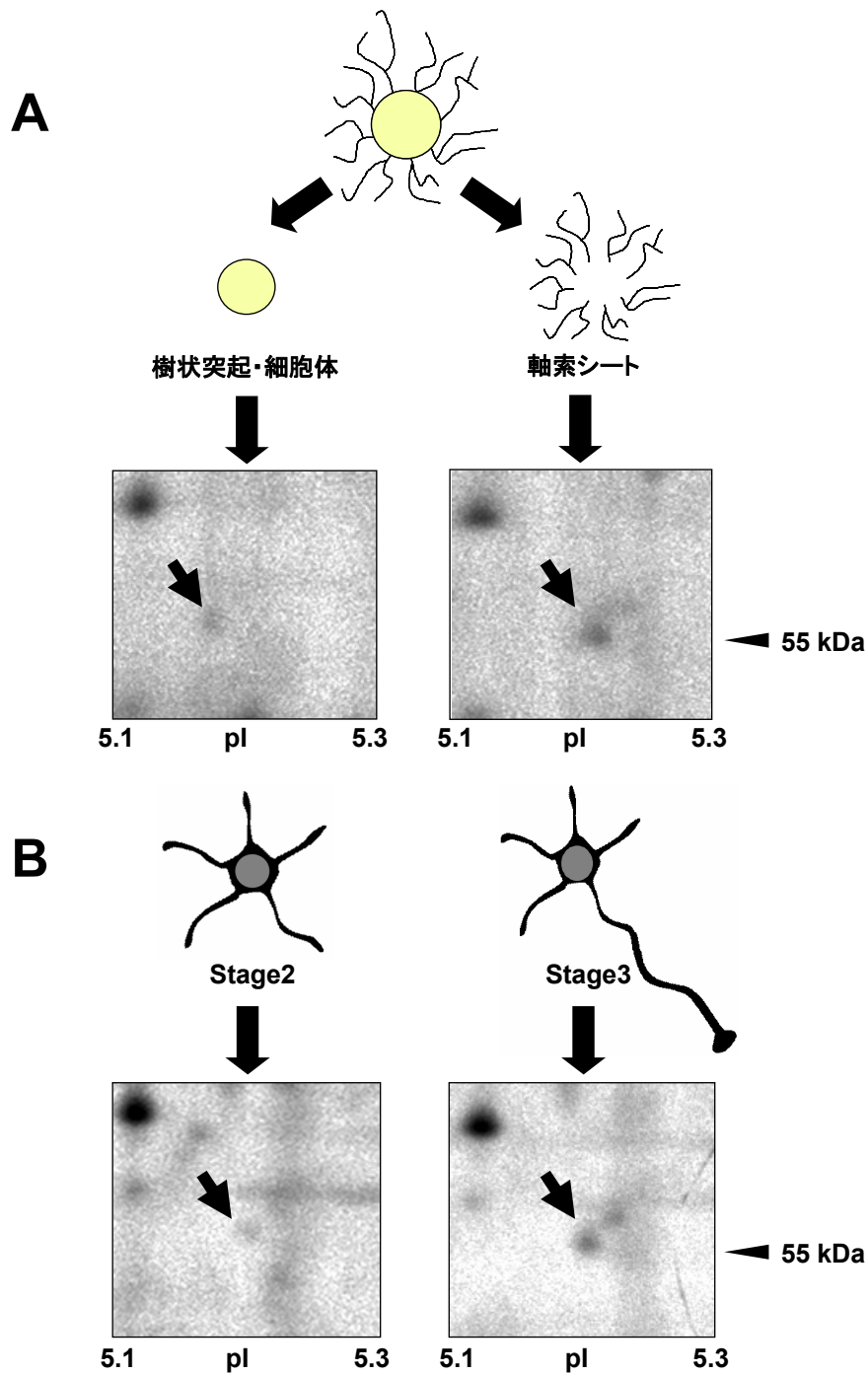


図2 極性形成関連タンパク質の探索を目的としたプロテオーム解析によるSingar1の検出

(A) 軸索 VS 樹状突起・細胞体のディファレンシャル解析でのSingar1の検出。分子量 55 kDa、pI 5.2に検出されたスポット(矢印)は軸索サンプル側で平均 2.7倍強く検出された(n=3, p<0.01)。

(B) Stage2 VS Stage3のディファレンシャル解析におけるSingar1の検出。分子量 55 kDa、pI 5.2に検出されたスポット(矢印)はStage3サンプル側で平均 2.3倍強く検出された(n=5, p<0.01)。

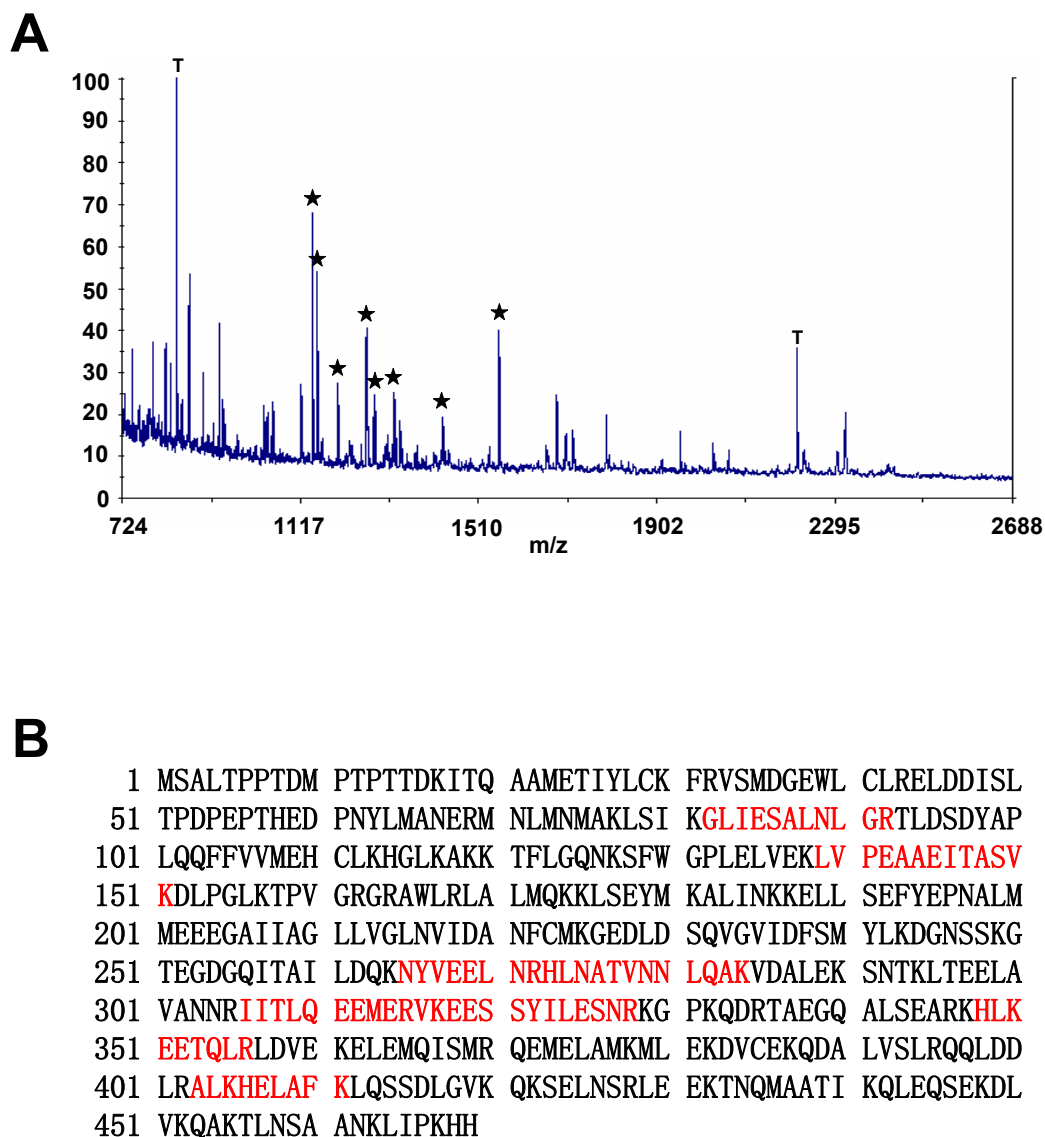


図3 質量分析法による新規分子Singar1の同定

(A) Singar1と同定されたスポットのMALDI-TOF MSによる測定スペクトル。Database検索においてSingar1由来とされたペプチドのピークを★で示す。(T:Trypsinの自己消化ペプチドのピーク)

(B) Database検索で同定されたHuman singar1 (KIAA0871)のアミノ酸配列。MALDI-TOF MSにより検出され、Database検索でヒットしたペプチド配列を赤字で示す。全体のSequenceに対するCoverageは18%であった。

