

神経軸索輸送 Slow component b の分子機構の解明

勝野 弘子

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 神経システム生物学研究室

(稲垣 直之 教授)

平成 27 年 5 月 27 日 提出

序論

脳内には数多くの神経細胞が存在しており、突起を伸ばすことによって複雑なネットワークを形成している。神経細胞は一本の軸索と複数の樹状突起を持ち、他の神経細胞からの情報を樹状突起で受け取り、細胞体で統合した情報を軸索を通して他の神経細胞に伝達する。神経細胞における突起伸長は非常に重要であり、特に軸索は長く、時には1メートル以上にも及んで伸長する。

神経突起の伸長・維持・再生には、細胞骨格の編成や、細胞膜成分の供給が行われなければならない。そのため、将来軸索へ成長する突起には、細胞骨格分子などのタンパク質群や膜分子などが大量に輸送される。軸索形成に必要なタンパク質や膜分子は主に神経細胞の細胞体で合成され、軸索輸送によって軸索の先端に輸送される。軸索輸送は、軸索形成の初期段階で開始され、神経細胞が活着している期間継続して行われる。

軸索で輸送される分子群の同定は、RI 標識を利用した先行研究により行われた。その結果、数百種類の軸索輸送されるタンパク質が同定され、それらのタンパク質はその輸送速度の違いによって一つの速い輸送 (Fast component : 2~5 $\mu\text{m/s}$) と二つの遅い輸送 (Slow component a : 0.002~0.01 $\mu\text{m/s}$ 、Slow component b : 0.02~0.09 $\mu\text{m/s}$) に分類された [Lasek et al., 1984]。また、Fast component と Slow component はそれぞれ異なる分子群を輸送しており、Fast component では膜小胞を、Slow component では細胞質タンパク質を輸送していることがわかった。

分子の同定に伴い、その輸送機構についても解明が進められ、軸索内の分子輸送を担う輸送体としてダイニンとキネシンの2種類のモータータンパク質が同定された。ダイニンは、はじめは繊毛や鞭毛の運動を担うものとして発見され [Gibbons & Rowe, 1965; Gibbons, 1981]、その後、脳内にも存在し軸索輸送のモータータンパク質として機能することがわかった [Brady, 1985; Paschal et. al., 1987]。キネシンは、イカの巨大軸索を用いた研究によって、微小管に結合して移動するダイニンとは異なる新たなモータータンパク質として同定された [Vale et al., 1985a]。さらにダイニンは微小管のプラス端からマイナス端に、キネシンはマイナス端からプラス端に向かって動くことがわかり、Fast component と Slow component a はこれらモータータンパク質によって輸送されることが明らかとなった [Vale et al., 1985b; Schnapp & Reese, 1989; Hirokawa, 1998; Brown, 2003; Brown, 2005]。また、同じモータータンパク質による輸送でも、Slow component a は長時間微小管上で停止することで結果的に輸送速度が遅くなることがわかった [Brown,

2003; Brown, 2005]。一方、Slow component b は、35 年前にアクチンやアクチン結合タンパク質、酵素、などの細胞内可溶性のタンパク質を輸送していることが報告された [Black and Lasek, 1979]。最近になって、Slow component b に含まれる一部のタンパク質がモータータンパク質によって輸送されるという報告がされたが [Roy et al., 2008, Scott et al., 2011]、アクチンをはじめとした 200 種類以上ある Slow component b のほとんどのタンパク質については、その輸送における分子メカニズムは未だ不明のままである。そこで、本研究ではこの長年の謎である Slow component b に着目し、その輸送メカニズムの解明を目指した。

海馬神経細胞の突起には、軸索を伸長させる時期に軸索先端の成長円錐とよく似た Wave と呼ばれるアクチン線維に富んだ構造体が現れ、Slow component b と同じ速度で軸索を移動する [Ruthel and Banker, 1998]。Wave にはアクチンやアクチン結合タンパク質が濃縮しており、軸索上にランダムに出現して成長円錐の維持や突起の伸長・分枝を促進する [Ruthel and Banker, 1999; Flynn et al., 2009; Toriyama et al., 2010]。その結果、Wave がより多く発生した突起が軸索となる。これらのことから Wave がアクチンやアクチン結合タンパク質を運ぶ Slow component b の輸送機構のひとつであることが示唆されている [Ruthel and Banker, 1998; Flynn et al., 2009]。

当研究室では軸索形成分子 Shootin1 を同定しており [Toriyama et al., 2006]、Shootin1 がクラッチ分子として機能することを明らかにしている [Shimada et al., 2008]。クラッチ分子は、動的に重合・脱重合するアクチン線維を細胞接着タンパク質につなぎとめてアクチン線維の重合端（+端）の前方移動を引き起こすと想定されてきたタンパク質である [Mitchison and Kirschner, 1988]。細胞内で動的に重合・脱重合するアクチン線維はプラス端で重合しマイナス端で脱重合する。軸索先端の成長円錐におけるアクチン線維は前方にプラス端、後方にマイナス端が存在しており、Shootin1 がクラッチ分子として細胞接着タンパク質 L1-CAM を介してアクチン線維を細胞外基質につなぎとめ、アクチン線維のプラス端を前方に移動させて軸索伸長に必要な力を生み出す。Wave にも成長円錐と同様に Shootin1 が豊富に存在する。また興味深いことに、Shootin1 も Wave の移動に伴って軸索を移動することがわかった [Toriyama et al., 2006; 2010]。そこで私は、Wave におけるアクチン線維もプラス端が進行方向に向いていて、そこに存在する Shootin1 と細胞接着タンパク質 L1-CAM を介して細胞外基質につなぎとめ、重合・脱重合を介してプラス端で重合したアクチン分子の分だけ前進するという仮説を立てた。また、この様に前方移動するアクチン線維は、アクチン線維結合タンパク質を輸送するための足場としても機能すると考えた

(図 1, 動画 1)。

Wave にはアクチン線維の塊が存在し (図 1) 位相差顕微鏡でも十分に観察できる構造体であるため、Wave を観察することで Slow component b であるアクチンの輸送を容易に解析することができる。クラッチメカニズムによるタンパク質輸送のモデルでは、アクチン線維の重合・脱重合とアクチン線維-クラッチ分子-細胞接着分子-細胞外基質の連結が重要である。そこで本研究では、まず、Wave におけるアクチン線維の重合・脱重合とその方向性を解析した。そして次に、アクチン線維の重合を阻害した場合や、アクチン線維から細胞外基質までの連結を変化させた場合のアクチン線維の移動速度の変化を解析した。さらに、クラッチメカニズムによって生じると考えられる細胞外基質にかかる力を検出・解析することでアクチン線維のクラッチメカニズムによる輸送を検証し、Slow component b の分子機構の解明を目指した。

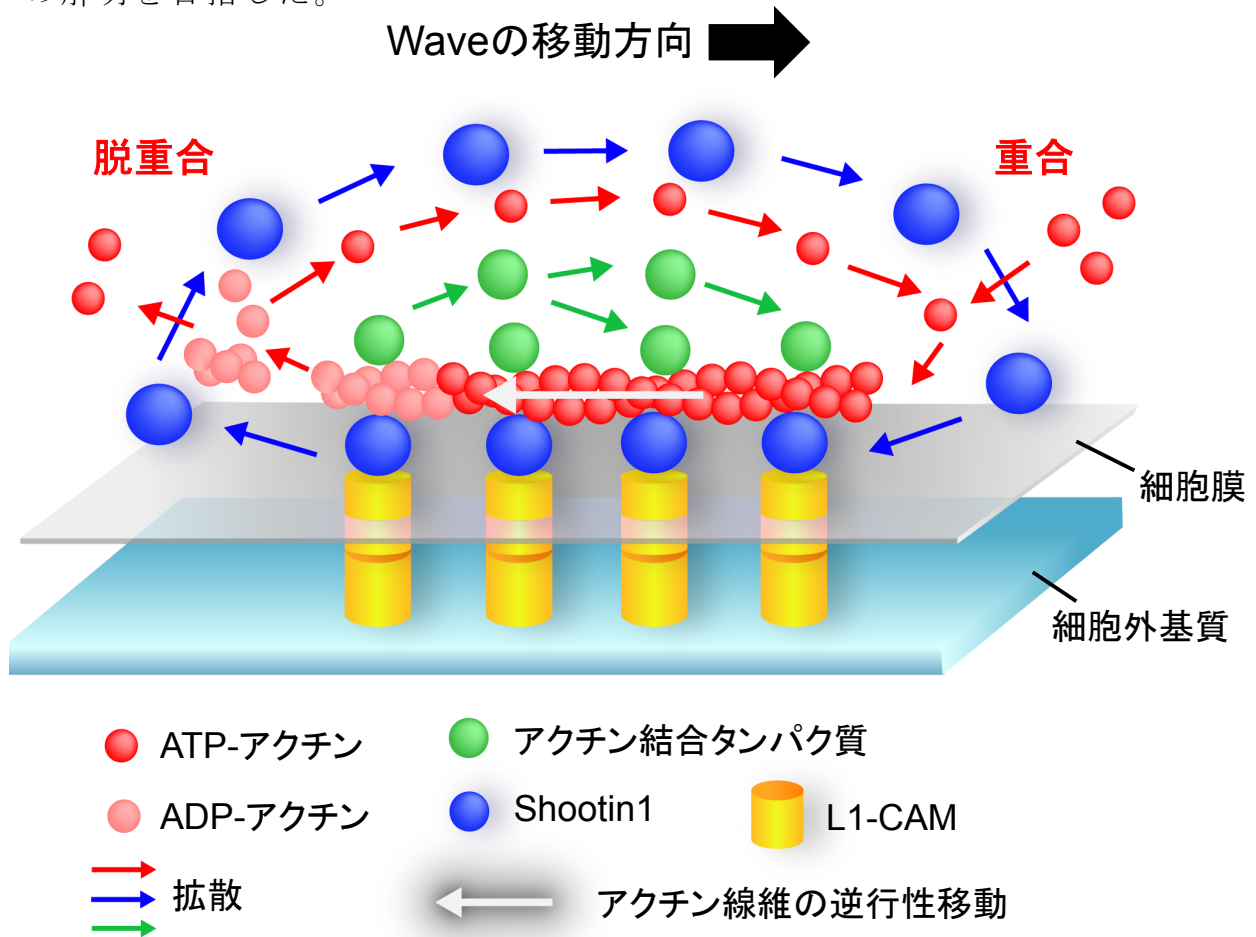


図 1. クラッチメカニズムによるアクチン線維の輸送のモデル図

細胞内で重合・脱重合するアクチン線維をクラッチ分子 (Shootin1) と細胞接着分子 (L1-CAM) が細胞外基質につなぎとめる。これによってアクチン線維はアクチン分子の重合した分だけ前進する。また、アクチン結合タンパク質はアクチン線維に結合することでともに輸送される。

材料と方法

HEK293T 細胞内への Transfection と L1-Fc の作成

以下の方法によりコーティングに用いるための L1-Fc を分泌した HEK293T 細胞の培養上清を得た。10% FBS を含む Dulbecco modified eagle medium (DMEM) (Sigma) 中で培養し、80% confluent に達した HEK293T 細胞 (10 cm dish) に、1 dish あたり 40 μ g の L1-Fc ベクターをリン酸カルシウム法を用いて Transfect した。24 時間後に DMEM で洗浄し、リン酸カルシウム-DNA の複合体を取り除いた。さらに 48 時間培養後に Medium を回収し、回収した Medium は遠心分離 (3,500 rpm, 4°C, 25 分) した後、滅菌フィルター (0.22 μ m) を用いて濾過滅菌し、500 ng/ml 以上の濃度でコーティングに用いた。培養は 37°C、CO₂ 濃度 5% の条件下で行った。

Coverslip 及び培養皿のコーティング

PDL (Poly-D-lysine): カバースリップ (Matsunami) 及びガラスボトムディッシュ (Matsunami, Invitrogen) に 1 mg/ml PDL (Sigma) をのせ、37°C で 4 時間以上インキュベートした。

ラミニン: PDL コートしたカバースリップ及びディッシュを PBS で洗浄し、50 μ g/ml マウスラミニン (旭硝子) をのせ 37°C で 3 時間以上インキュベートした。

L1-CAM: PDL コートしたカバースリップ及びディッシュに抗 Fc 抗体 (Jackson) をのせ、37°C で 3 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、作成した L1-Fc をのせ 37°C で一晩反応させた。また、観察終了後に抗 L1 抗体 (7B5) を用いて免疫染色を行い、L1-Fc がコートされているかを確認した。

海馬神経細胞の初代培養

胎生 18 日目の Wistar 系ラット (日本 SLC) 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及び 37°C でのインキュベートを 10 分行った。海馬組織より分離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、沈殿している海馬組織には新たに 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ティングと 37°C でのインキュベートを、海馬組織の細胞が完全に分離されるまで繰り返し行った。遠心分離 (1,000 rpm, 20 分, 4°C) により回収した神経細胞を、10% FBS を含む Neurobasal medium 5 ml に再度懸濁し、目的の実験に合わせた細胞数に希釈してコーティングを施した coverslip もしくはガラスボトムディッシュ上で培養した。培養開始 3 時間後に培養 Medium を 2% B-27 supplement (Gibco)、1 mM Glutamine (Sigma) を含む Neurobasal medium に交換した。培養は 37°C, CO₂ 濃度 5% の条件下で行った。

初代培養神経細胞への遺伝子導入 (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 (1,000 rpm, 20 分, 4°C) し、その後、1×PBS 5 ml を加え懸濁し $1.0\sim 3.0\times 10^6$ 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 Neucleofactor solution (Lonza) 75 μ l と Supplement solution 18 μ l の混合液で細胞を懸濁し、目的の Plasmid DNA を加え十分にピペティングにより懸濁した。細胞懸濁液を専用のキュベットに移し、Neucleofector Type1 (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 medium に懸濁し、予めコーティングを施しておいたカバースリップもしくはディッシュ上で培養した。