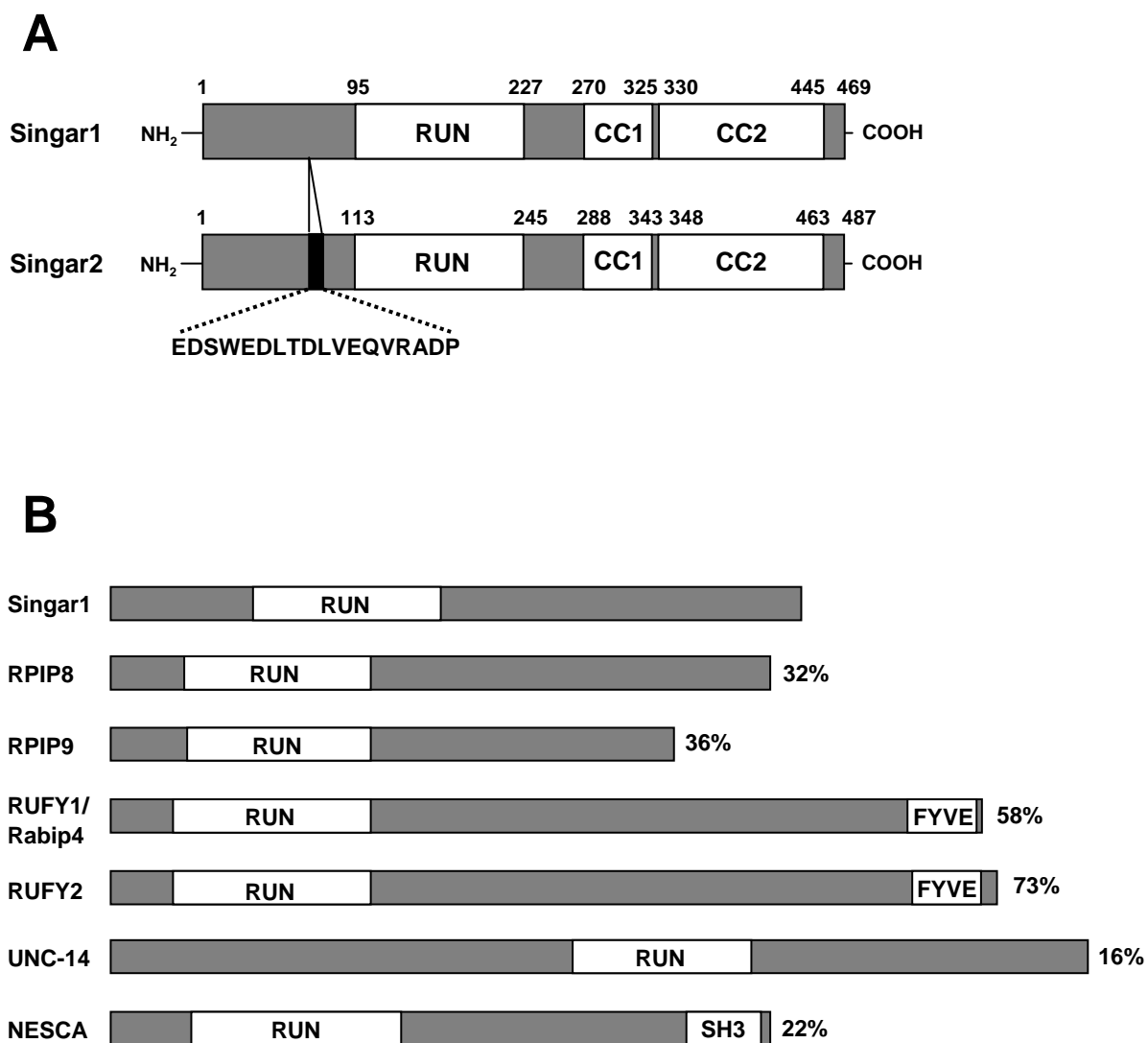


図4 Singar1とSingar2のドメイン構造

(A) Singar1とSingar2のドメイン構造。Singar1はN末端にRUNドメイン、C末端に2つのCoiled coilドメインを持つ。Singar2はSingar1のHis-58とGlu-59の間に18アミノ酸の挿入を持つ。

(B) Singar1と他のRUNドメインを有するタンパク質の比較。RUNドメインにおけるアミノ酸配列の相同性をパーセントで示す。

Human	Singar1	1:MSALTPPTDMPTPTTDDKITQAAMETIYLCKFRVSMGDGEWLCLELREDDISLTPDPEPTH--	58
Mouse	Singar1	1:MSALTPPTDMPTPTTDDKITQAAMETIYLCKFRVSMGDGEWLCLELREDDISLTPDPEPTH--	58
Mouse	Singar2	1:MSALTPPTDMPTPTTDDKITQAAMETIYLCKFRVSMGDGEWLCLELREDDISLTPDPEPTHE	60
Rat	Singar1	1:MSALTPPTDMPTPTTDDKITQAAMETIYLCKFRVSMGDGEWLCLELREDDISLTPDPEPTH--	58
Rat	Singar2	1:MSALTPPTDMPTPTTDDKITQAAMETIYLCKFRVSMGDGEWLCLELREDDISLTPDPEPTHE	60
Human	Singar1	59:-----EDPNYLMANERNMNMMAKLSIKGLIESALNLGRTLDSYAPLQ	102
Mouse	Singar1	59:-----EDPNYLMANERNMNMMAKLSIKGLIESALNLGRTLDSYAPLQ	102
Mouse	Singar2	61:SWEDLTDLVEQVRADPEDPNYLMANERNMNMMAKLSIKGLIESALNLGRTLDSYAPLQ	120
Rat	Singar1	59:-----EDPNYLMANERNMNMMAKLSIKGLIESALNLGRTLDSYAPLQ	102
Rat	Singar2	61:SWEDLTDLVEQVRADPEDPNYLMANERNMNMMAKLSIKGLIESALNLGRTLDSYAPLQ	120
Human	Singar1	103:QFFVVMHCLKHGLKAKKTFGLQNKSFWGPLELVEKLVPEAAEITASVKDLPGLKTPVGR	162
Mouse	Singar1	103:QFFVVMHCLKHGLKAKKTFGLQNKSFWGPLELVEKLVPEAAEITASVKDLPGLKTPVGR	162
Mouse	Singar2	121:QFFVVMHCLKHGLKAKKTFGLQNKSFWGPLELVEKLVPEAAEITASVKDLPGLKTPVGR	180
Rat	Singar1	103:QFFVVMHCLKHGLKAKKTFGLQNKSFWGPLELVEKLVPEAAEITASVKDLPGLKTPVGR	162
Rat	Singar2	121:QFFVVMHCLKHGLKAKKTFGLQNKSFWGPLELVEKLVPEAAEITASVKDLPGLKTPVGR	180
RUN			
Human	Singar1	163:GRAWLRLALMOKKLSEYMKALINKKELSEFYEPNALMMEEGAI IAGLLVGLNVIDANF	222
Mouse	Singar1	163:GRAWLRLALMOKKLSEYMKALINKKELSEFYEVNALMMEEGAI IAGLLVGLNVIDANF	222
Mouse	Singar2	181:GRAWLRLALMOKKLSEYMKALINKKELSEFYEVNALMMEEGAI IAGLLVGLNVIDANF	240
Rat	Singar1	163:GRAWLRLALMOKKLSEYMKALINKKELSEFYEANALMMEEGAI IAGLLVGLNVIDANF	222
Rat	Singar2	181:GRAWLRLALMOKKLSEYMKALINKKELSEFYEANALMMEEGAI IAGLLVGLNVIDANF	240
*			
Human	Singar1	223:CMKGEDLDSQVGVIDFSMYLKDGNSSKSGEGDQITAILDQKNYVEELNRHLNATVNNLQ	282
Mouse	Singar1	223:CMKGEDLDSQVGVIDFSMYLKDGNSSKSGEGDQITAILDQKNYVEELNRHLNATVNNLQ	282
Mouse	Singar2	241:CMKGEDLDSQVGVIDFSMYLKDGNSSKSGEGDQITAILDQKNYVEELNRHLNATVNNLQ	300
Rat	Singar1	223:CMKGEDLDSQVGVIDFSMYLKDGNSSKSGEGDQITAILDQKNYVEELNRHLNATVNNLQ	282
Rat	Singar2	241:CMKGEDLDSQVGVIDFSMYLKDGNSSKSGEGDQITAILDQKNYVEELNRHLNATVNNLQ	300
*			
Human	Singar1	283:AKVDALEKSNTKLTEELAVANNRIITLQEEMERVKEESSYLLESNRKGPQDRTAEGQAL	342
Mouse	Singar1	283:TKVDLLEKSNTKLTEELAVANNRIITLQEEMERVKEESSYLLESNRKGPQDRTAEGQAL	342
Mouse	Singar2	301:TKVDLLEKSNTKLTEELAVANNRIITLQEEMERVKEESSYLLESNRKGPQDRTAEGQAL	360
Rat	Singar1	283:AKVDALEKSNTKLTEELAVANNRIITLQEEMERVKEESSYLLESNRKGPQDRTAEGQAL	342
Rat	Singar2	301:AKVDALEKSNTKLTEELAVANNRIITLQEEMERVKEESSYLLESNRKGPQDRTAEGQAL	360
* * Coiled coil 1			
Human	Singar1	343:SEARKHLKEETQLRLDVEKELELQISMRQEMELAMKMLEKDVCEKQDALVSLRQQLDDLR	402
Mouse	Singar1	343:SEARKHLKEETQLRLDVEKELELQISMRQEMELAMKMLEKDVCEKQDALVSLRQQLDDLR	402
Mouse	Singar2	361:SEARKHLKEETQLRLDVEKELELQISMRQEMELAMKMLEKDVCEKQDALVSLRQQLDDLR	420
Rat	Singar1	343:SEARKHLKEETQLRLDVEKELELQISMRQEMELAMKMLEKDVCEKQDALVSLRQQLDDLR	402
Rat	Singar2	361:SEARKHLKEETQLRLDVEKELELQISMRQEMELAMKMLEKDVCEKQDALVSLRQQLDDLR	420
* Coiled coil 2			
Human	Singar1	403:ALKHELAFKLQSSDLGVKQKSELNSRLEEKTNQMAATIKQLEQSEKDLVKQAKTLNSAAN	462
Mouse	Singar1	403:ALKHELAFKLQSSDLGVKQKSELNSRLEEKTNQMAATIKQLEQSEKDLVKQAKTLNSAAN	462
Mouse	Singar2	421:ALKHELAFKLQSSDLGVKQKSELNSRLEEKTNQMAATIKQLEQSEKDLVKQAKTLNSAAN	480
Rat	Singar1	403:ALKHELAFKLQSSDLGVKQKSELNSRLEEKTNQMAATIKQLEQSEKDLVKQAKTLNSAAN	462
Rat	Singar2	421:ALKHELAFKLQSSDLGVKQKSELNSRLEEKTNQMAATIKQLEQSEKDLVKQAKTLNSAAN	480
Human	Singar1	463:KLIPKHH	469
Mouse	Singar1	463:KLIPKHH	469
Mouse	Singar2	481:KLIPKHH	487
Rat	Singar1	463:KLIPKHH	469
Rat	Singar2	481:KLIPKHH	487

図5 Human、Mouse、Rat 間のSingar1とSingar2のアミノ酸配列のアラインメント

赤枠はRUN ドメイン、青枠は2つのCoiled coilドメインを表す。*はHuman、Mouse、Rat間でSingarのアミノ酸配列が異なる箇所を示す。

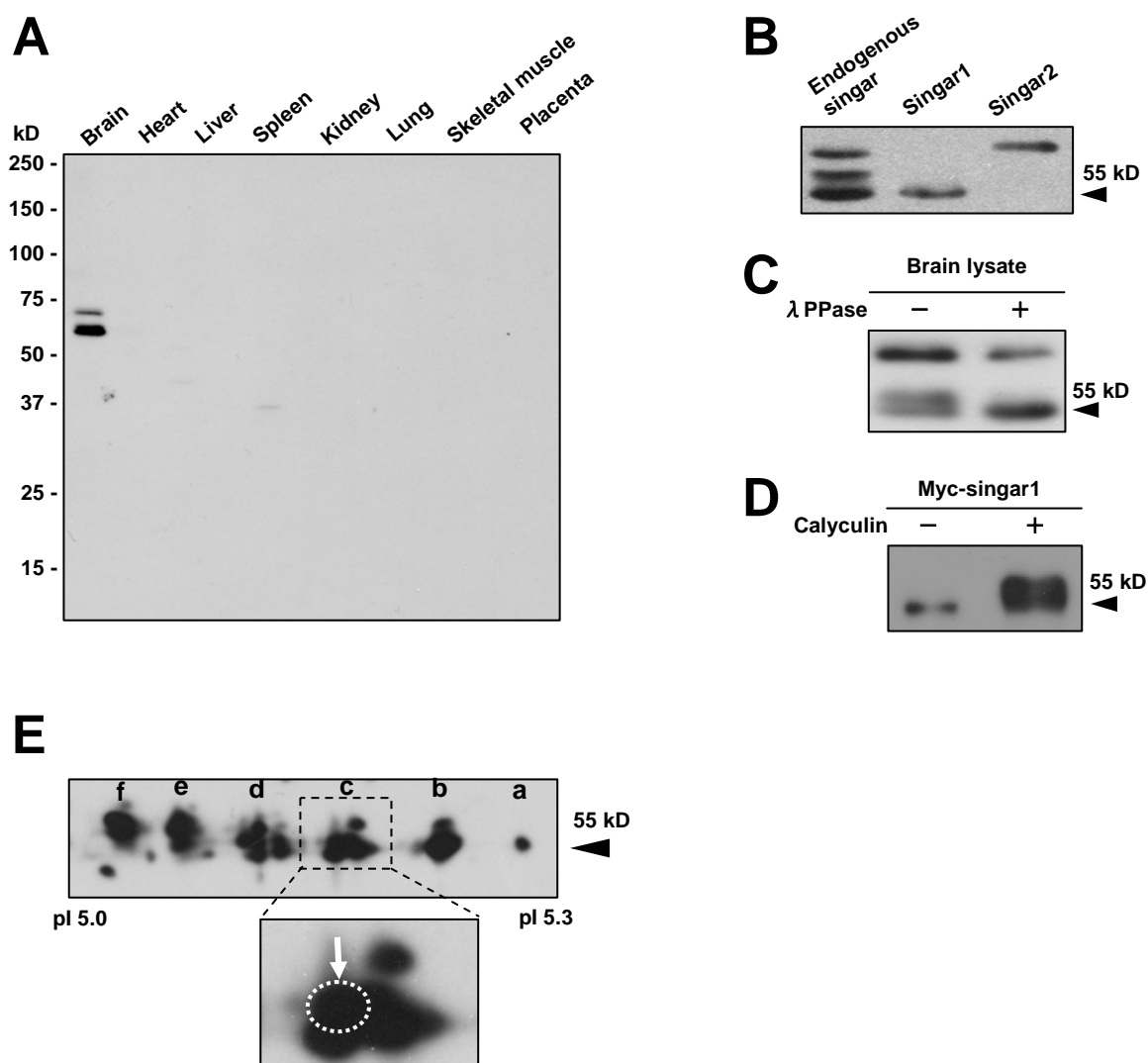


図6 Singarの発現解析

(A) 成体ラット各臓器抽出タンパク質の抗Singar抗体でのImmunoblot解析。

(B) 成体ラット脳、およびSingar1, Singar2を発現させたHEK293T細胞の抽出タンパク質のImmunoblot解析。

(C) P5ラット脳抽出タンパク質のλ Phosphatase処理サンプルのImmunoblot解析。P5ラット脳抽出タンパク質にλ Phosphatase (4unit/ul)添加後、室温で30分インキュベートしたものを抗Singar抗体でImmunoblotを行った。

(D) Phosphatase阻害剤によるSingar1のSDS-PAGEにおける移動度の変化。Myc-singar1を発現させたHEK293T細胞を、100 nM CalyculinAで処理し、抗Myc抗体によるImmunoblotを行った。

(E) 抗Singar抗体を用いた二次元電気泳動ゲルImmunoblotでのSingar1の泳動パターン。成体ラット脳タンパク質を二次元電気泳動法により展開し、抗Singar抗体でImmunoblotを行った。約55 kDa、pI 5.3付近から横方向にシフトした複数のスポット(大きく分けa-fまで6個)を検出した。右から3番目(c)は5つの細かいスポットに分かれており、ディファレンシャル解析で検出し質量分析で同定したスポットは白丸で囲んだスポットの位置に対応した。

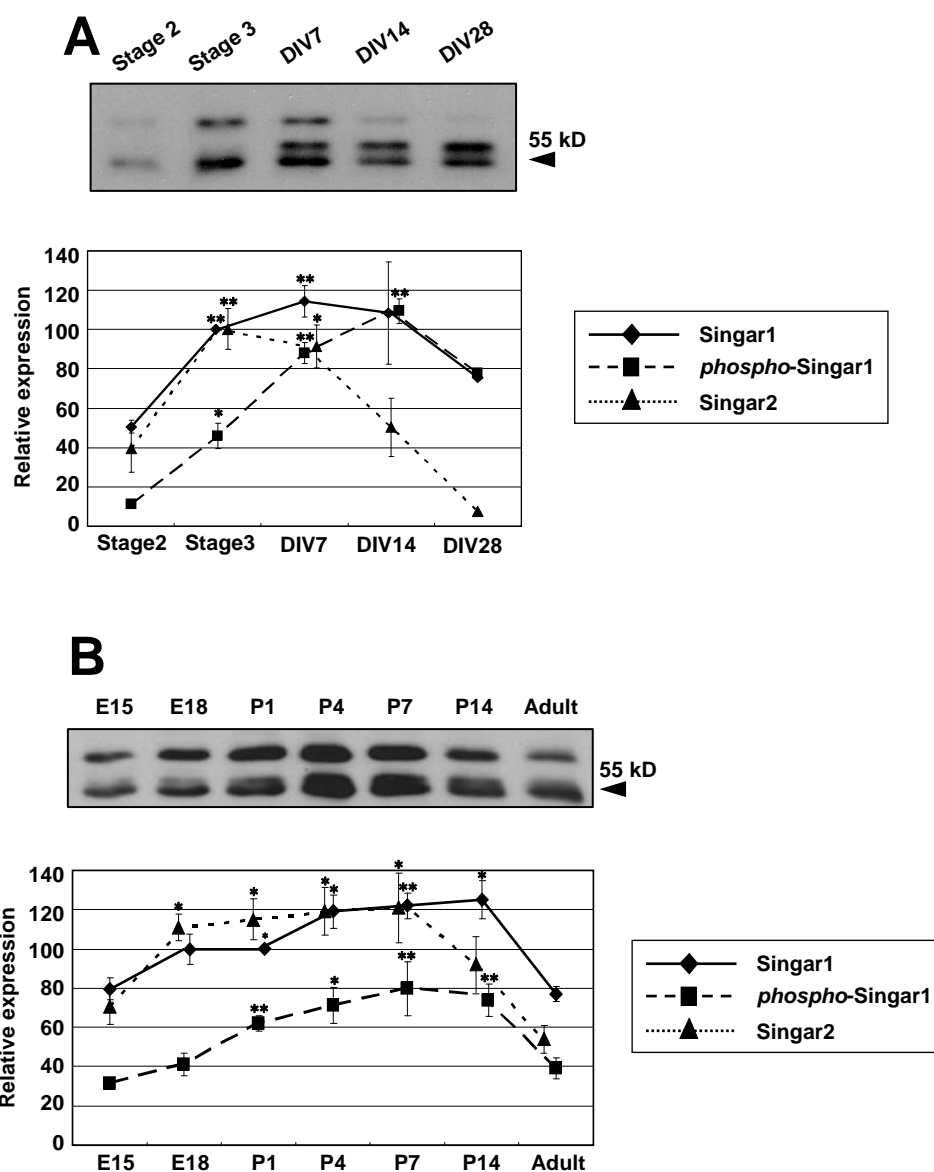


図7 培養海馬神経細胞およびラット脳における発生に伴ったSingarの発現量の推移

(A) 培養時間に伴った培養海馬神経細胞内におけるSingarの発現の推移。極性形成前(Stage2)、極性形成後(Stage3)、培養7日、培養14日、培養28日の培養海馬神経細胞から抽出したタンパク質(3 μg)について、抗Singar抗体によるWestern blotを行った。得られた結果について、各バンド強度を定量化し、Stage3サンプルのSingar1のバンド強度を100%としてグラフ化した。独立に回収した4サンプルについて解析を行った。(DIV28は2サンプル)。Error barは標準偏差を示す。(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)

(B) ラット脳における発生に伴うSingarの発現の推移。E15、E18、P1、P4、P7、P14、成体ラット脳から抽出したタンパク質(5 μg)について、抗Singar抗体によるWestern blotを行った。得られた結果について、各バンド強度を定量化し、P1サンプルのSingar1のバンド強度を100%としてグラフ化した。実験は独立に回収した4つのサンプルを用いて行った。Error barは標準偏差を示す。(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)