免疫細胞染色

神経細胞が培養されている 24 well プレートに 1×Kreb's buffer で 3.7% に希釈したホルマリンを 500 μ l 加え室温で 10 分固定した。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 2 ml 加え、この操作を 3 回行い、最後に 2 ml の PBS が存在した状態で氷上にて 10 分間静置した。細胞のボリュームマーカである CMAC (7-amino-4-chloromethylcoumarin、Molecular Probes) で染色する場合は、固定の 3 時間前に Medium に終濃度 10 μ M になるように添加した。アスピレーターにて PBS を吸い取り、そこに 4°C に冷却した 0.05% TritonX-100 を 500 μ l 加え、氷上にて 15 分静置した。その後、アスピレーターにて TritonX-100 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 時間静置してブロッキングした。ブロッキング終了後、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 プレートの蓋に移し、10% NGS を含む PBS で希釈した 1 次抗体を 40 μ l カバースリップ上に加え、4°C で一晩反応させた。一次抗体は、抗 shootin1 抗体

(本研究室にて作製)、抗リン酸化 Shootin1 抗体 (S249、本研究室にて作製)、抗 cortactin 抗体 (4F11、Millipore)、抗 β III tubulin 抗体 (Tuj1、CONVANACE)、抗 L1 抗体 (NCAM-L1、Santa Cruz) を使用した。反応終了後、カバースリッ プを 1×PBS につけて 1 次抗体を軽く洗浄し、PBS を満たした 24 well プ レートにカバースリッ プを入れて氷上で 1 時間静置した。その後、1 次抗体 添加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 40 μ l 加え、室温・暗所で 1 時間静置し反応させた。二次抗体は、それぞれ 一次抗体の動物種に対応する蛍光標識付きの抗体を使用した。反応終了後 は 1 次抗体と同様の手法で軽く洗浄し、PBS を満たした 24 well plate に coverslip を入れて室温・暗所で 1 時間静置した。Phalloidin 染色、DNase I 染色を行う際には、2 次抗体の洗浄時間を 30 分にし、1×PBS で 100 倍希釈 した蛍光標識付きの Phalloidin (Molecular Probes) または 1000 倍希釈した DNase1 (Molecular Probes) を 40 μ l 抗体と同じ手法でカバースリッ プに加 え、室温・暗所で 30 分反応させた。反応終了後は抗体と同じ手法で洗浄し 10 分間暗所で静置した。染色が終了したら、カバースリッ プをスライドガ ラスにのせ、50% glycerol を含む PBS を加えた上からカバースリッ プ (Matsunami, MICRO COVER GLASS) をのせてカバースリッ プの周りにマ ニキュアを塗り封入した。観察・撮影はカメラ (AxioCam MRm, ZEISS) を 装備した蛍光顕微鏡 (Axioplane 2, ZEISS)、画像処理ソフト (Axiovision 3, ZEISS) を用い、×63 油浸対物レンズで行った。画像編集は Photoshop Element 9.0 (Adobe) を用いて行った。

タイムラプス観察

観察を開始する 1 時間以上前に培地を 1% B-27 supplement、1 mM Glutamine を含む L-15 Medium (Invitrogen) に置換し、37°C で培養した。そ の後、予め 37°C に設定しておいた顕微鏡のステージに取り付けられている インキュベーターに設置した。撮影は CCD カメラ (Phoenix-XSDU888E, オ リンパス) を装備した倒立顕微鏡 (IX81, Olympus)、画像処理ソフト (MetaMorph, MDS) を用い、×20 または×40 対物レンズで行った。定量解 析は Multi Gauge (Fujifilm) を用いて行った。

薬剤添加

Wave の移動速度の解析には、アクチン重合阻害剤としてサイトカラシン B (Sigma, 終濃度 0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.2 μ M)、SMIFH2 (Sigma, 終濃度 5 μ M)、CK666 (Enzo Life Sciences, 終濃度 100 μ M)、ミオシン II の阻害剤としてブ レビスタチン (Sigma, 終濃度 2.5 μ M) を使用した。まず、薬剤を添加して

いない L-15 Medium を加えて 200 分間タイムラプス計測を行い、Dish から約 2/3 量の Medium をエッペンチューブに回収し、それぞれの終濃度になるように各阻害剤を加えてよく混合してから再び Dish に戻し、200 分間タイムラプス計測を行った。また、コントロール細胞には阻害剤と等量の DMSO を添加した。細胞内一分子計測時のアクチン重合阻害剤としては、サイトカラシン D (Sigma、終濃度 1 μ M) を添加した。Traction force microscopy におけるプレビスタチン添加は、予め終濃度 2.5 μ M になるように L-15 medium に混合し、37 度のインキュベーターで 1 時間培養した後、観察に用いた。Netrin1 刺激は、Recombinant mouse Netrin1 (R&D Systems) またはコントロールとして BSA を終濃度 300 ng/ml になるように L-15 Medium に添加して行った。添加後は 37 度のインキュベーターで 1 時間培養し、観察に用いた。

Shootin1 の RNAi

Shootin1 の発現抑制には、ラット Shootin1 の遺伝子コード領域の #1 : 138 から 158 番目の塩基配列 (TGAAGCTGTTAAGAAACTGGA)、#2 : 867 から 887 番目の塩基配列 (GTTAGAGGAACGGCTAGAGAA)、#3 : 1033 から 1053 番目の塩基配列 (GTGAATCAGTCGGAGAATTTCG) をそれぞれターゲットとした miRNA ベクターを用いた。また、ネガティブコントロールとして Invitrogen 社のキットに添付されていた pcDNA 6.2-GW/emGFP-miR-neg ベクターを用いた。海馬神経細胞には Neucleofector を用いたエレクトロポレーションによって導入した。RNAi による Shootin1 の発現抑制は、タイムラプス計測後に抗 Shootin1 抗体を用いた免疫染色によって確認した。

細胞内一分子計測

通常細胞内のアクチン一分子の蛍光はブラウン運動していて検出できないが、アクチン線維に取り込まれることによってそのブラウン運動が停止し、一分子蛍光を検出することができる。この原理を利用し、蛍光標識したアクチンを細胞に発現させることで、線維に取り込まれたアクチンを蛍光スペックルとして検出し、追跡することができる。本研究では、海馬神経細胞に mRFP-actin、EGFP-actin、EGFP-shootin1、または mRFP-cortactin を発現させ、発現の弱い細胞を選び細胞内一分子計測を行った。ディッシュ内の Medium は観察の 1 時間以上前に L-15 Medium に交換しておき、観察に用いた。撮影には CCD カメラを装備した倒立型顕微鏡 (AxioObserver Z1, ZEISS)、画像処理ソフト (Axiovision4.6, ZEISS)、 $\times 100$ 油浸対物レンズ、または CMOS カメラ (ORCA-Flash4.0, HAMAMATSU) を装備した倒立型顕

微鏡 (AxioObserver Z1, ZEISS)、画像処理ソフト (zen2012, ZEISS) を用いた。撮影した画像の中から 10 秒以上追跡できる一分子像の speckle を選択し、Multi Gauge を用いて speckle の速度および方向の定量解析を行った。

Traction force microscopy

ガラスボトムディッシュの活性化：直径 27 mm ガラスボトムディッシュ (Matsunami) に 0.1% NaOH in PBS をのせ、室温で 15 分間静置後、さらに 3-aminopropyl-trimethoxysilane (Sigma) を 20 μ l 加え 15 分間静置した。その後、精製水で洗浄し、0.5% glutaraldehyde in PBS (Polysciences) を 500 μ l のせて室温で 30 分間静置し、ガラスボトムディッシュの活性化を行った。

カバースリップの洗浄：直径 18 mm のカバースリップ (Matsunami) を 70% EtOH で洗浄し、乾かした。

アクリルアミドゲルの作成：acrylamide (終濃度 3.75%)、bis-acrylamide (終濃度 0.03%) に Fluorescent latex beads, 0.2 μ m (Molecular Probes) を 10 倍希釈したものを 20 μ l 加え、全量で 500 μ l になる様に調整した。調整したゲル溶液をデシケーターで 30 分間脱気し、10% APS (Plus-one) と TEMED (ナカライ) を各 1 μ l ずつ加えて混合したものを 25.2 μ l ガラスボトムディッシュにのせ、上から静かに洗浄済みのカバースリップを被せた。その後、ディッシュを逆さまにし、暗所で 1 時間程度静置しゲルを固めた。

ゲル表面の活性化：ゲルが固まったらカバースリップをはがし、1 mM sulfo-SANPAH (Thermo) in 50 mM HEPES, pH 8.5 を 100 μ l のせ、クリーンベンチ内の UV ランプの 15cm ほど下に 5 分間静置してゲル表面を活性化した。その後、色が抜けるまで洗浄し、通常通りのコーティングを行った。

タイムラプス観察：撮影は CCD カメラを装備した倒立型共焦点顕微鏡 (LSM710, ZEISS)、画像処理ソフト (zen2009, ZEISS)、 $\times 63$ 水浸対物レンズを用いて行った。撮影終了後は、ディッシュに 10% SDS を 200 μ l 加えて細胞をはがした後のビーズの位置を撮影し、タイムラプス画像と重ね合わせることでビーズの移動距離と方向を MATLAB (MathWorks) の計算アルゴリズムを使用して解析した。

In utero electroporation 及びタイムラプス観察

プラスミドの調整：in utero electroporation で使用するプラスミドは、終濃度が pCAGGS-mRFP 1 μ g/ μ l、pCAGGS-EGFP-actin 1 μ g/ μ l、pCAGGS-Cre 0.5 μ g/ μ l になる様に調整し、Fast green FCF (Wako) を終濃度 0.5 μ g/ μ l となるように混合したものを使用した。

In utero electroporation：妊娠 14 日目の母親マウスに対し、in utero

electroporation を行った。腹腔内にソムノペンチルを投与し、ホットプレート上で麻酔下の母親マウスを開腹し、子宮を露出させた。実体顕微鏡下で確認しながらキャピラリーを使って胎仔マウスの側脳室にプラスミドを注入した。続いて、子宮の外からピンセット型の円形白金電極（電極径 5 mm : BEX）で胎仔の脳をはさみ、電場（電圧 35V、パルス時間 50ms、パルス間隔 450ms、パルス回数 5 回）を負荷した。

培養切片作成 : in utero electroporation を行った 2 日後に妊娠マウスから胎仔を摘出した。10% グルコース入り PBS を入れたシャーレ中に胎仔の脳を取り出し、40°C の 4% アガロース / PBS 溶液に脳を沈め、冷却してアガロースを固めた。包埋した脳はアガロースごとブロックとして切り出し、冷却 PBS に浸しながらミクロトーム（VT1000S、LEICA）で 250 μm 厚のスライスにした。スライスはガラスボトムディッシュ（Matsunami）の中に置き、周囲をコラーゲン溶液（コラーゲン：新田ゼラチン 60%、 H_2O 20%、5 \times DMEM/F-12:Wako 20%）に Alkali solution (2.2% NaHCO_3 、200 mM HEPES、0.05N NaOH) を 100 μl 混合したもので覆って固めた。その後、1% B-27 supplement、1 mM Glutamine を含む L-15 Medium を加えて 37°C でインキュベートした。

タイムラプス観察 : 培養ディッシュごと顕微鏡に装備されたインキュベーターにのせ、40% O_2 、5% CO_2 混合ガスを充満させた状態で観察を行った。撮影は、CCD カメラを装備した倒立型共焦点顕微鏡（LSM710, ZEISS）、画像処理ソフト（zen2009, ZEISS）、 $\times 20$ 対物レンズを用いて、Z 軸を 5 μm 間隔で離し、5 分ごとに撮影した。得られた画像は Image J を用いて重ね合わせ解析した。

非接着性ストライプ基質の作成及びタイムラプス観察

ガラスボトムディッシュ（Matsunami）の表面に薄く液体パラフィン（モレスコホワイト P-150 : モレスコ）を塗り、その上に厚さ 1.5 μm のポリエチレンテレフタレートフィルム（帝人デュポンフィルム）を貼付けた。その後、フェムト秒レーザー（Cyber Laser, Ifrite SP-1, 780 nm, 230 fs, 100 nJ/plus）を $\times 40$ 対物レンズを用いて照射し、速度 50 $\mu\text{m}/\text{s}$ でスキャンして幅約 15 μm のストライプ状の切り込みを入れた。その後、切れ込みからのコーティング溶液の漏れが無いかどうかを確認するために Texas Red 融合型 BSA（Molecular Probe）を 1% の濃度で混合した PDL、抗 Fc 抗体、L1-Fc でコーティングを施した。コーティングを施したフィルム上に、AcGFP-actin を遺伝子導入した神経細胞を培養した。軸索伸長後に実体顕微鏡下でピンセットを用いてストライプ部分を引き抜き、軸索の途中に非接着性のスト

ライブ領域を作成した。その後、直ちにタイムラプス観察用の顕微鏡に培養ディッシュを設置し、非接着性ストライブ領域に PDL の漏れが無いかを確認してからタイムラプス観察を行った。