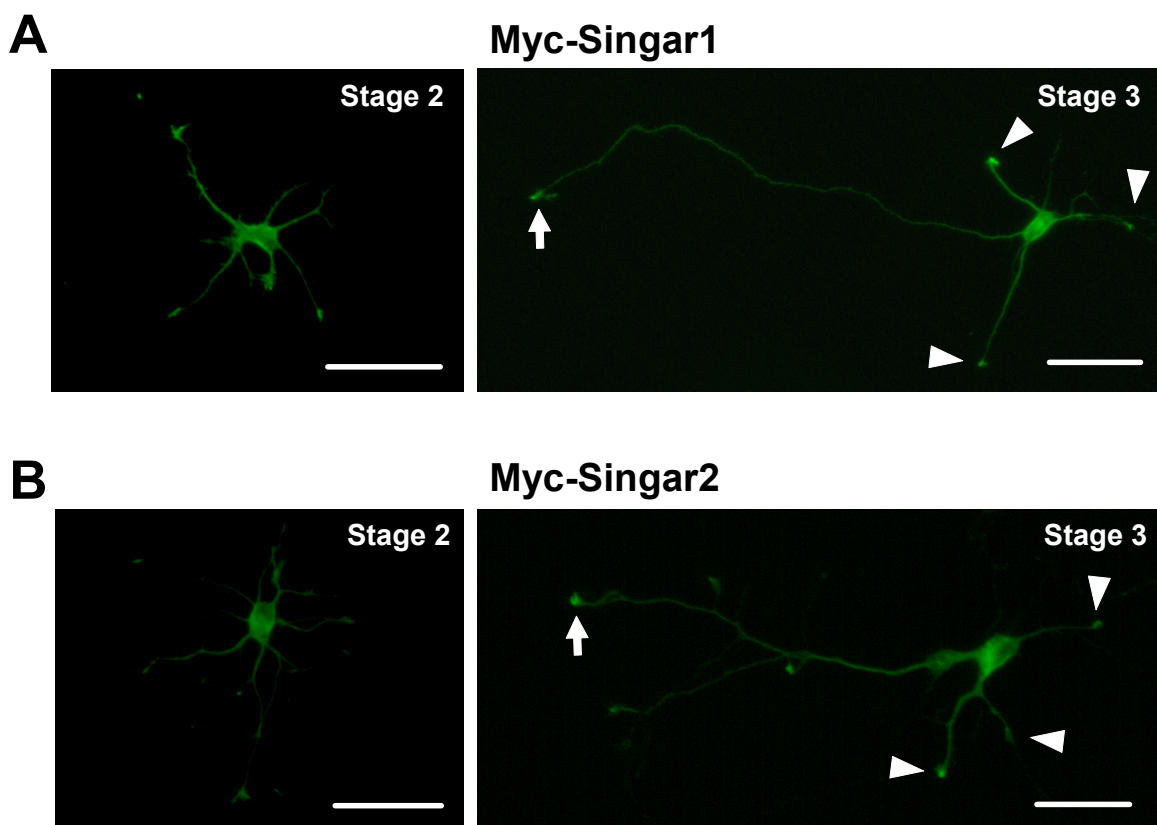


図8 Myc-singar1, Myc-singar2の神経細胞内局在 (Stage2, Stage3)

(A,B) Myc-singar1 (A) およびMyc-singar2 (B) の細胞内局在。Stage2 (左) およびStage3 (右) の神経細胞におけるMyc-singar1、Myc-singar2の局在を抗Myc抗体による免疫染色により解析した。矢印は軸索の成長円錐を、矢頭はMinor processの成長円錐を示す。(Scale bar=50 μ m)

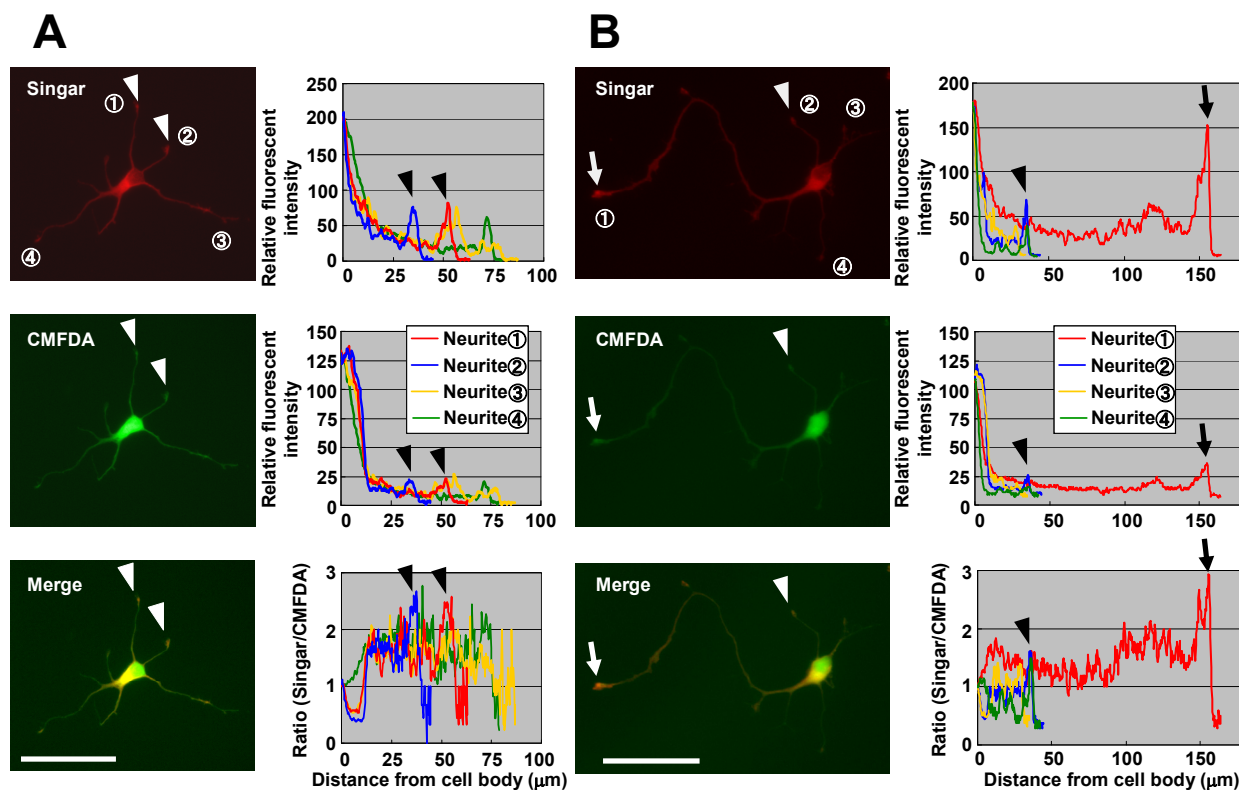


図9 培養海馬神経細胞におけるSingarの細胞内局在

(A, B) Stage2(A) および Stage3(B)の培養海馬神経細胞におけるSingarの細胞内局在(上段、赤)、Volume marker CMFDA(中段、緑)による染色。細胞体から番号で示す神経突起先端までの染色強度を、各染色像の左にグラフとして示す。グラフの横軸には細胞体からの距離を、縦軸には各部位の染色強度を示した。CMFDAと抗Singar抗体の染色イメージをMergeし(下段)、細胞体から神経突起先端までの染色強度比(抗Singar抗体の強度/CMFDAの染色強度)を、細胞体が1.0となるように補正しグラフに示す。矢印は軸索の成長円錐、矢頭はMinor processの成長円錐を示す。(Scale bar = 50 μm)

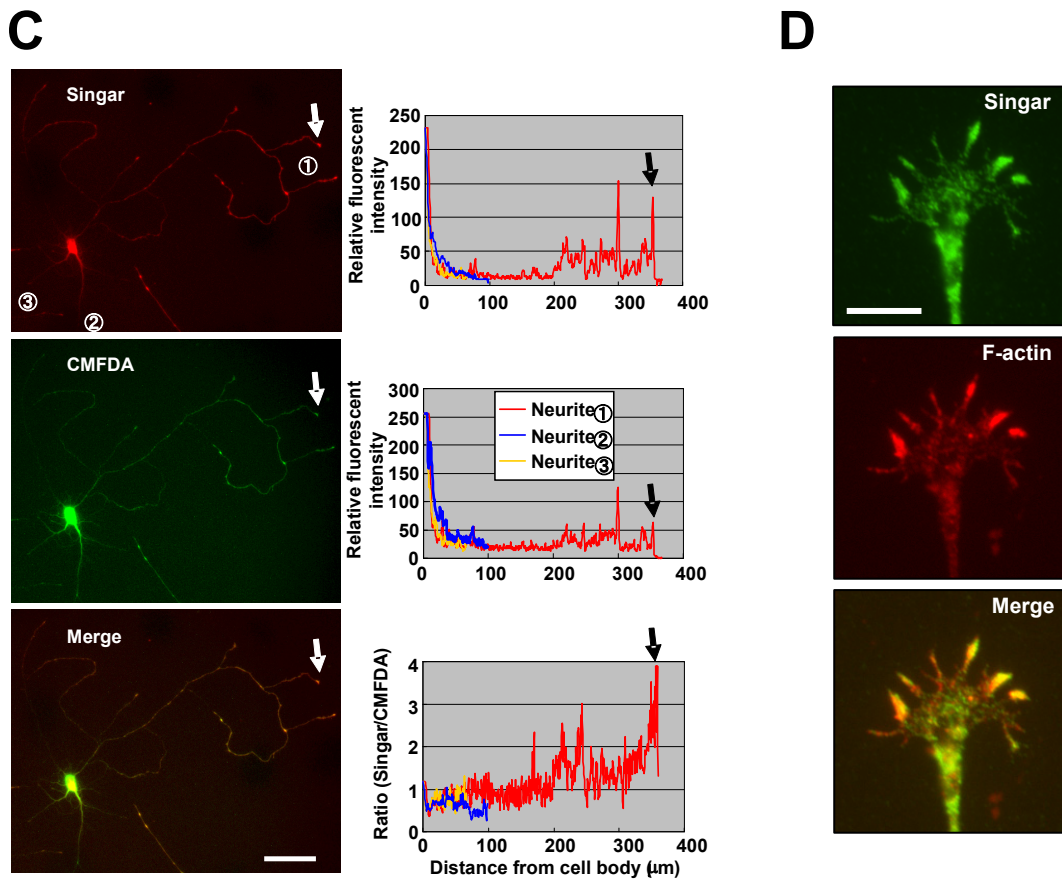


図9 培養海馬神経細胞におけるSingarの細胞内局在

(C) Stage4の培養海馬神経細胞におけるSingarの細胞内局在(上段、赤)、Volume marker CMFDA(中段、緑)による染色。細胞体から番号で示す神経突起先端までの染色強度を、各染色像の左にグラフとして示す。グラフの横軸には細胞体からの距離を、縦軸には各部位の染色強度を示した。CMFDAと抗Singar抗体の染色イメージをMergeし(下段)、細胞体から神経突起先端までの染色強度比(抗Singar抗体の強度/CMFDAの染色強度)を、細胞体が1.0となるように補正しグラフに示した。矢印は軸索の成長円錐を示す。(Scale bar = 50 μm)

(D) 軸索成長円錐におけるSingarの局在。Stage3の神経細胞に対し、抗Singar抗体(緑)およびRhodamin-Pharoidine(赤)による二重染色を行った。(Scale bar=10 μm)

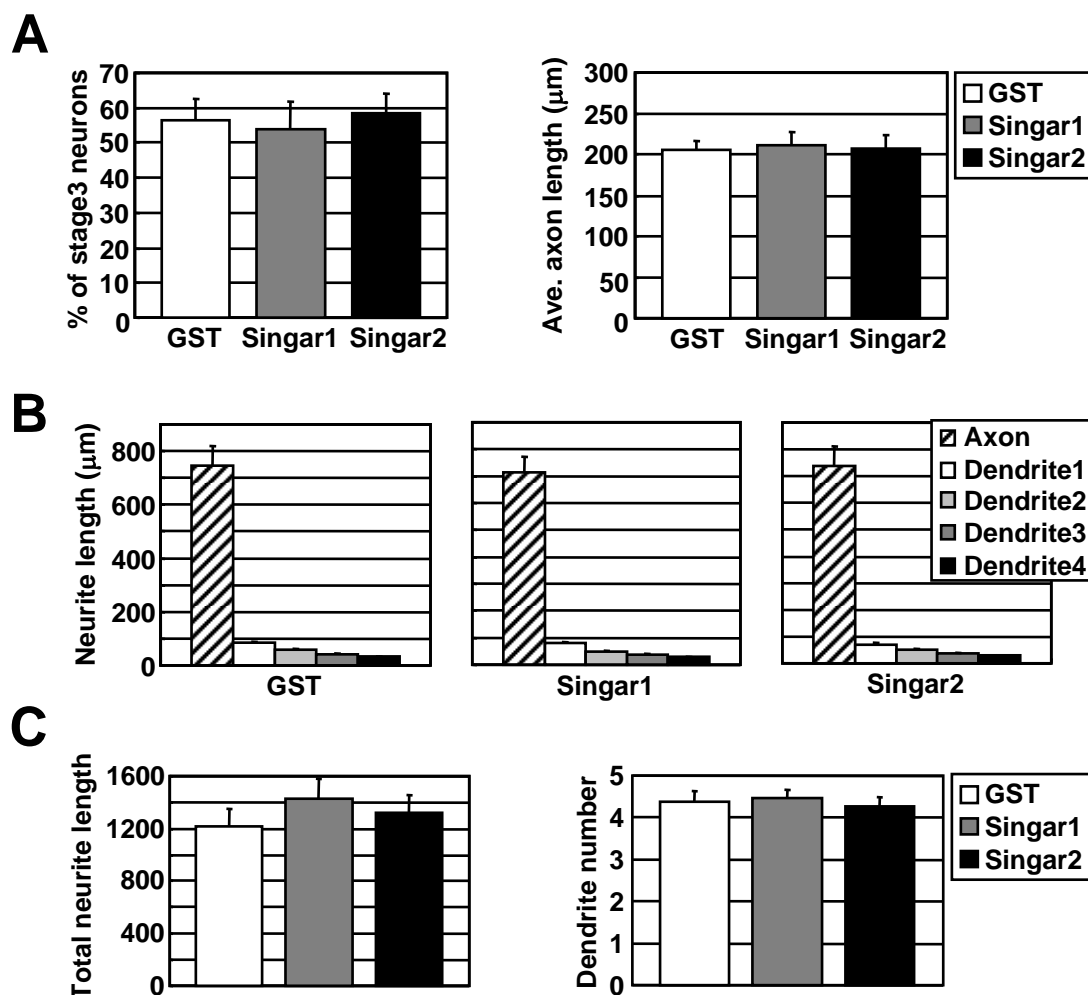


図10 Singar1, Singar2過剰発現の神経極性形成への影響

(A) 培養62時間におけるMyc-GST、Myc-singar1、Myc-singar2を過剰発現した神経細胞のStage3に移行した細胞の割合(左)および軸索の長さ(右)。Myc-GST、Myc-singar1、Myc-singar2を過剰発現した神経細胞を培養開始62時間で固定し、抗Myc抗体による免疫染色を行った。100 μm以上、他の突起の2倍以上の長さの神経突起を持つ細胞をStage3としカウントした。独立した3回の試行からGSTについて計216細胞、Singar1について計239細胞、Singar2について計289細胞を観察した。Error barは標準誤差を示す。

(B,C) Stage4のMyc-GST、Myc-singar1、Myc-singar2を過剰発現した神経細胞の軸索と樹状突起の長さ(B)、および神経突起全体の長さ(合計)と樹状突起の本数(C)。Myc-GST、Myc-singar1、Myc-singar2を過剰発現した神経細胞を培養6日目で固定し、抗Myc抗体による免疫染色を行った。軸索と樹状突起(最も長いものから4番目まで)の長さ(合計)と樹状突起の本数について定量を行った。定量した神経突起の長さの合計をTotal neurite lengthとした。独立した3回の試行から、GSTについて計42細胞、Singar1について計42細胞、Singar2について計40細胞を解析した。Error barは標準誤差を示す。

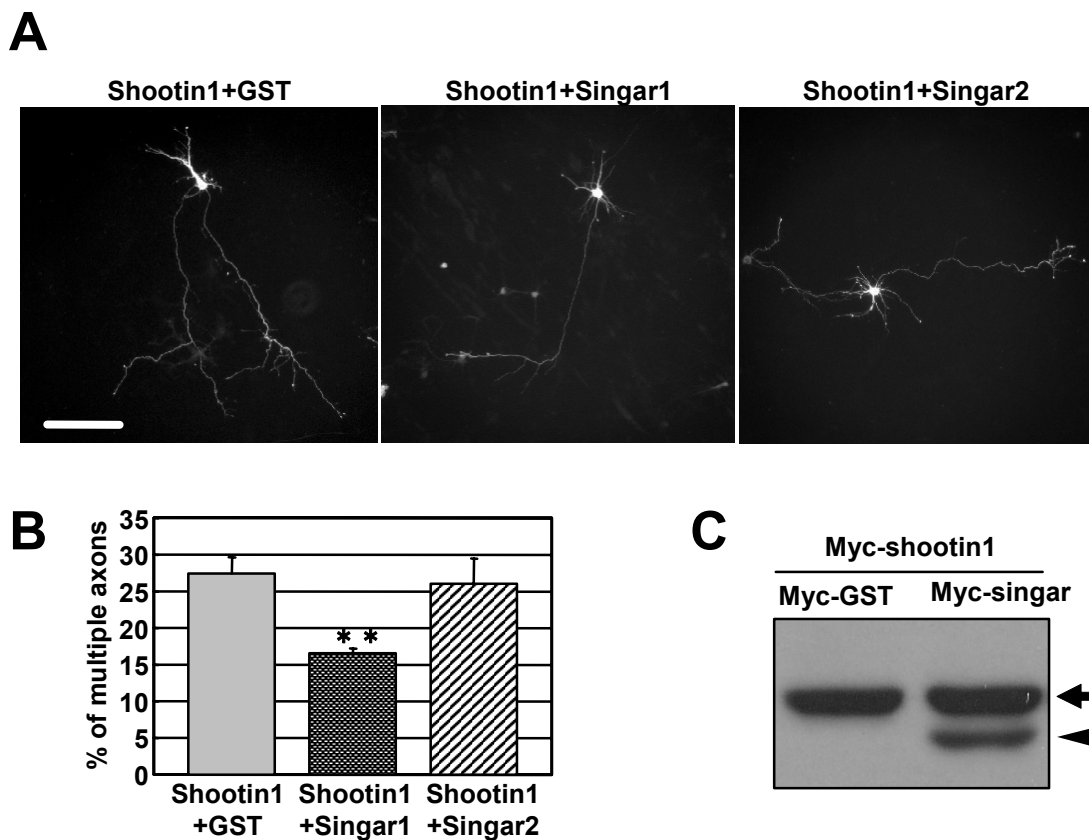


図11 Shootin1が誘導する過剰軸索形成に対するSingarの効果

(A, B) Myc-Shootin1とMyc-GST、Myc-Singar1、Myc-Singar2の神経細胞での共発現。Shootin1とGST、Singar1、Singar2を共発現させた神経細胞を培養6日目で固定し、抗Myc抗体と抗Shootin抗体で免疫染色を行った(A)。Transfectionされていない細胞に比べ抗Shootin抗体によるシグナルが十分に強く、抗Myc抗体に陽性の細胞について、2本以上の軸索を形成している細胞の割合を定量化した(B)。独立した3回の試行からShootin1+GSTについて計498細胞、Shootin1+Singar1について計493細胞、Shootin1+Singar2について計455細胞を解析した。Error barは標準偏差を示す。(**, $p < 0.01$, Scale bar = 50 μm)

(C) Myc-GSTまたはMyc-singar1とMyc-shootin1を神経細胞に共発現させた際のShootin1の発現量。Myc-GSTまたはMyc-singar1とMyc-shootin1を共発現させた神経細胞(培養6日目)から抽出したタンパク質について、抗Myc抗体によるImmunoblotを行った。