結果

アクチンは Wave に濃縮して軸索を移動する

Wave は成長円錐によく似た構造体であり、ラット培養海馬神経細胞の軸索に出現し先端に向かって $1\sim 6\ \mu\text{m}/\text{min}$ の速度で移動する (図 2A、矢頭、動画 2)。この移動速度は軸索輸送の Slow component b と一致する [Ruthel & Banker, 1998]。Wave にはアクチン線維が濃縮していることはすでに報告されている (図 2B、矢頭、動画 2) [Ruthel & Banker, 1998]。そこで私は脳組織内においても Wave が発生するかどうかについて、*in utero* electroporation 法を用いて検証した。この手法を用いて子宮内のマウス胎仔の脳神経細胞に蛍光タンパク質を遺伝子導入し、さらにその脳切片を培養することで、*in vivo* における神経細胞の動態を観察をすることができる。Wave にはアクチン線維が濃縮することから、マウス胎仔の脳に EGFP-actin を遺伝子導入した脳組織切片を培養し、タイムラプス観察を行った。その結果、Wave に EGFP-actin が濃縮して移動する様子が観察された (図 2C、矢頭、動画 3)。これらの結果から、Wave は培養細胞だけではなく、実際脳内でも起こる現象であることがわかった。

細胞内には豊富にアクチンが存在するため、アクチン線維に特異的に結合する Phalloidin の染色によって観察された Wave 中のアクチン線維は、単に細胞内に均一に存在するアクチン分子が局所的に重合して検出された可能性がある。そこで、mRFP-actin を培養海馬神経細胞に発現させ、アクチンモノマーとアクチン線維の両方をあわせた Total アクチンを検出した。さらに、細胞の厚みのある部分と薄い部分の補正をするために Volume Marker として CMAC を用いて共染色した (図 3A、上)。そして、mRFP-actin と CMAC の画像をそれぞれ軸索にそって細胞体から軸索先端にかけてラインスキャンを行い蛍光強度を検出したところ、Wave には mRFP-actin が濃縮して存在することがわかった (図 3A、左下)。ラインスキャンの結果から、さらに体積あたりの蛍光強度を比較したところ、Wave にはアクチンモノマーとアクチン線維をあわせた Total アクチン (mRFP-actin) が濃縮していることがわかった (図 3A、右下)。さらに、Wave にはアクチン線維だけでなくアクチンモノマーも濃縮するのかどうかを検証した。アクチンモノマーに特異的に結合する DNase I [Goor et al., 2012]、アクチン線維特異的に結合する Phalloidin、Volume marker CMAC で培養海馬神経細胞を染色し (図 3B)、さらにラインスキャンにより蛍光強度を検出した (図 3C、左)。ラインスキャンの結果をさらに Volume marker で補正すると、Wave にはアクチン線維

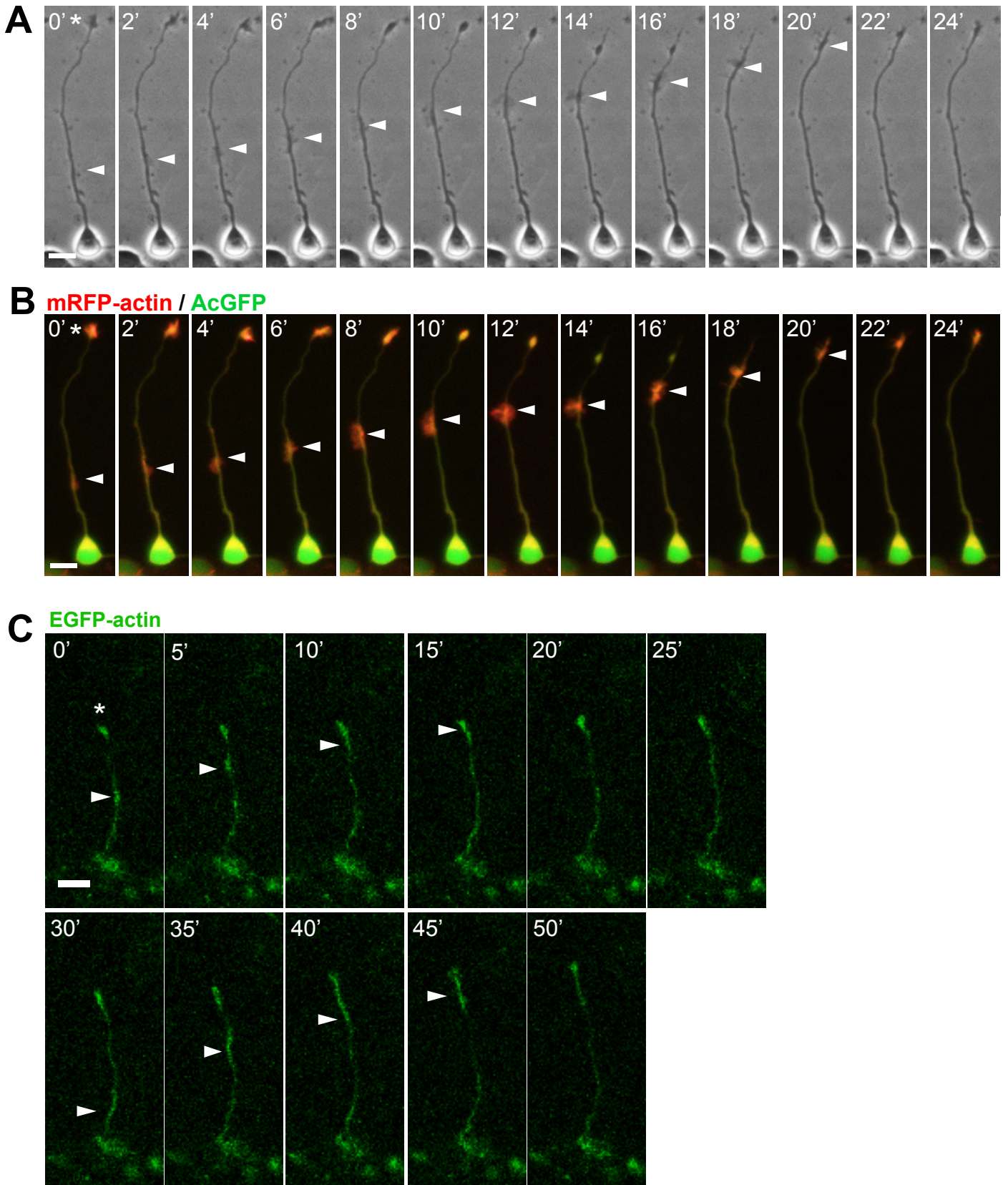


図2. アクチンはWaveに濃縮して軸索を移動する

A, B: mRFP-actinとAcGFPを発現させた海馬神経細胞で発生したWaveを2分間隔で撮影した画像。

【A】位相差画像、【B】蛍光画像(赤:mRFP-actin、緑:AcGFP)。

C: マウスの大脳培養切片内のEGFP-actinを発現させた神経細胞のWaveを5分間隔で撮影した画像。

矢頭: Wave、星印: 成長円錐。Bars: (A, B) 10 μ m, (C) 20 μ m。

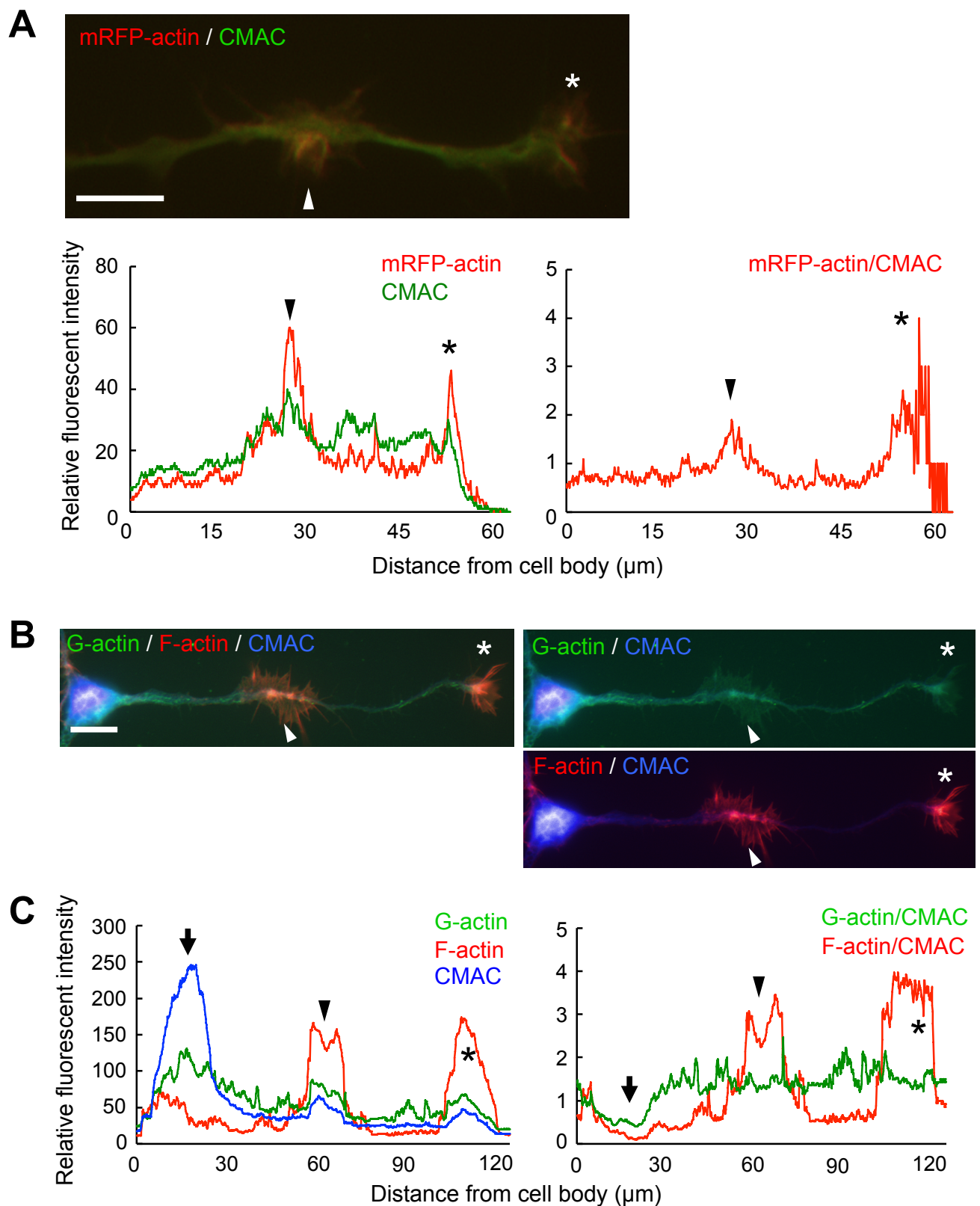


図3. アクチン分子はWaveに濃縮している

A: 【上】mRFP-actinとCMACの重ね合わせ画像。【左下】細胞体から突起先端までの蛍光強度のラインスキャン。【右下】CMAC (volume marker) に対するmRFP-actinの濃縮比率。

B: 【左】DNase I (G-actin)、Phalloidin (F-actin)、CMACの重ね合わせ画像。【右上】DNase IとCMACの重ね合わせ画像。【右下】PhalloidinとCMACの重ね合わせ画像。

C: 【左】細胞体から突起先端までの蛍光強度のラインスキャン。【右】CMAC に対するG-actinとF-actinの濃縮比率。

矢印: 細胞体、矢頭: Wave、星印: 成長円錐。Bars: 10 μm 。

は濃縮しているが、アクチンモノマーは細胞内にほぼ均一に存在することがわかった (図 3C、右)。

さらに、本当に Wave によってアクチンが輸送されているのかどうかを、Wave の到達と成長円錐に濃縮するアクチン量の関係から検証した。具体的には、Total アクチンの検出と細胞の厚さを補正をするために mRFP-actin と AcGFP を発現させた培養海馬神経細胞を用いてタイムラプス観察を行い、成長円錐における mRFP-actin の蛍光輝度を定量した。その結果、確かに Wave の到達と同時に成長円錐におけるアクチンの輝度は上昇することがわかった (図 4、矢頭)。