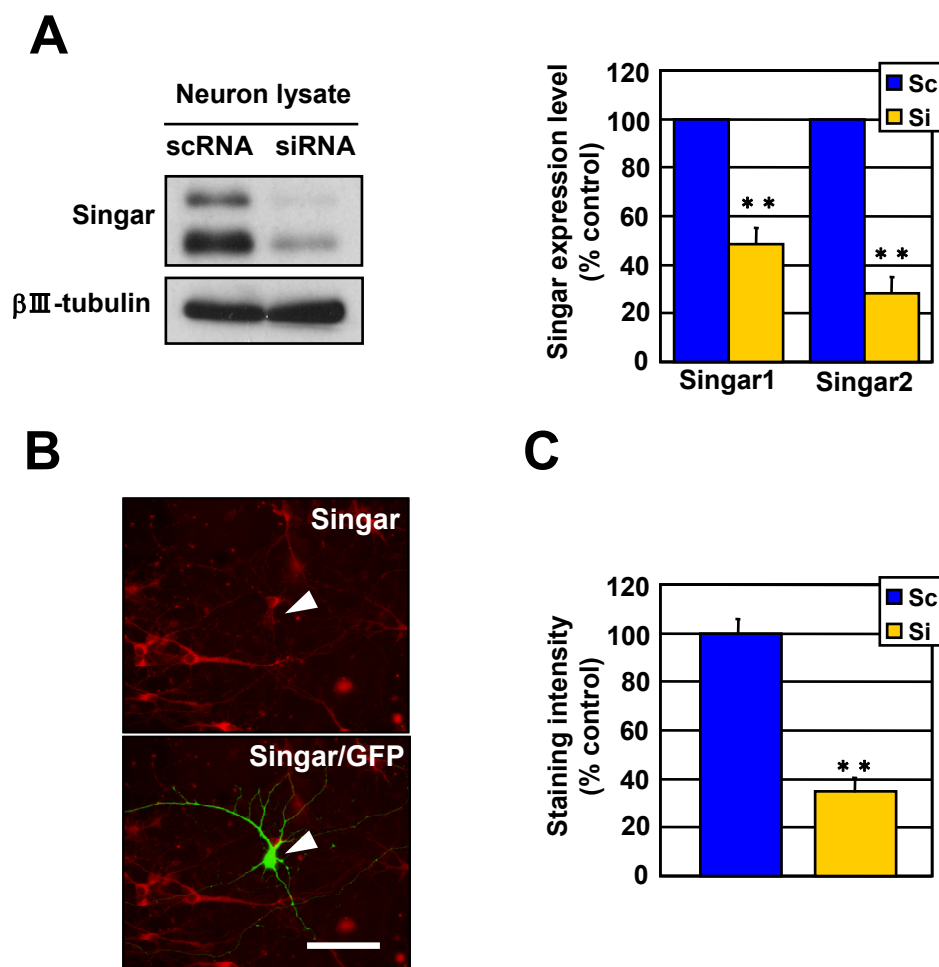


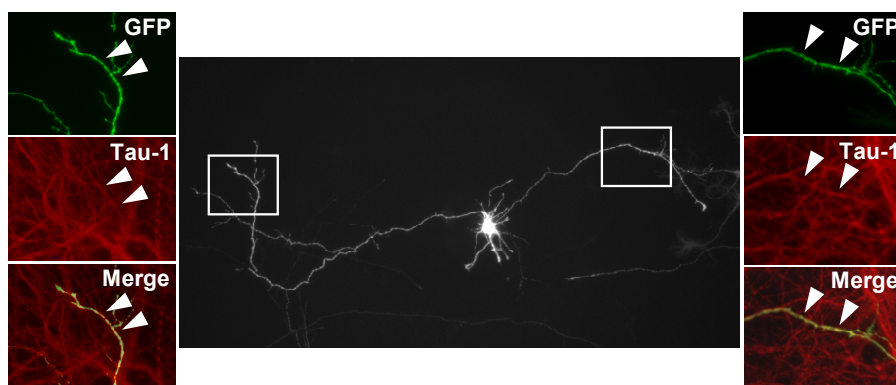
図12 siRNAによるSingarの発現抑制

(A) siRNAを導入した神経細胞内におけるsingarの発現量のImmunoblot解析。scRNA、またはsiRNAを導入した神経細胞(培養3日目)から回収したタンパク質(3 μ g)を抗Singar抗体、およびTUJ-1抗体によるImmunoblotにより解析した。独立に調製した3つのサンプルについて解析し、Singar1、Singar2のバンド強度を定量後、scRNAサンプルのバンド強度を100%としてグラフに示した。Error barは標準偏差を示す。(**, $p < 0.01$)

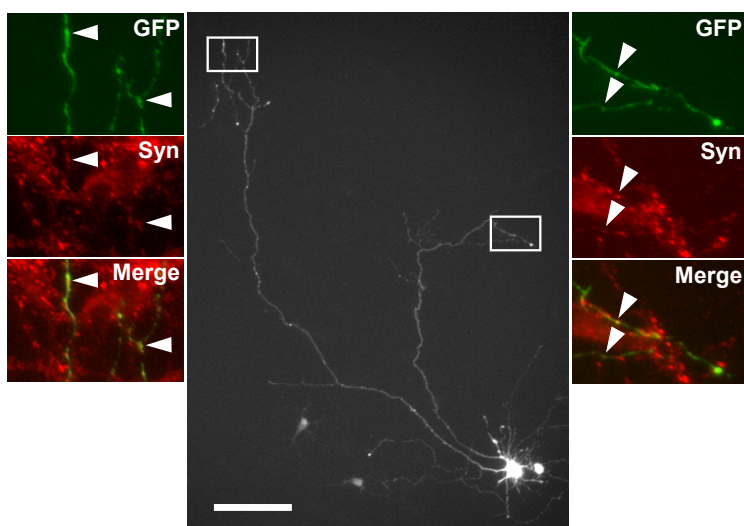
(B) siRNAとGFPを導入した神経細胞の抗Singar抗体による免疫細胞染色。siRNAとGFPを導入した神経細胞(培養6日目)について抗Singar抗体による免疫染色(赤)を行った。GFP陽性の細胞は陰性(siRNAが導入されていない)の細胞に比べ染色強度が低下していた。

(C) scRNA、siRNAを導入した神経細胞の抗Singar抗体による免疫細胞染色強度の比較。siRNAまたはscRNAをGFPと導入した神経細胞(培養6日目)について抗Singar抗体による免疫染色を行った。GFP陽性の細胞について、細胞体部分の染色強度を定量し、グラフに示した。scRNA+GFPについて計28細胞、siRNA+GFPについて計28細胞を解析した。(**, $p < 0.01$)

A



B



C

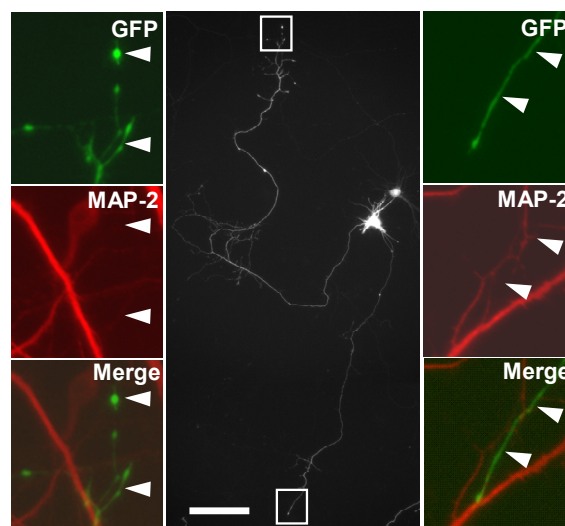


図13 Singarの発現抑制による過剰軸索の形成

(A, B, C) siRNAを導入しSingarの発現を抑制した神経細胞の形態。極性形成前にLipofectamine2000を用いてsiRNAとGFPを導入した神経細胞を培養6日目に固定し、Tau-1抗体(A, 赤)、抗Synaptophysin抗体(B, 赤)、抗MAP2抗体(C, 赤)で免疫染色を行った。A, B, Cの中央はGFPの蛍光イメージ(モノクロ)。その中の白枠部分を拡大し、各図の左右に示す。(Scale bars = 50 μ m)

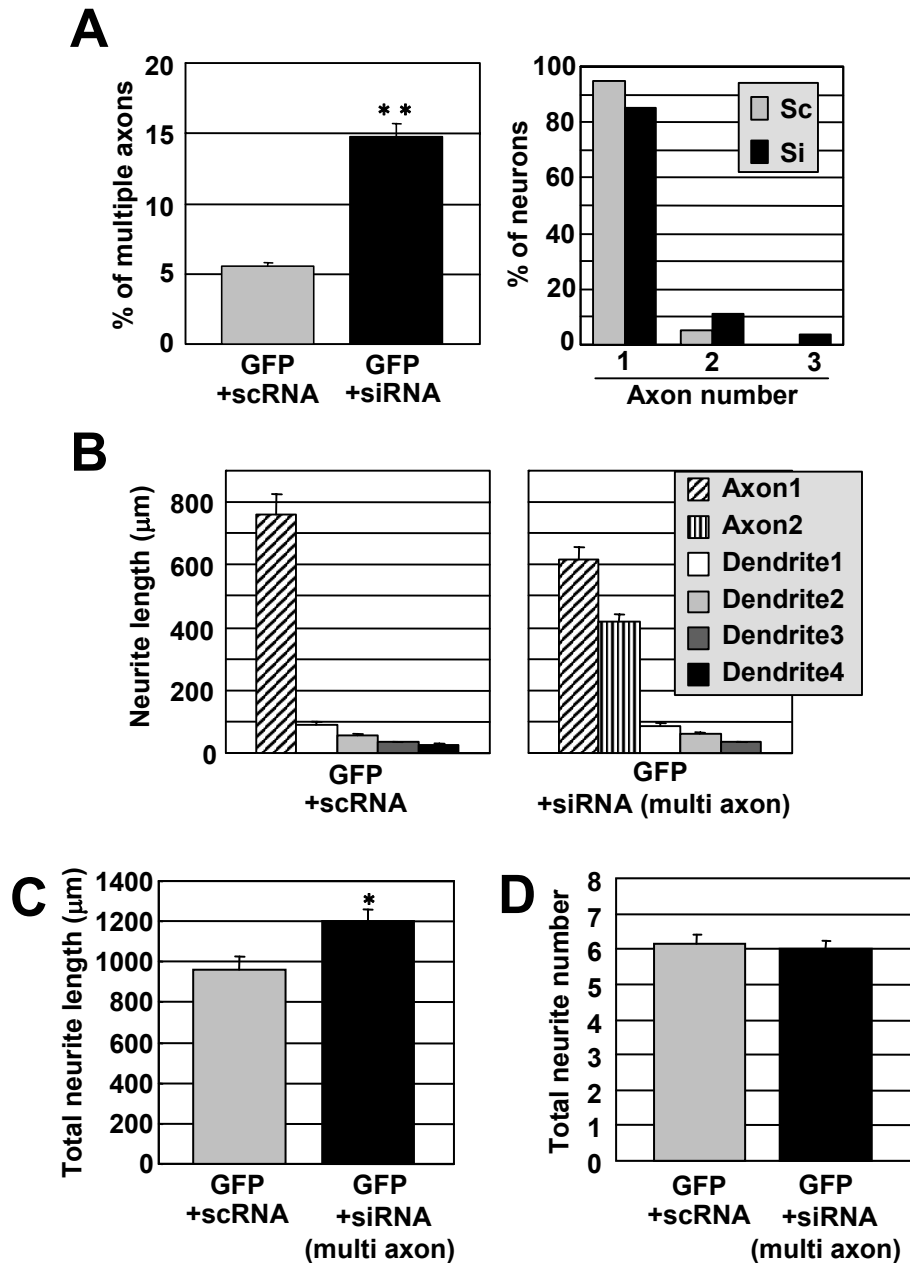


図 14 siRNAにより過剰軸索を形成する細胞の定量的な形態の評価

(A) siRNAにより過剰軸索を形成する細胞の割合と、過剰軸索の数。scRNA、またはsiRNAをGFPと共に導入した神経細胞(培養6日目)において、GFP陽性の細胞の中で過剰軸索を形成する細胞の割合を示した(右)。また、軸索の本数が1本、2本、または3本の神経細胞の割合を示した(左)。3回の独立した試行において、scRNA+GFPについて計159細胞、siRNA+GFPについて計150細胞を解析した。Error barは標準偏差を示す。(**, $p < 0.01$)