以上の結果から、Total アクチンおよびアクチン線維が Wave に濃縮し、軸索内を輸送されると考えられた。

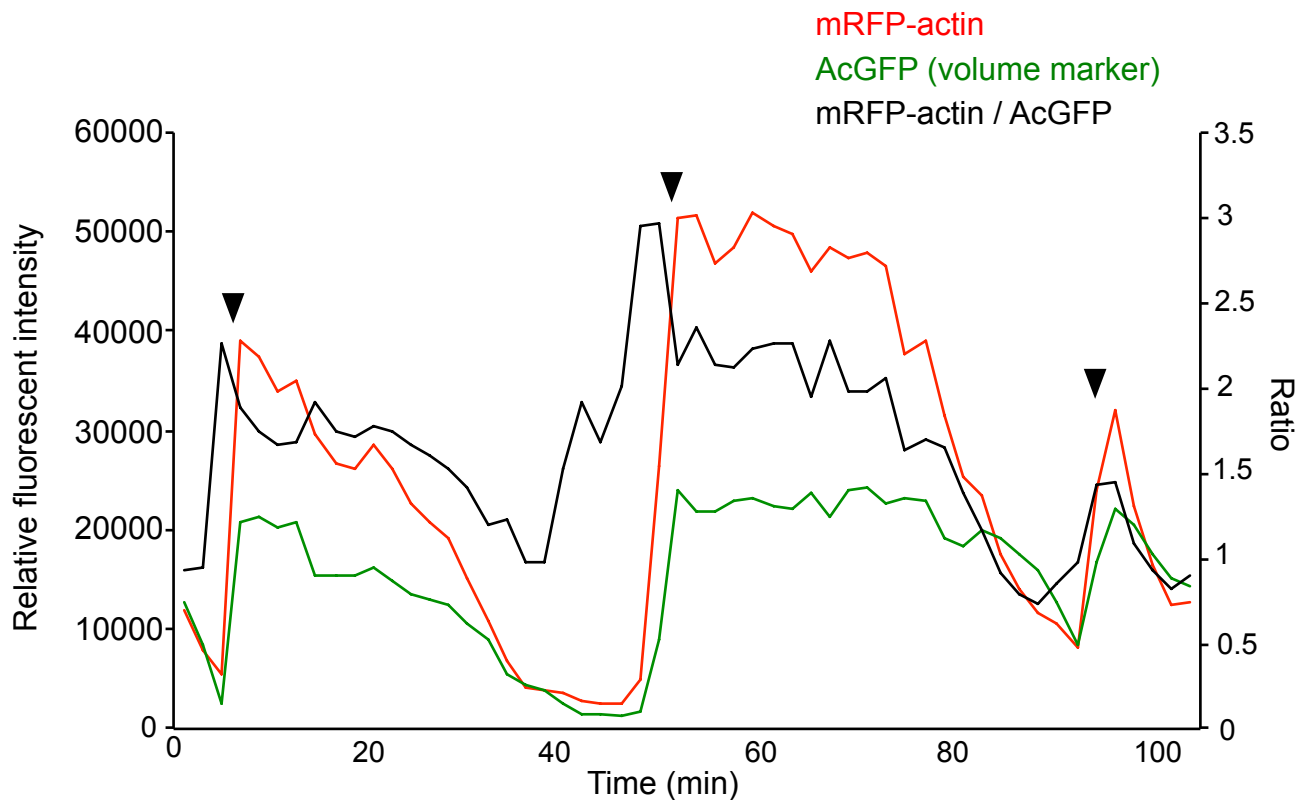


図4. Waveはアクチンを成長円錐へ輸送する

成長円錐におけるmRFP-actin (赤線)、AcGFP (緑線)の蛍光輝度とAcGFPに対するmRFP-actinの濃縮比率 (黒線)。

矢頭: Waveが成長円錐に到達した時を示す。

Wave内に存在するアクチン線維は重合・脱重合を繰り返す、そのプラス端は軸索の先端を向いている

Waveはその形態をダイナミックに変化させながら軸索を移動する。そこでまず、海馬神経細胞を Phalloidin 染色し、Wave 中のアクチン線維の軸索のシャフトに対する角度 (図 5A、黄色の扇形) を解析した。その結果、Wave 中のアクチン線維はさまざまな角度を向いていることがわかった (図 5B)。軸索の先端方向を 0 度と仮定し、Wave 内のアクチン線維の角度を計測すると、-148.5 度から 175.2 度 (n = 351) の角度で傾いていた。これらを平均すると、約 1.5 度となったことから、Wave 内のアクチン線維は軸索先端方向に傾いていることがわかった。また、アクチン線維がクラッチメカニズムによって順行性移動するためには、Wave 内のアクチン線維のプラス端が軸索の先端に向いている必要がある。Cortactin は重合したばかりのアクチン線維に優先的に結合することが知られており [Pak et al., 2008]、抗 Cortactin 抗体を用いて培養海馬神経細胞に内在する Cortactin を免疫染色したところ、Wave 内のアクチン線維のプラス端は Filopodia の先端を向いていることがわかった (図 5C、矢頭)。

移動性細胞や神経細胞の成長円錐では、Leading edge においてアクチン線維が重合・脱重合し、それに伴って進行方向とは反対向き (逆行性) にアクチン線維の移動が起こることが知られている [Katoh et al., 1999; Mallavarapu and Mitchison, 1999]。細胞内のアクチン分子は通常ブラウン運動しているため検出が困難であるが、重合して線維に取り込まれることでその動きはほぼ停止するため、蛍光標識をしたアクチンを発現させた細胞では、アクチン分子が重合すると光の斑点 (Speckle) として検出することができる [Watanabe and Mitchison, 2002; Shimada et al., 2008]。そこで、mRFP-actin を発現させた海馬神経細胞の Wave におけるアクチン線維の重合の様子を細胞内一分子計測によって解析した。その結果、Wave では Filopodia の先端で mRFP-actin の Speckle が出現し、根元に向かって移動する様子が観察された (図 5D、黄破線、動画 4)。このことは、アクチン分子がアクチン線維の Filopodia の先端側で取り込まれ、それに伴ってアクチン線維が逆行性に移動することを示している。

この結果と、Wave 内のアクチン線維は軸索の先端方向に傾いていることから、Wave 内のアクチン線維はプラス端が軸索の先端方向を向いていて、アクチン線維がダイナミックに重合・脱重合を繰り返すと考えられた。

アクチン線維の重合を変化させると Wave の移動速度もそれに応じ変化する

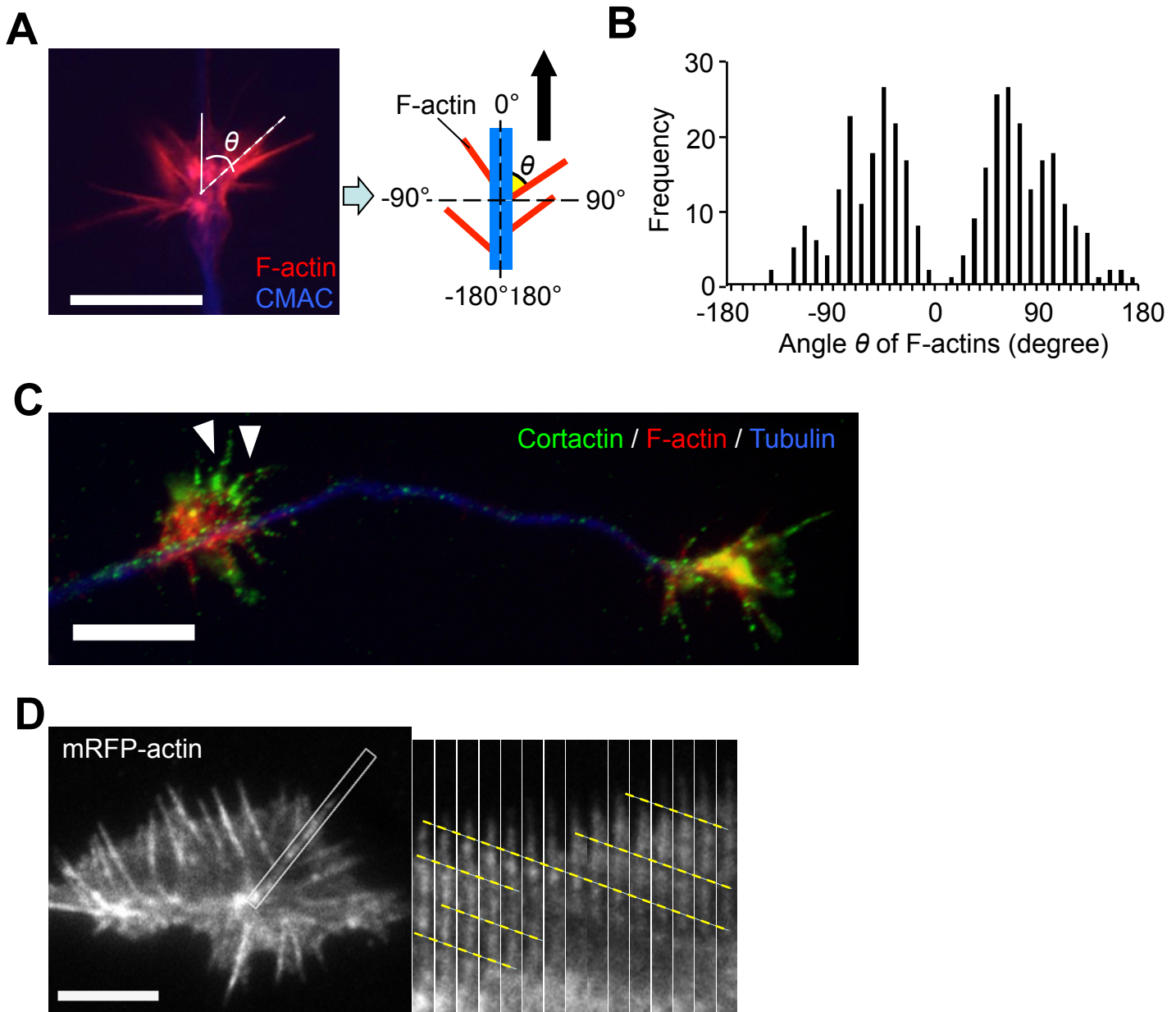


図5. Wave 内のアクチン線維は方向性を持った重合・脱重合を繰り返す

A: 【左】WaveのPhalloidin (F-actin)染色画像、【右】F-actinの角度解析の模式図。黒矢印:成長円錐の方向、黄色扇形:アクチン線維の軸索に対する進行方向へ傾きの角度。

B: Wave内のアクチン線維の進行方向への傾き角度のヒストグラム。

C: 抗Cortactin抗体、Phalloidin、抗チューブリン抗体による染色の重ね合わせ画像。白矢頭: Wave内のアクチン線維の先端に結合したCortactin。

D: WaveにおけるmRFP-actinの細胞内一分子計測像。白四角中のSpeckleの軌跡(黄破線、5秒間隔で撮影)。

Bars: (A, C) 10 μm , (D) 5 μm 。

我々のモデルでは、Wave 内の細胞外基質につなぎとめられたアクチン線維は、重合と脱重合を繰り返すことによって前進する（図 1、動画 1）。そこで、アクチン線維の重合を抑制・促進した際の影響について検証した。

a) アクチン線維の重合を抑制するとアクチン線維の移動速度は遅くなる

まず初めに、海馬神経細胞にアクチン線維の重合阻害剤であるサイトカラシンを添加した際に Wave の移動に変化が生じるかどうかを調べた。サイトカラシンはアクチン線維の重合端をキャッピングすることにより、アクチンの重合を阻害する [Goddette and Frieden, 1986; Sampath and Pollard, 1991]。先行研究により、サイトカラシンは高濃度で加えると成長円錐や Wave の消失を引き起こすことがわかっている [Ruthel and Banker, 1998]。本研究ではサイトカラシン B を 0.05 μM 、0.1 μM 、0.2 μM の Wave が消失しない程度の低濃度で加え、同一神経細胞においてサイトカラシン B の添加前と添加後に発生した Wave の速度を定量解析した。その結果、サイトカラシン B を 0.05 μM 添加した神経細胞では、添加前の $1.81 \pm 0.04 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 93$) に対し、添加後は $1.11 \pm 0.04 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 107$) と有意に Wave の移動が遅くなることがわかった（図 6A、図 6B、左）。同様に 0.1 μM 添加では $1.72 \pm 0.08 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 46$) から $0.93 \pm 0.06 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 50$) へ、0.2 μM 添加では $1.84 \pm 0.06 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 56$) から $0.88 \pm 0.06 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 41$) へと、すべての濃度条件下でサイトカラシン B 添加後に Wave の移動速度が減少し、その速度の減少はサイトカラシン B の濃度依存的であった（図 6B、右）。また、1 μM 以上の濃度でサイトカラシン B を加えると Wave が出現しなくなった。コントロールとしてサイトカラシン B の代わりに DMSO を加えた細胞では、Wave の移動速度の変化は見られなかった。

さらに、アクチン線維の重合端に結合し、アクチン重合を促進する分子である Formin に対する阻害剤 SMIFH2 [Nolen et al., 2009]、アクチン重合核を形成し、新しいアクチン繊維の形成や枝分かれに関与する分子である Arp2/3 に対する阻害剤 CK666 [Rizvi et al., 2009] を用いて、サイトカラシンと同様に Wave の移動速度を解析した。SMIFH2 は終濃度 5 μM 、CK666 は終濃度 100 μM で添加した。その結果、SMIFH2 を添加した神経細胞では、添加前 $2.99 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 142$) に対して、添加後は $1.88 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 158$) と有意に Wave の移動速度は遅くなった（図 7A）。また、CK666 を添加した神経細胞においても、添加前 $3.21 \pm 0.12 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 38$) に対し、添加後 $2.18 \pm 0.14 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 29$) と有意に Wave の移動速度は遅くなった（図 7B）。これらのコントロールとして阻害剤の代わりに DMSO を添加した細胞では Wave の移動速度に変化は見られなかった。

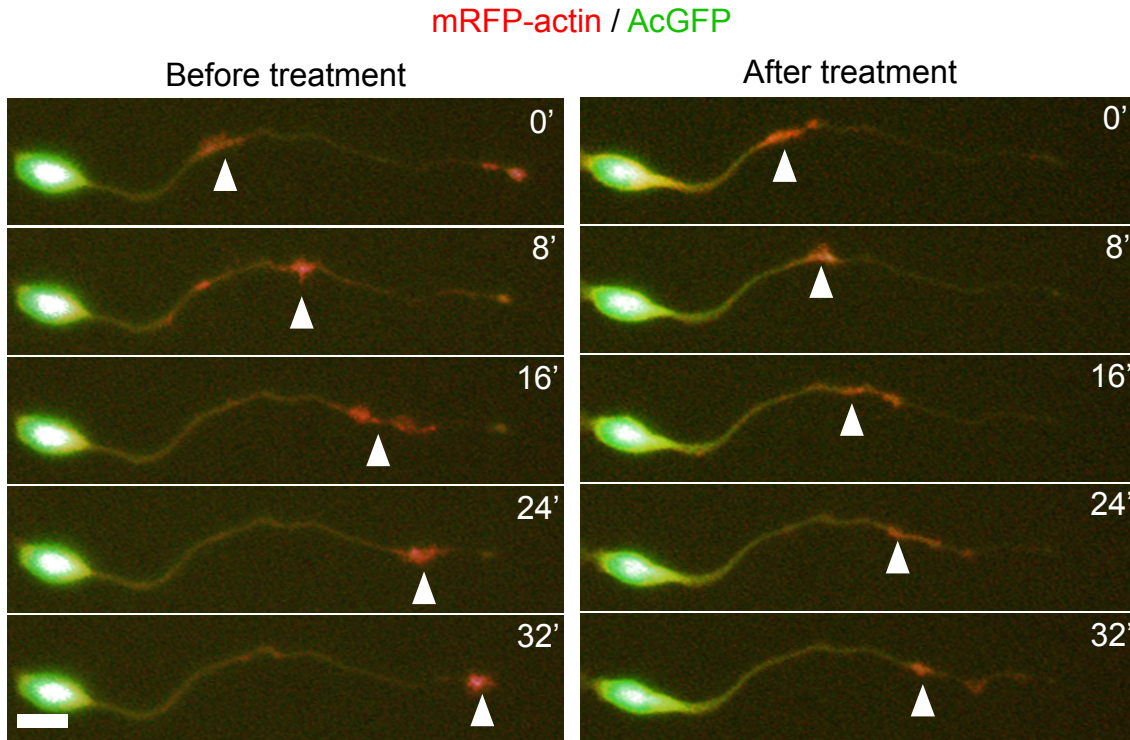
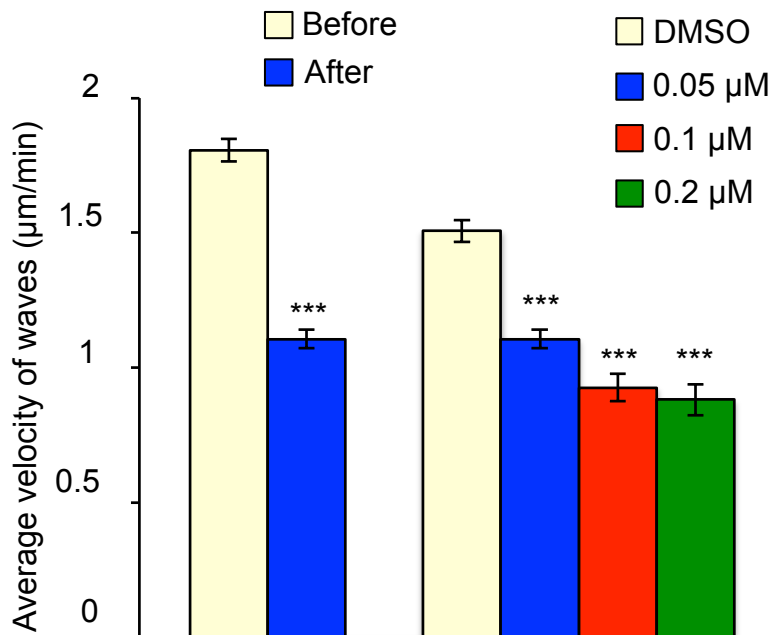
A**B**

図6. アクチン重合を阻害するとWaveの移動は阻害される

A: mRFP-actinとAcGFPを発現させた培養海馬神経細胞で発生したWaveを8分おきに撮影した画像。

【左】サイトカラシンB添加前、【右】サイトカラシン添加後。白矢頭: Wave。

B: 【左】サイトカラシンB添加前と添加後(0.05 µM)のWaveの移動速度の変化。【右】サイトカラシンB濃度依存的なWaveの移動速度変化(Control: DMSO、サイトカラシンB: 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM)。

Bar: 10 µ, Error bars: SE, ***: P<0.001。

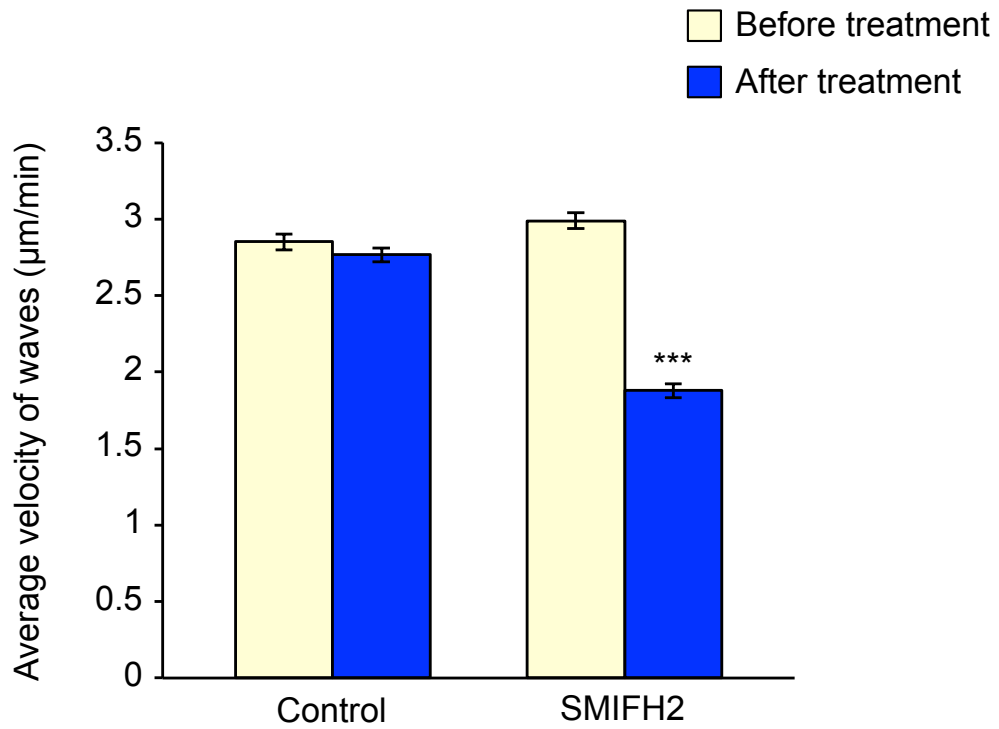
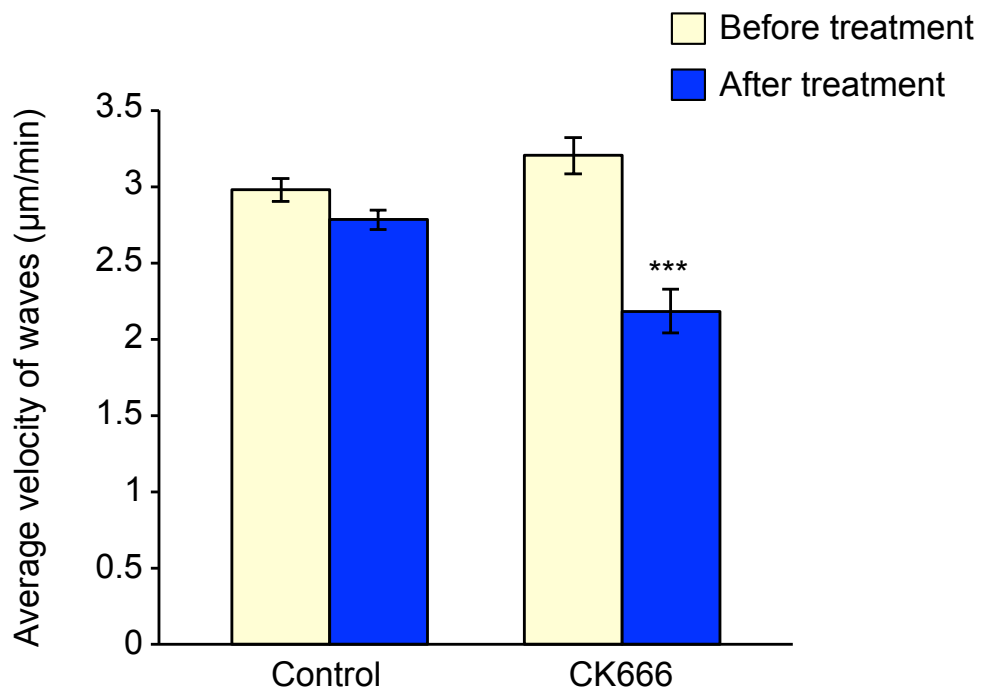
A**B**

図7. アクチン重合の制御分子を阻害するとWaveの移動は阻害される
A: SMIFH2添加前と添加後(5 µM)のWaveの移動速度の変化。
B: CK666添加前と添加後(100 µM)のWaveの移動速度の変化。
Error bars: SE, ***: P<0.001。

b) アクチン線維の重合を促進させるとアクチン線維の移動速度は速くなる

アクチン線維の重合によって Wave 内のアクチン線維が進むのであれば、アクチン線維の重合を促進すれば Wave の移動も促進されるはずである。アクチン結合タンパク質のひとつである Cofilin は、LIM-kinase によってリン酸化、Slingshot によって脱リン酸化され、脱リン酸化状態で活性化する。活性化した Cofilin はアクチン線維を切断し、アクチンモノマーの産生を促進する。その結果アクチンモノマープールが増大し、アクチン重合が促進される [Endo et al., 2003]。そこで、Cofilin の恒常活性型変異体 (S3A 変異体) を神経細胞に発現させ、影響を調べた。まず、細胞内一分子計測により Wave 内におけるアクチン線維の逆行性移動速度を計測した。その結果、コントロール細胞では $4.35 \pm 0.25 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 86$)であったのに対し、Cofilin の恒常活性型変異体を発現させた神経細胞では、 $5.31 \pm 0.21 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 96$)と、コントロール細胞と比べて Wave 内のアクチン線維の逆行性移動速度が速くなることがわかった (図 8B、左)。次に、Wave 内におけるアクチン線維の重合速度を計測した。具体的には、単位時間当たりの Filopodia 先端の伸長距離とアクチン Speckle の移動距離の和からアクチン線維の重合速度を求めた (図 8A)。その結果、コントロール細胞では $1.05 \pm 0.21 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 54$)であったのに比べて、Cofilin の恒常活性型変異体を発現させた神経細胞では $1.85 \pm 0.18 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 86$)と速くなることがわかった (図 8B、中央)。さらに、Wave 自体の移動速度も Control 細胞 $2.1 \pm 0.13 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 34$)に対し、恒常活性型を発現させた細胞では $2.62 \pm 0.12 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 38$)と速くなった (図 8B、右)。

以上の結果から、Wave におけるアクチン線維の移動にはアクチン線維の重合が関与することが示唆された。

Shootin1 は Wave 内でアクチン線維とダイナミックに相互作用する

当研究室で同定された軸索形成分子 Shootin1 は、神経軸索先端の成長円錐においてクラッチ分子として、アクチン線維と細胞接着分子 L1-CAM の間を仲介してつなぎとめることによってアクチン線維のプラス端方向への前進を引き起こし、軸索伸長に必要な力を生み出すと考えられている [Shimada et al., 2008]。また、興味深いことに Shootin1 は Wave の移動に伴って軸索を移動することが報告されている [Toriyama et al., 2006; 2010]。実際に mRFP を融合させた Shootin1 と細胞のボリュウムマーカとして AcGFP を培養海馬神経細胞に発現させ、タイムラプス観察を行ったところ、確かに

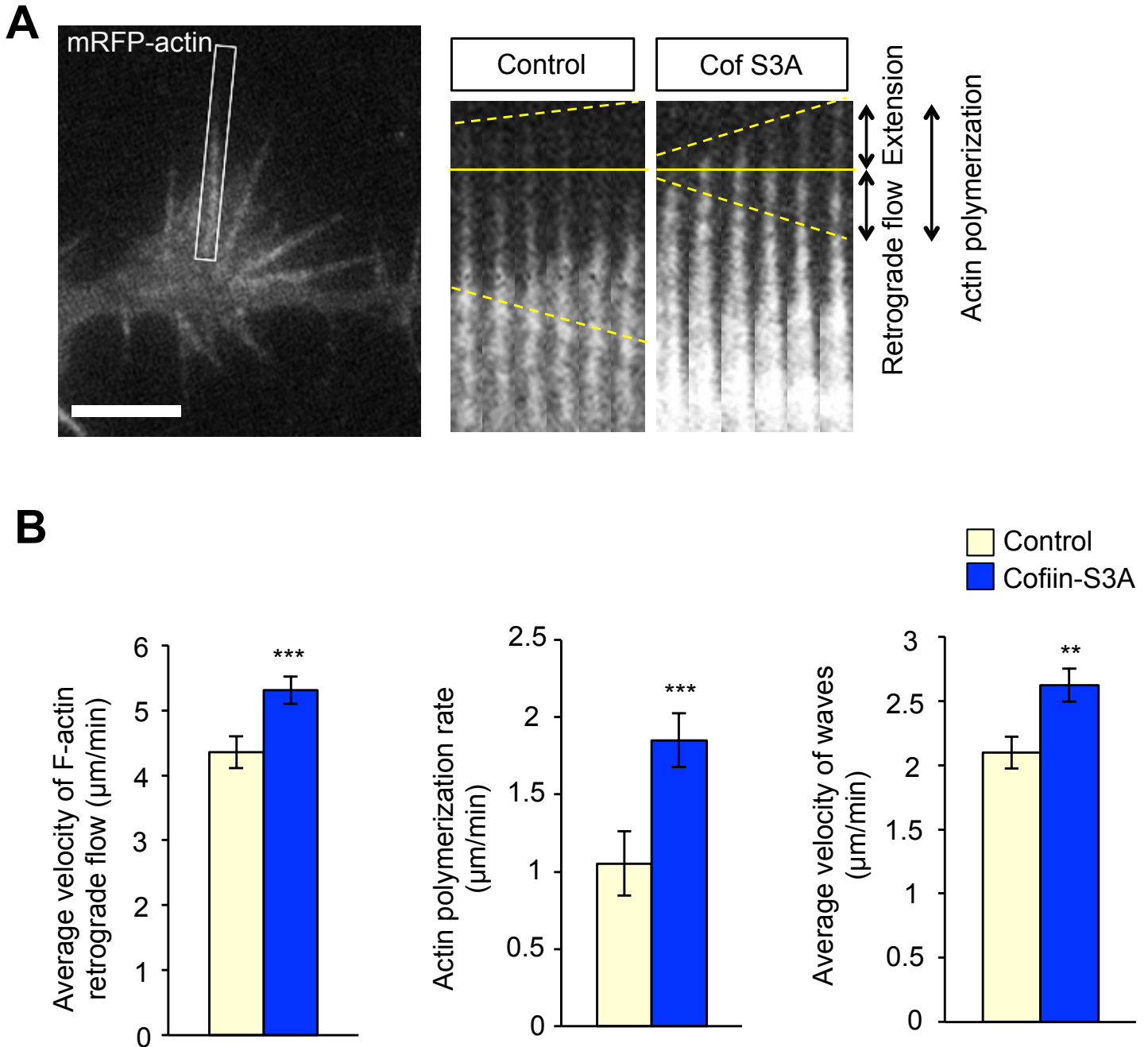


図8. アクチン重合を促進するとWaveの移動は促進される

A: mRFP-actinを発現させた培養海馬神経細胞で発生したWaveの細胞内一分子計測画像。黄破線: 突出するFilipodiaの先端と逆行性移動するSpeckle。