(B, C, D) siRNAにより過剰軸索を形成した細胞の定量的な形態の評価。(A)において、siRNA+GFPの導入により過剰軸索を形成した細胞について、軸索および樹状突起(最も長いものから3番目まで)の長さ(B)、神経突起合計の長さ(C)、形成している神経突起の本数(D)をグラフに示す。Error barは、(B,C)では標準誤差、(D)では標準偏差を示す。(*, $p < 0.05$)

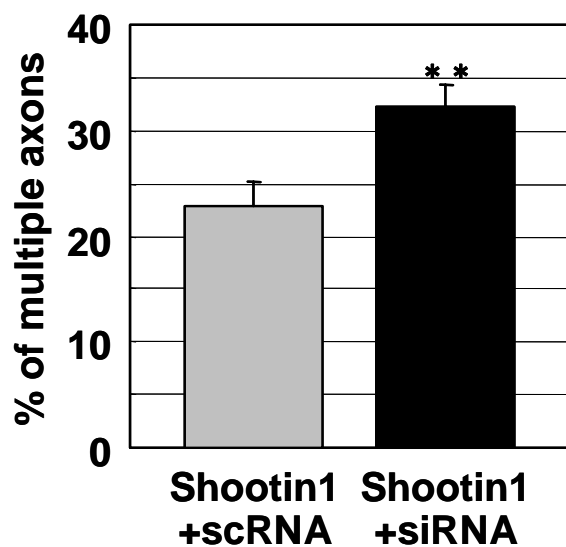


図15 Shootin1が誘導する過剰軸索形成に対するSingarの発現抑制の効果

scRNA、またはsiRNAをMyc-shootin1と共に導入した神経細胞を培養6日目に固定し、抗Myc抗体による免疫染色を行った。抗Myc抗体陽性の細胞について、過剰軸索を形成する細胞の割合をグラフに示した。scRNA+Myc-shootin1について計362細胞、siRNA+Myc-shootin1について計426細胞を解析した。Error barは標準偏差を示す。(**, $p < 0.01$)

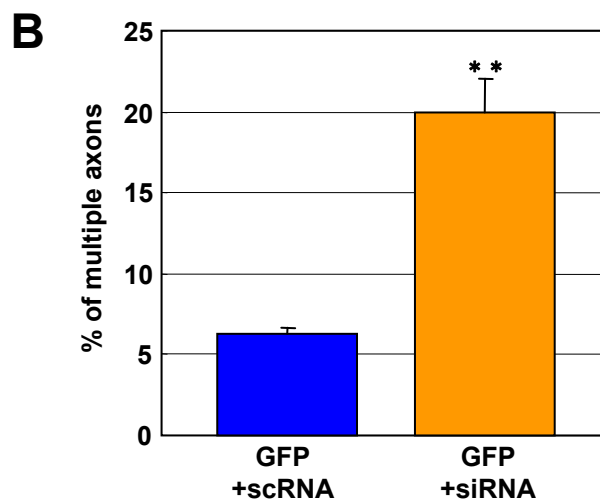
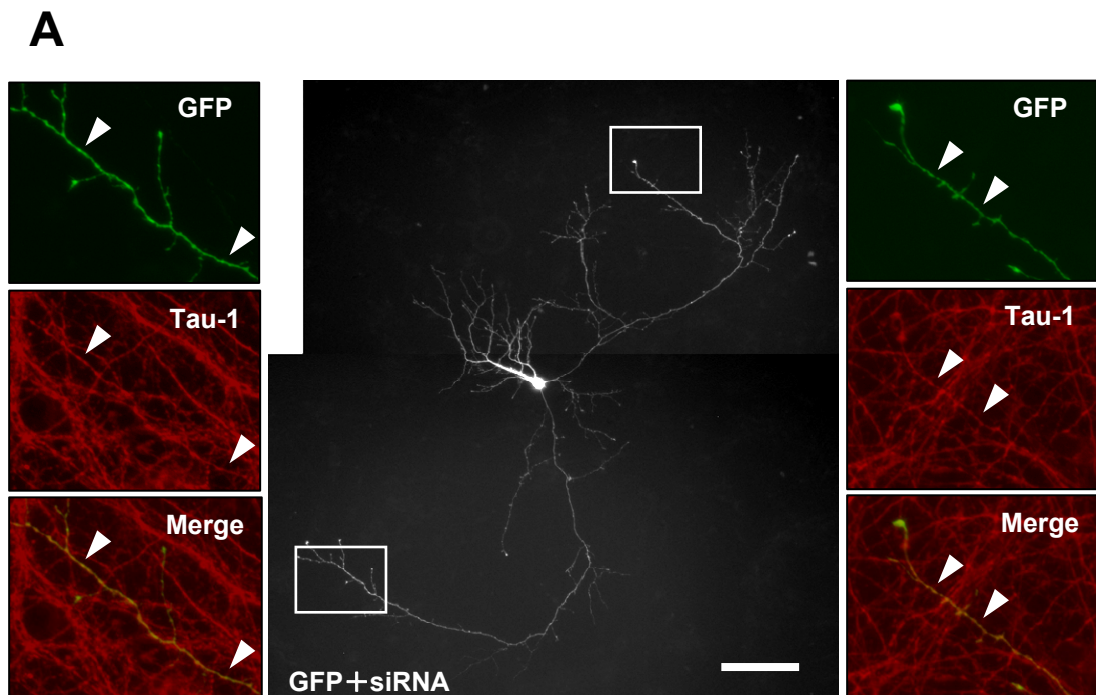


図16 極性形成後の神経細胞におけるSingarの発現抑制

(A) 培養3日目にsiRNAとGFPを導入した後、3日間培養を行った海馬神経細胞。形成された2本の軸索様神経突起はTau-1抗体に陽性であった。中央のイメージの中の白枠で囲った領域を左右に拡大して示す。

(B) 極性形成後の神経細胞におけるSingarの発現抑制の過剰軸索形成に対する影響。(A)に示すような過剰軸索を形成する細胞の割合を定量した。コントロールとしてscRNA+GFPを導入した神経細胞について同様に定量した。独立した3回の試行から、scRNA+GFPについて計160細胞、siRNA+GFPについて計131細胞を解析した。Error barは標準偏差を示す。(**, $p < 0.01$)

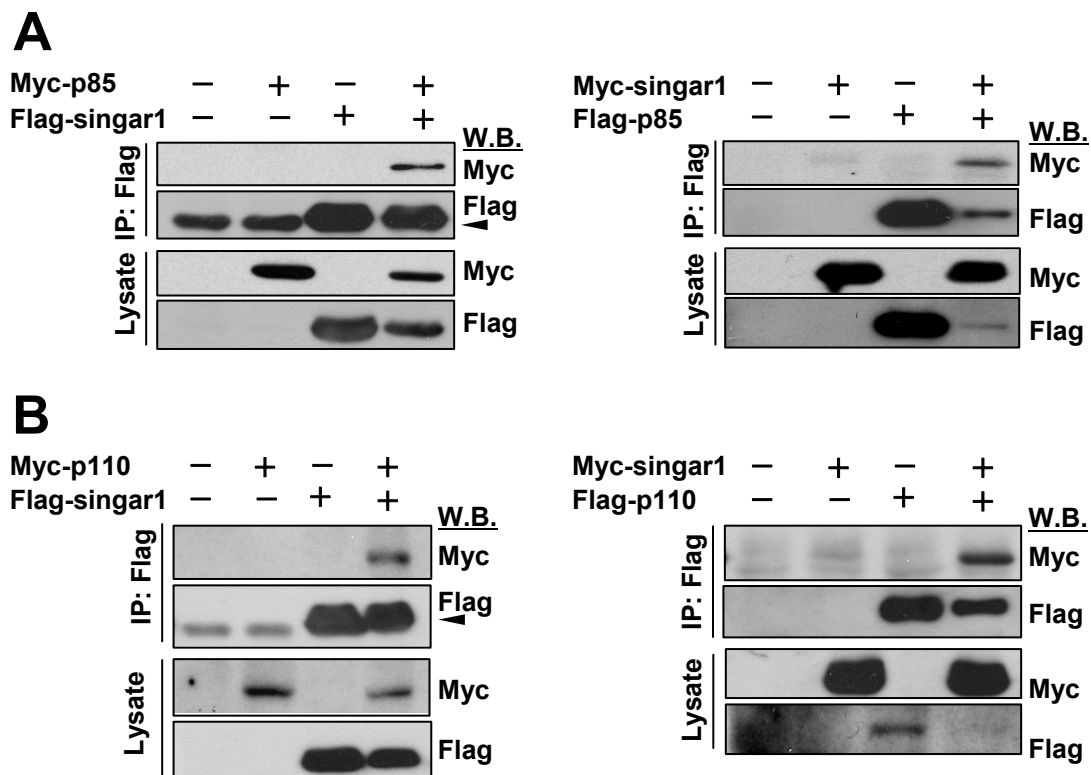


図17 HEK293T細胞におけるSingar1とPI 3-kinaseの相互作用

(A) HEK293T細胞におけるSingar1とp85の免疫沈降法による結合実験。Myc-p85とFLAG-singar1(左)、Myc-singar1とFLAG-p85(右)をHEK293T細胞に共発現し、抗FLAG抗体による免疫沈降を行った。FLAG融合タンパク質と共沈降したMyc融合タンパク質を抗Myc抗体で検出した。矢頭はIgG heavy chainを示す。(n=3)

(B) HEK293T細胞におけるSingar1とp110の免疫沈降法による結合実験。Myc-p110とFLAG-singar1(左)、Myc-singar1とFLAG-p110(右)をHEK293T細胞に共発現し、抗FLAG抗体による免疫沈降を行った。FLAG融合タンパク質と共沈降したMyc融合タンパク質を抗Myc抗体で検出した。矢頭はIgG heavy chainを示す。(n=3)