B: Cofilinの恒常活性型変異体(S3A)を発現させた神経細胞における【左】Wave内のアクチン線維の逆行性移動速度、【中央】Wave内のアクチン線維の重合速度、【右】Waveの移動速度。

Bar: 5 μm, Error bars: SE, **: P<0.01, ***: P<0.001。

mRFP-shootin1 が Wave に濃縮して移動する様子が観察された (図 9A、白矢頭) そこで、海馬神経細胞の Wave における Shootin1 の局在を、抗 Shootin1 抗体を用いた免疫染色によって解析した (図 9B、白矢頭)。また、Wave にはアクチン線維が豊富に存在しているため [Ruthel and Banker, 1998]、Phalloidin によるアクチン線維の染色も同時に行った。その結果、Shootin1 は Wave 内のアクチン線維に沿って局在することがわかった (図 9B、黄色矢頭)。さらに、Shootin1 は成長円錐においてリン酸化されることでクラッチ分子として機能するが [Toriyama et al., 2013]、Wave 内においても成長円錐と同様にリン酸化 Shootin1 が存在していた (図 9C)。

また、EGFP-shootin1 を発現させた神経細胞の Wave において、細胞内一分子計測を行ったところ、アクチンと同様に逆行性移動する Speckle が観察された (図 10A、黄破線、動画 5)。さらに、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D を添加すると、逆行性ト移動する Shootin1 の Speckle の動きは停止した (図 10B、黄破線、動画 6)。これらは、Shootin1 が逆行性移動するアクチン線維とダイナミックに相互作用することを示している。これらのことから、Shootin1 が成長円錐同様 Wave 内においてもクラッチ分子として機能する可能性が示唆された。

Shootin1 によるクラッチ効率を変化させるとアクチン線維の移動速度も変化する

これまでの結果から、Wave 内の Shootin1 がアクチン線維とダイナミックに相互作用すること、アクチン線維が方向性を持つ重合・脱重合を繰り返すこと、また、アクチン線維の重合がアクチン線維の移動に重要であることがわかった。これらのデータは本研究で想定するクラッチモデルを支持するが、分子クラッチが Wave の輸送を担うのであれば、クラッチの効率を変化させれば Wave の移動速度に変化が生じるはずである。そこで次に、Shootin1 によるクラッチ効率を変化させた海馬神経細胞における Wave の移動速度を解析した。

a) Shootin1 のクラッチ効率を減少させるとアクチン線維の移動速度は遅くなる

まず、クラッチ効率を減少させ Wave の移動速度が変化するのかどうかを調べた。

具体的には、神経細胞に Shootin1 に対するターゲット配列の異なった microRNA (miRNA) ベクター #1~#3 を発現させ、Shootin1 のノックダウンを行った。まず、Shootin1 miRNA ベクター #1、2 を発現させ Shootin1 を

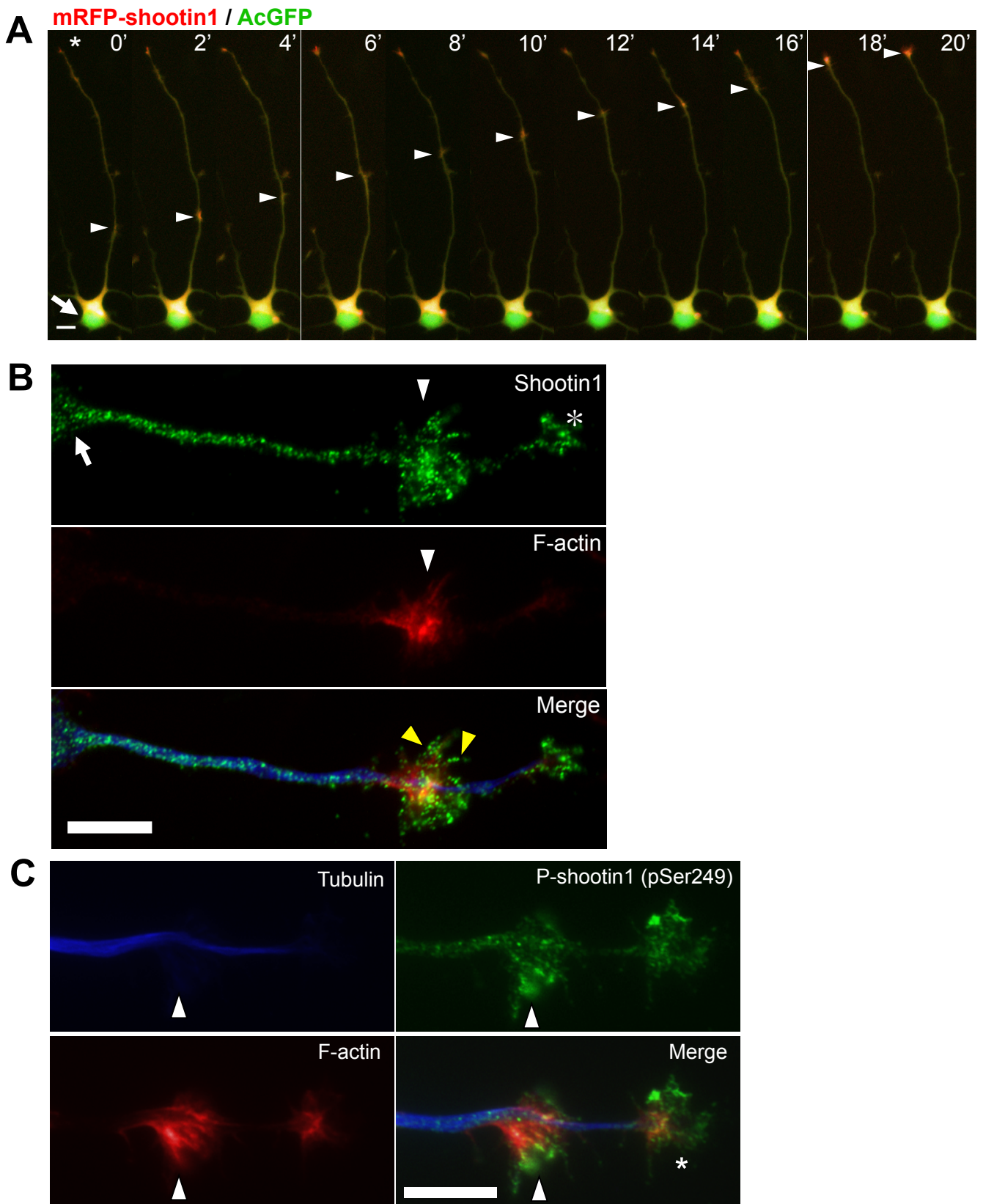


図9. Shootin1はWave内のアクチン線維に沿って局在する

A: mRFP-shootin1とAcGFPを発現させた神経細胞を2分間隔で撮影した画像。

B: 上から、抗Shootin1抗体による免疫染色画像(緑色)、Phalloidin染色画像(赤色)、重ね合わせ画像(青色: Tuj1抗体によるβIII-Tubulinの染色画像)。

C: 抗リン酸化Shootin1抗体による染色画像(緑色)、Phalloidin染色画像、抗βIII-Tubulin抗体による染色画像(青色)、重ね合わせ画像。

矢印: 細胞体、矢頭: Wave、星印: 成長円錐。Bars: 10 μm。

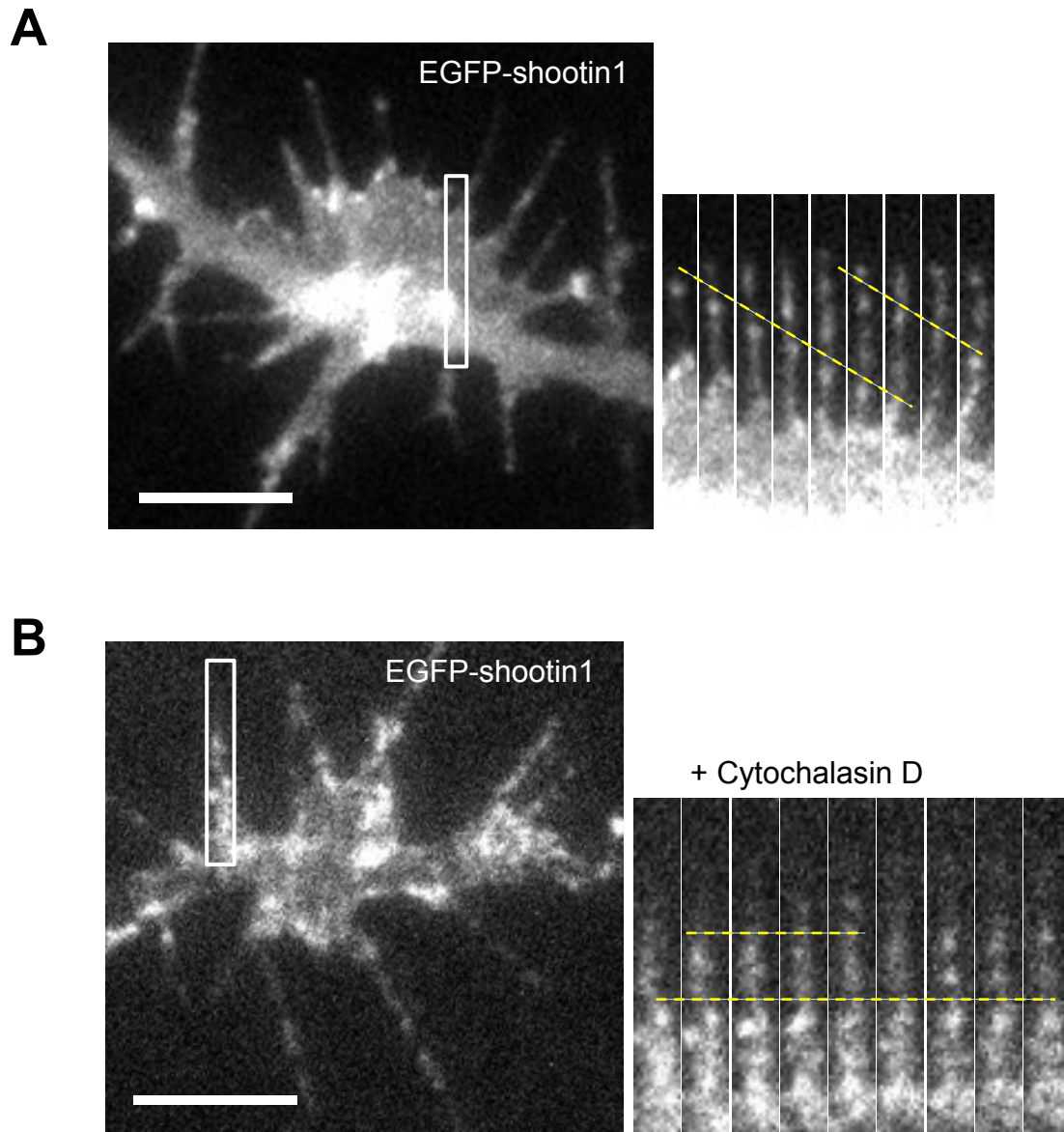


図10. Shootin1はWave内のアクチン線維とダイナミックに相互作用する

A: WaveにおけるEGFP-shootin1の細胞内一分子計測像。白四角中のSpeckleの軌跡(黄破線、5秒間隔で撮影)。
 B: サイトカラシンDを添加したEGFP-shootin1の一分子計測画像。白四角中のSpeckleの軌跡(黄破線、5秒間隔で撮影)。
 Bars: 5 μ m。

ノックダウンした神経細胞における Wave 内のアクチン線維の逆行性移動速度を解析したところ、コントロール細胞では $3.37 \pm 0.33 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 17$)であったのに対し、Shootin1 の発現が抑制された細胞では #1 : $5.12 \pm 0.28 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 16$)、#2 : $4.74 \pm 0.24 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 27$)と、有意に速くなった (図 11A)。これは、Shootin1 の発現抑制により、アクチン線維と細胞外基質との間にスリップが生じていることを示している (図 11C、左、動画 7)。さらに、miRNA ベクター #1~3 を発現させ Shootin1 の発現が抑制された神経細胞における Wave の移動速度を解析したところ、コントロール miRNA ベクターを発現させた細胞では Wave の速度が $1.61 \pm 0.12 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 17$)であったのに対し、Shootin1 の発現が抑制された細胞では、#1 : $1.02 \pm 0.06 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 22$)、#2 : $0.82 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 28$)、#3 : $0.85 \pm 0.06 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 28$)と、顕著に Wave の輸送速度が減少することがわかった (図 11B、左)。

これらの結果から、Shootin1 をノックダウンすることでクラッチ効率を減少させると、アクチン線維と細胞外基質との間にスリップ生じ、その結果、Wave 自体の移動速度も遅くなることがわかった。

b) Shootin1 のクラッチ効率を増加させるとアクチン線維の移動速度は速くなる

反対に、クラッチ効率を増加させる方法として EGFP-Shootin1 を海馬神経細胞に過剰発現させ、Wave の移動速度を解析した。その結果、EGFP の空ベクターを過剰発現させたコントロール細胞では Wave の移動速度が $1.65 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 246$)であったのに対し、EGFP-Shootin1 を過剰発現させた細胞 (図 11C、右) では $1.78 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 229$)と若干ではあるが有意に速くなることがわかった (図 11B、右)。

c) Netrin1 刺激により Shootin1 のクラッチ効率を増強するとアクチン線維の移動速度は速くなる

成長円錐において、クラッチ分子 Shootin1 は軸索ガイダンス分子 Netrin1 の下流で Pak1 によるリン酸化を受け、クラッチを増強することがわかっている [Toriyama et al., 2013] (図 12A)。そこで、Netrin1 の刺激により Wave の移動速度に変化が生じるかどうかを検証した。まず、mRFP-actin を発現させ、さらに Netrin1 またはコントロールとして BSA を添加した神経細胞における Wave 内のアクチン線維の逆行性移動速度を計測した。その結果、コントロール細胞 $3.78 \pm 0.10 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 23$)に対し、Netrin1 刺激した神経細胞では $2.74 \pm 0.13 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 15$)と Wave 内のアクチン線維の逆行性移動速度は遅いことがわかった (図 12B)。さらに、同様に刺激を行い、Wave 自

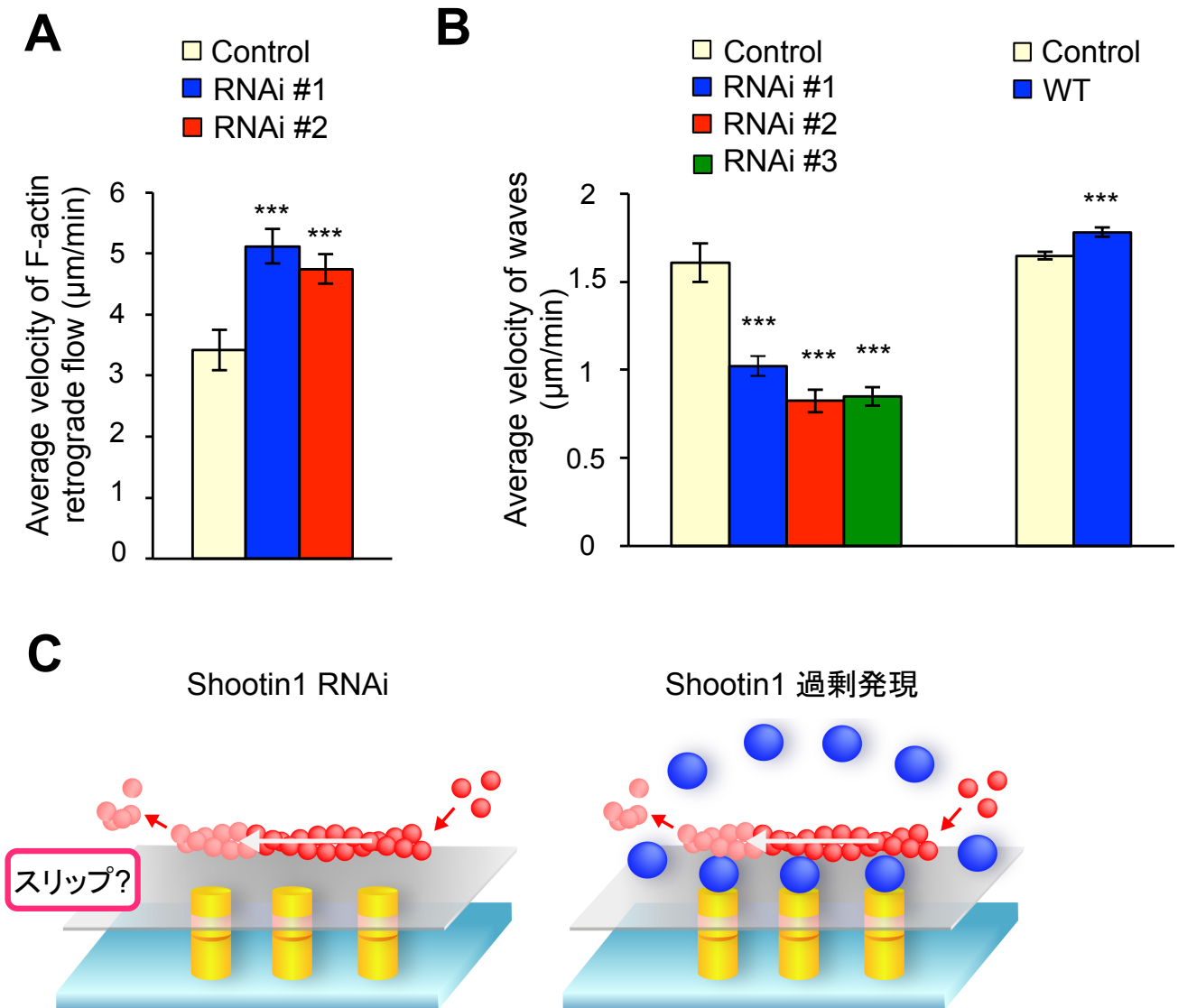


図11. Shootin1を介したアクチン線維と細胞外基質との連結を変化させるとWaveの移動速度も変化する

A: Shootin1をRNAi(#1~2)した神経細胞におけるWave内のアクチン線維の逆行性移動速度。

B: 【左】Shootin1をRNAi(#1~3)した神経細胞、【右】Shootin1のWTを過剰発現した神経細胞におけるWaveの移動速度。

C: 【左】Shootin1をRNAiした場合と【右】Shootin1を過剰発現した場合のWave内におけるアクチン線維と細胞外基質の連結変化の模式図。

Error bars: SE, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。

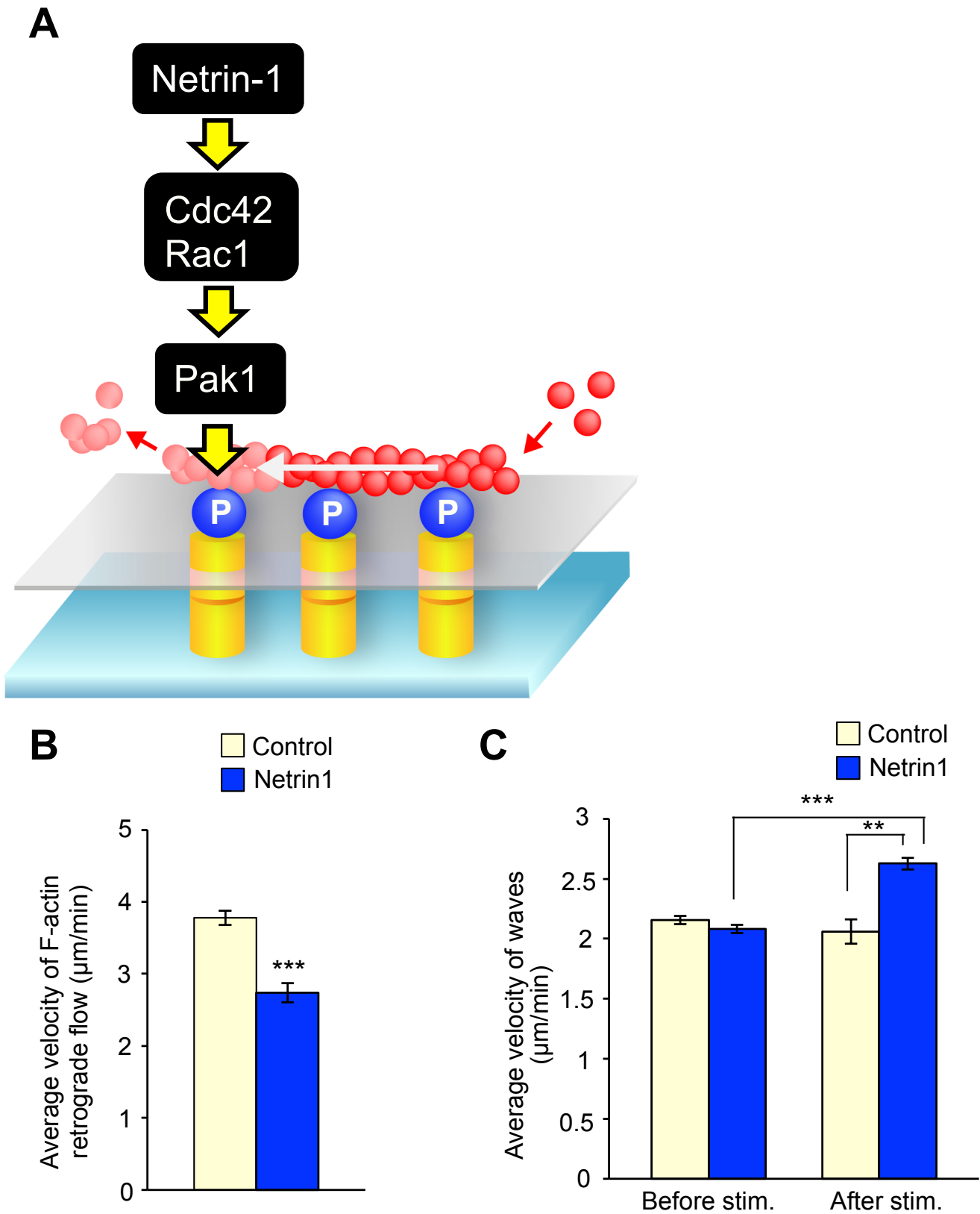


図12. Netrin1刺激によりクラッチを増強するとWaveの移動速度は速くなる

A: Netrin1刺激した場合のShoottin1のリン酸化経路の模式図。

B: Netrin1またはBSA(コントロール)刺激した神経細胞におけるWave内のアクチン線維の逆行性移動速度。

C: Netrin1またはBSA刺激した神経細胞におけるWaveの移動速度。

Error bars: SE, **: P<0.01, ***: P<0.001。

体の移動速度を計測した。その結果、コントロール細胞では刺激前 $1.67 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 118$)、刺激後 $1.60 \pm 0.10 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 139$)と変化なかったのに対し、Netrin1 刺激した神経細胞では刺激前 $1.61 \pm 0.04 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 102$)、刺激後 $2.04 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 77$)と Wave の移動速度は有意に速くなることがわかった (図 12C)。

以上、Shootin1 のノックダウンによってクラッチ効率を減少させると Wave の移動速度が減少し、逆に Shootin1 の過剰発現によってクラッチ効率を増加させると Wave の移動速度が僅かに増加したことから、Wave によるアクチン線維の輸送速度は Shootin1 の発現量調節によるクラッチの効率の増減に伴って変化することが示唆された。また、Netrin1 刺激によりクラッチを増強すると、Wave の移動速度は速くなることがわかった。さらに、Shootin1 のノックダウンと Netrin1 刺激の結果から、クラッチ効率を減少させると Wave 内でアクチン線維と細胞外基質との間にスリップが生じ、反対にクラッチを増強するとアクチン線維と細胞外基質との間の滑りが減少することがわかった。

L1-CAM 特異的な細胞外基質への結合を弱めると Wave の移動は遅くなる

我々のクラッチモデルでは、細胞接着分子 L1-CAM が軸索先端方向に重合してゆくアクチン線維の細胞外基質へのつなぎとめに関与する (図 1、動画 1)。これまでの研究から L1-CAM は神経細胞において、Shootin1 と相互作用することがすでに見出されている [Shimada et al., 2008; 馬場未発表データ]。

そこで、L1-CAM のアクチン線維の移動への関与を調べた。まず、抗 L1-CAM 抗体を用いた免疫染色によって、培養海馬神経細胞における L1-CAM の局在を解析したところ、Wave にも L1-CAM が豊富に存在することがわかった (図 13A、矢頭)。L1-CAM 同士はホモフィリックに結合する性質を有している [Lemmom et al., 1989]。これまでの実験では、L1-CAM をコートした培養皿上に海馬神経細胞を培養することで、細胞膜上に存在する L1-CAM と培養皿上の L1-CAM 同士が結合させ、アクチン線維を細胞外につなぎ止めてきた。したがって、L1-CAM をコートしていない培養皿上では L1-CAM が結合しないため、アクチン線維はスリップして前進しにくくなるのではないかと考えた (図 13B)。そこで、L1-CAM でコートした培養皿と L1-CAM でコートしていない培養皿として PDL コートの培養皿を用