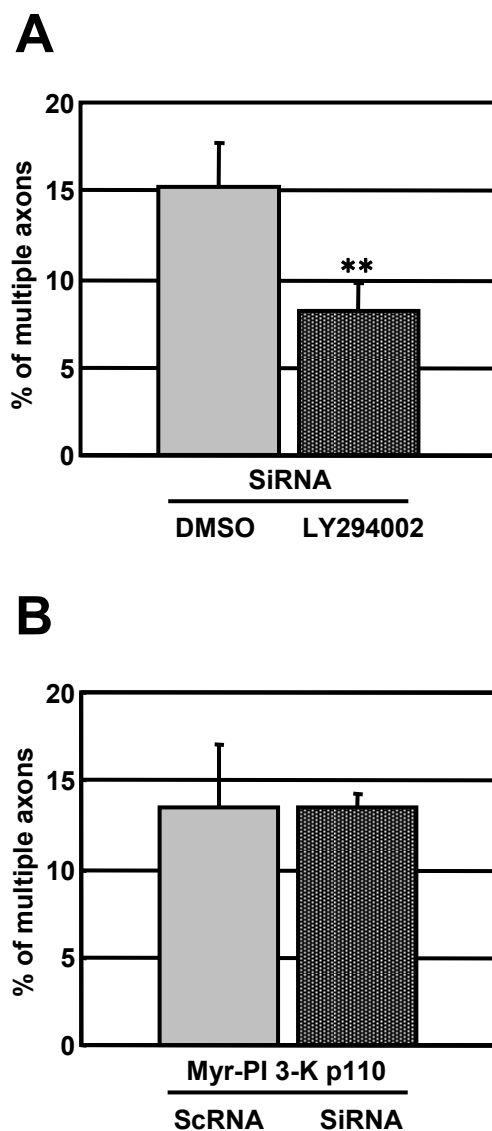


図18 Singarの発現抑制に対するPI 3-kinaseの効果

(A) Singarの発現抑制による過剰軸索形成に対するLY294002の影響。siRNAとGFPを導入した神経細胞を培養24時間後から5日間 20 μ M LY294002またはDMSO存在下で培養し、過剰軸索を形成する神経細胞の割合を定量した。独立した3回の試行からsiRNA+DMSOについて計208細胞、siRNA+LY294002について計214を解析した。Error barは標準偏差を示す。(**, $p < 0.01$)

(B) Singarの発現抑制による過剰軸索形成に対する恒常活性型PI 3-kinaseの影響。scRNA、またはsiRNAをMyr-p110およびGFPと共発現した培養6日目の神経細胞について、過剰軸索を形成している細胞の割合を定量化した。独立した3回の試行からscRNA+Myr-p110+GFPについて計175細胞、siRNA+Myr-p110+GFPについて計207細胞を解析した。Error barは標準偏差を示す。

参考文献

1. Craig, A.M., and G. Banker. 1994. Neuronal polarity. *Annu.Rev.Neurosci.* 17:267-310.
2. Winckler, B., and I. Mellman. 1999. Neuronal polarity: controlling the sorting and diffusion of membrane components. *Neuron.* 23:637-640.
3. Matus A, Bernhardt R, and Hugh-Jones T. 1981. High molecular weight microtubule-associated proteins are preferentially associated with dendritic microtubules in brain. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 78:3010-3014.
4. Dotti, C.G., C.A. Sullivan, and G.A. Banker. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J.Neurosci.* 8:1454-1468.
5. Inagaki, N., K. Chihara, N. Arimura, C. Menager, Y. Kawano, N. Matsuo, T. Nishimura, M. Amano, and K. Kaibuchi. 2001. CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat.Neurosci.* 4:781-782.
6. Shi, S.H., T. Cheng, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2004. APC and GSK-3beta are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr.Biol.* 14:2025-2032.
7. Shi, S.H., L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2003 Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell.* 112:63-75.
8. Schwamborn, J.C., and A.W. Puschel. 2004. The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat.Neurosci.* 7:923-929.
9. Menager, C., N. Arimura, Y. Fukata, and K. Kaibuchi. 2004. PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *J.Neurochem.* 89:109-118.
10. Yoshimura, T., N. Arimura, Y. Kawano, S. Kawabata, S. Wang, and K.

- Kaibuchi. 2006. Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3beta/CRMP-2 pathway. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 340:62-68.
11. Nishimura, T., K. Kato, T. Yamaguchi, Y. Fukata, S. Ohno, and K. Kaibuchi. 2004. Role of the PAR-3-KIF3 complex in the establishment of neuronal polarity. *Nat.Cell Biol.* 6:328-334.
12. Nishimura, T., T. Yamaguchi, K. Kato, M. Yoshizawa, Y. Nabeshima, S. Ohno, M. Hoshino, and K. Kaibuchi. 2005. PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat.Cell Biol.* 7:270-277.
13. Toriyama, M., T. Shimada, K.B. Kim, M. Mitsuba, E. Nomura, K. Katsuta, Y. Sakumura, P. Roepstorff, and N. Inagaki. 2006. Shootin1: A protein involved in the organization of an asymmetric signal for neuronal polarization. *J.Cell Biol.* 175:147-157.
14. Arimura, N., and K. Kaibuchi. 2005. Key regulators in neuronal polarity. *Neuron.* 48:881-884.
15. Jiang, H., W. Guo, X. Liang, and Y. Rao. 2005. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators. *Cell.* 120:123-135.
16. Chen, Y.M., Q.J. Wang, H.S. Hu, P.C. Yu, J. Zhu, G. Drewes, H. Piwnicka-Worms, and Z.G. Luo. 2006. Microtubule affinity-regulating kinase 2 functions downstream of the PAR-3/PAR-6/atypical PKC complex in regulating hippocampal neuronal polarity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 103:8534-8539.
17. Jones, D.M., B.A. Tucker, M. Rahimtula, and K.M. Mearow. 2003. The synergistic effects of NGF and IGF-1 on neurite growth in adult sensory neurons: convergence on the PI 3-kinase signaling pathway. *J.Neurochem.* 86:1116-1128.
18. Musatov, S., J. Roberts, A.I. Brooks, J. Pena, S. Betchen, D.W. Pfaff, and M.G. Kaplitt. 2004. Inhibition of neuronal phenotype by PTEN in PC12 cells.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 101:3627-3631.

19. Schwamborn, J.C., M. Muller, A.H. Becker, and A.W. Puschel. 2007. Ubiquitination of the GTPase Rap1B by the ubiquitin ligase Smurf2 is required for the establishment of neuronal polarity. *EMBO J.* 26:1410-1422.

20. Yan, D., L. Guo, and Y. Wang. 2006. Requirement of dendritic Akt degradation by the ubiquitin-proteasome system for neuronal polarity. *J.Cell Biol.* 174:415-424.

21. Kashihara, M., S. Miyata, H. Kumanogoh, N. Funatsu, W. Matsunaga, T. Kiyohara, Y. Sokawa, and S. Maekawa. 2000. Changes in the localization of NAP-22, a calmodulin binding membrane protein, during the development of neuronal polarity. *Neurosci.Res.* 37:315-325.

22. Francesconi, A., and R.M. Duvoisin. 2002. Alternative splicing unmask dendritic and axonal targeting signals in metabotropic glutamate receptor 1. *J.Neurosci.* 22:2196-2205.

23. Herbert, B. 1999. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 20:660-663.

24. Gorg, A., C. Obermaier, G. Boguth, A. Csordas, J.J. Diaz, and J.J. Madjar. 1997. Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis.* 18:328-337.

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

26. Inagaki N., K. Katsuta, E. Nomura, T. Ueda, M. Toriyama, T. Mori. 2002. High resolution multiple large gel two-dimensional electrophoresis for proteomics. *BIO forum Int.* 6:324-325.

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

28. Mori, T., T. Wada, T. Suzuki, Y. Kubota, and N. Inagaki. 2007. Singar1, a novel RUN domain-containing protein, suppresses formation of surplus axons for neuronal polarity. *J.Biol.Chem.* in press.
29. Callebaut, I., J. de Gunzburg, B. Goud, and J.-P. Mornon. 2001. RUN domains: a new family of domains involved in Ras-like GTPase signaling. *Trends in Biochem. Sci.* 26: 79–83.
30. Brewer, G.J., J.R. Torricelli, E.K. Evege, and P.J. Price. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J.Neurosci.Res.* 35:567-576.
31. Inagaki, N., M. Nishizawa, N. Arimura, H. Yamamoto, Y. Takeuchi, E. Miyamoto, K. Kaibuchi, and M. Inagaki. 2000. Activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II within post-synaptic dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *J.Biol.Chem.* 275:27165-27171.
32. Mortz, E., T.N. Krogh, H. Vorum, and A. Gorg. 2001. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics.* 1:1359-1363.
33. Nomura, E., K. Katsuta, T. Ueda, M. Toriyama, T. Mori, and N. Inagaki. 2004. Acid-labile surfactant improves in-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel protein digestion for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide mapping. *J.Mass Spectrom.* 39:202-207.
34. Larsen, M.R., S.J. Cordwell, and P. Roepstorff. 2002. Graphite powder as an alternative or supplement to reversed-phase material for desalting and concentration of peptide mixtures prior to matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Proteomics.* 2:1277-1287.
35. Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* 108:193-199.
36. Dickson B.J. 2001. Rho GTPases in growth cone guidance.

Curr.Opin.Neurobiol. 11:103-110.

37. Ruiz-Larrea, F., P. Vicendo, P. Yaish, P. End, G. Panayotou, M.J. Fry, S.J. Morgan, A. Thompson, P.J. Parker, and M.D. Waterfield. 1993.

Characterization of the bovine brain cytosolic phosphatidylinositol 3-kinase complex. *Biochem.J.* 290 (Pt 2):609-616.

38. Kukimoto-Niino M., T. Takagi, R. Akasaka, K. Murayama, T.

Uchikubo-Kamo, T. Terada, M. Inoue, S. Watanabe, A. Tanaka, Y.

Hayashizaki, T. Kigawa, M. Shirouzu, S. Yokoyama. 2006. Crystal structure of the RUN domain of the rap2 interacting protein X. *J.Biol.Chem.*

281:31843-31853.

39. DOTTI. C.G., G.A. BANKER. 1987. Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature.* 330:254-256.

40. Vanhaesebroeck .B., M. Waterfield. 1999. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp.Cell Res.* 253:239–254.

41. Brunet A., SR. Datta, ME. Greenberg. 2001. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr.Opin.Neurobiol.* 11:297-305.