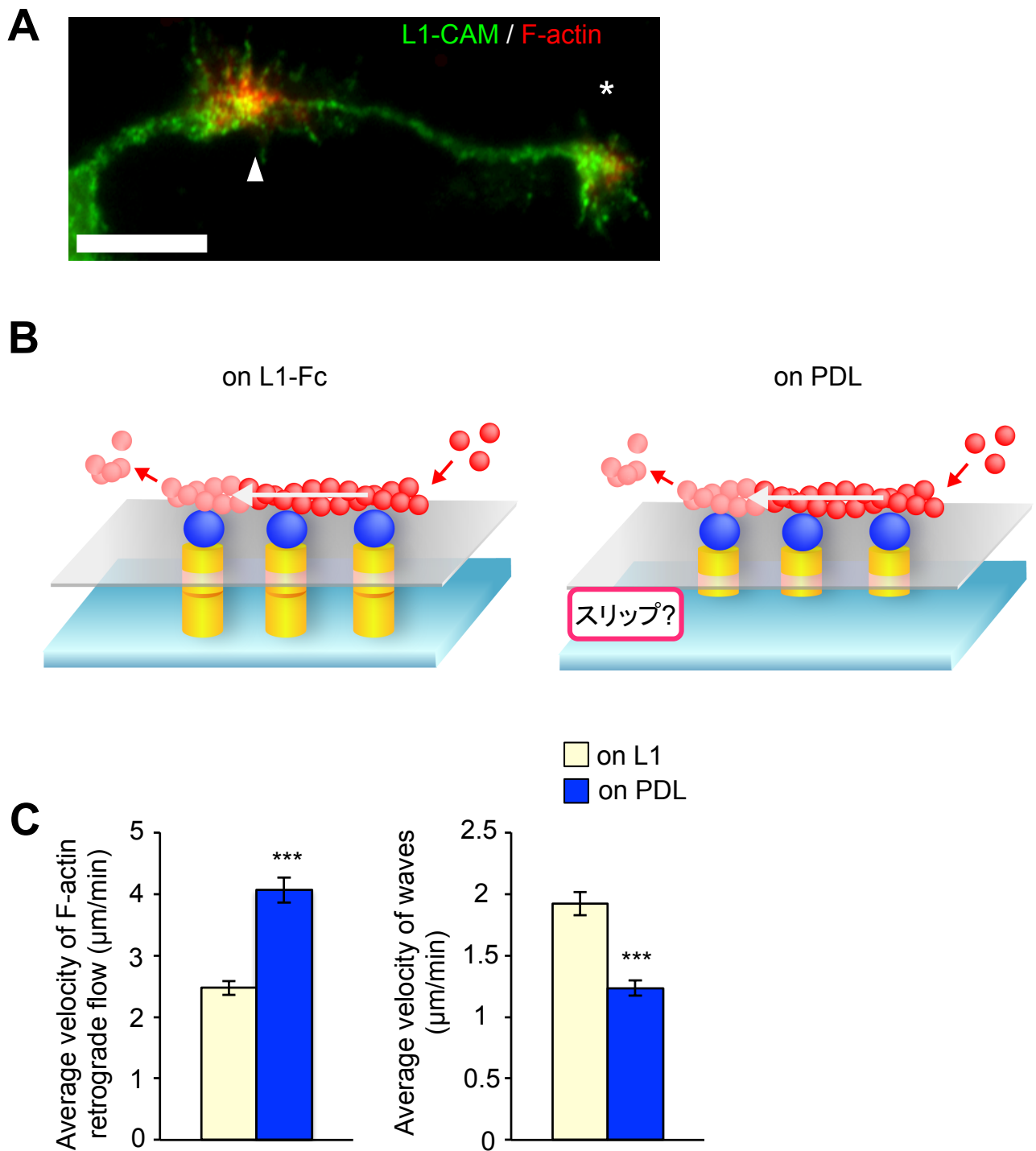


図13. L1を介したアクチン線維と細胞外基質との連結を変化させるとWaveの移動速度も変化する

A: 抗L1抗体(緑色)とPhalloidin(赤色)による染色画像。矢頭: Wave、星印: 成長円錐。

B: 【左】L1コート上で培養した場合と【右】PDLコート上で培養した場合のWave内におけるアクチン線維と細胞外基質の連結変化の模式図。

C: 【左】L1コート上で培養した神経細胞とPDL上で培養した神経細胞におけるWave内のアクチン線維のトレッドミル速度。【右】L1コート上で培養した神経細胞とPDL上で培養した神経細胞におけるWaveの移動速度。

Bar: 10 μm , Error bars: SE, ***: $P < 0.001$ 。

意した。そして、それぞれの培養皿上に EGFP-actin を発現させた海馬神経細胞を培養し、細胞内一分子計測によってアクチン線維の逆行性移動の速度を解析した。その結果、予想通り L1-CAM コートでは $2.34 \pm 0.14 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 54$)、PDL コートでは $3.85 \pm 0.24 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 18$)と、PDL コートの培養皿上のほうがアクチン線維の移動の速度が速くなることがわかった(図 13C、左)。

また、同様にコーティングした培養皿に海馬神経細胞を培養し、Wave の移動速度を解析したところ L1-CAM コートでは $1.92 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 44$)、PDL コートでは $1.23 \pm 0.06 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 54$)と、PDL コートのみの培養皿上のほうが有意にアクチン線維の輸送速度が遅かった(図 13C、右)。

これらの結果は、L1-CAM 特異的な細胞外基質へのつなぎ止めが弱まったために、Wave 内のアクチン線維の逆行性移動にスリップが生じ、その結果 Wave 自体の移動速度が遅くなったことを示唆している。これらのことより、L1-CAM はアクチン線維と細胞外基質との連結を介在することで、Wave の移動に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

Wave は基質依存的に移動し、軸索伸長に必要な軸索輸送を担う

本研究のモデルでは、Wave は基質依存的に移動すると考えている。そこで、Wave の移動の基質依存性を検証するために、軸索の途中に部分的に非接着性のストライプ領域を持つように加工を施した基質を作成した。具体的には、培養皿上に薄いフィルムを貼り付け、フェムト秒レーザーを用いて約 $15 \mu\text{m}$ 幅のストライプ状の切り取り線の加工を施した。そして、そのフィルムを L1-CAM でコートした上に神経細胞を培養し、軸索が伸長した後にストライプ部分のフィルムを引き抜くことで、軸索の途中に Wave が細胞外基質に接着できない非接着性のストライプ領域を作成した(図 14A)。この加工により、Wave はストライプ領域より先へは進めないと考えた。実際に、AcGFP-actin を発現させた神経細胞をストライプの切り込みを加工したフィルム上に培養し、軸索伸長後にストライプ領域のフィルムを引き抜き、Wave がストライプ領域を通過できるかどうかを観察した。その結果、非接着性のストライプ領域を通過する Wave (図 14B) と、ストライプ領域を通過できずに移動が停止する Wave (図 14C) が観察された。また、ストライプ領域を通過した Wave の中にはサイズが小さくなるものも観察された。そこで、ストライプ領域における Wave の移動を、通過したもの、通過したがサイズが小さくなったもの、移動が停止したものの三種類に分類し、それらの割合を調べた。その結果、コントロールの切り取り線加工のみで

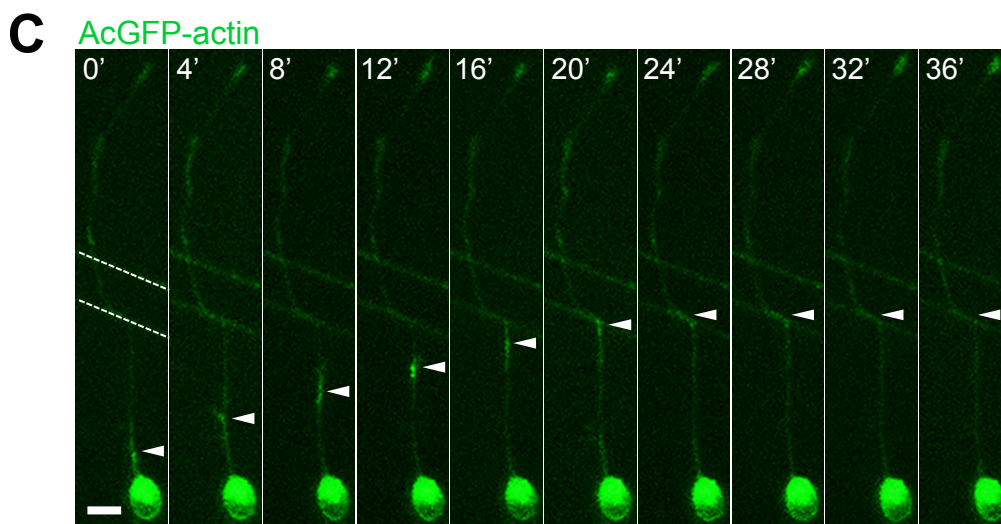
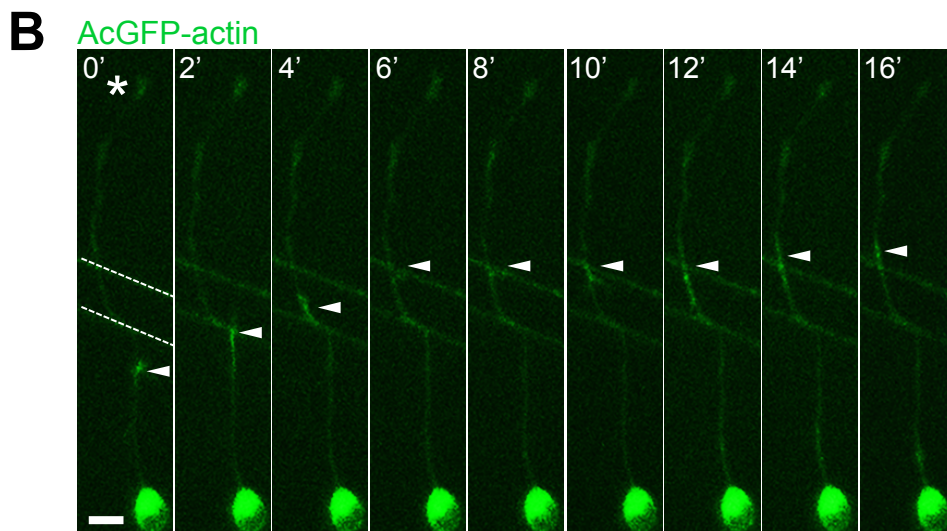
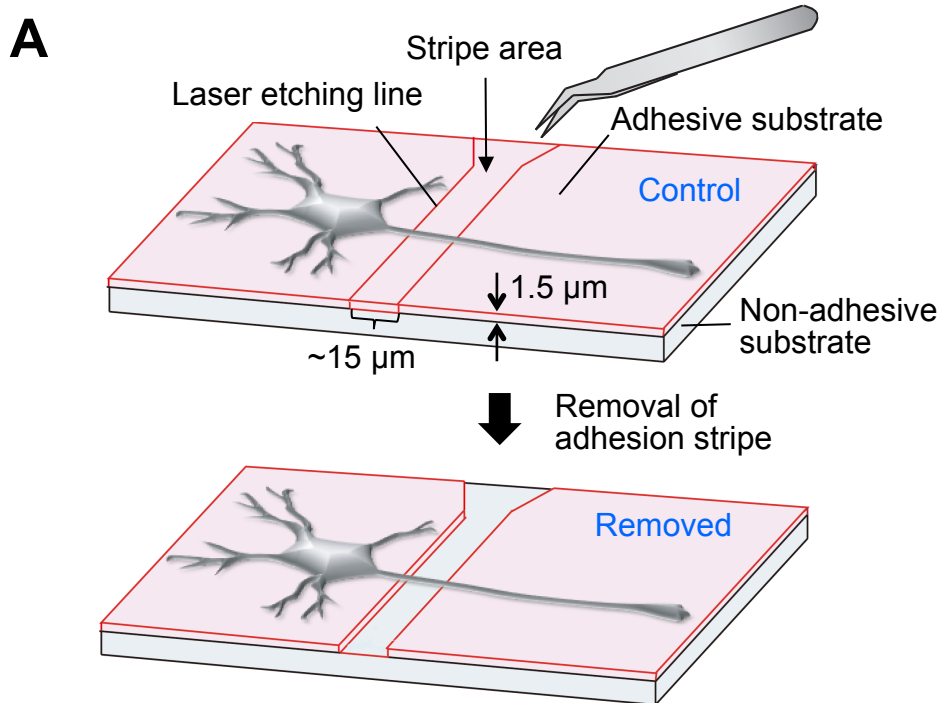


図14. Waveは基質依存的に移動する

A: 軸索伸長後に軸索の一部に非接着性のストライプ領域を加工した基質の模式図。

B、C: AcGFP-actinを発現させ、ストライプ加工した基質上に培養した神経細胞を4分間隔で撮影した画像。

【B】非接着性ストライプ領域を通過したWave、【C】非接着性ストライプ領域で停止したWave。

矢頭: Wave, Bar: 10 μm ,

フィルムを引き抜いていない基質上の神経細胞と比べて、フィルムを引き抜いた基質上の神経細胞の軸索では、移動が停止する Wave の割合が増加することがわかった (図 15A)。また、非接着性のストライプ領域を通過した Wave は、コントロールと比べてサイズが小さくなる傾向が見られた。

さらに、Wave は軸索伸長に必要なタンパク質群を輸送していると考えられるため、非接着性ストライプ領域により Wave の移動を阻害した際の軸索伸長を計測した (図 15B)。その結果、コントロールと比べてストライプ領域のフィルムを引き抜いた神経細胞の軸索は伸長が有意に遅くなることがわかった (図 15C)。

以上の結果から、Wave の移動は細胞外基質に依存しており、Wave の移動に伴う軸索輸送は、軸索伸長に必要なことがわかった。

Wave は基質に進行方向とは反対向きの力をかけながら移動する

クラッチモデルでは、軸索先端方向に重合しながら移動するアクチン線維を支えるために、細胞外基質には Shootin1 と L1-CAM を介して重合と反対向きの力がかかると考えられる (作用・反作用の法則)。そこで、Traction force microscopy (TFM) 法 [Chan and Odde, 2008; Iwadate and Yuasa, 2008; Fournier et al., 2010; Toriyama et al., 2013] を用いて Wave のクラッチによって生じると考えられる力の検出を試みた。TFM 法とは、細胞運動、形態形成などに必要な牽引力 (Traction force) をゲル基盤の歪みから計測する手法である (図 16A、動画 8)。具体的には、まず、多くの蛍光ナノビーズを埋め込んだポリアクリルアミドゲルを作成し、その上に神経細胞を培養する。ゲルはかかる力によって歪みが生じるので、それを蛍光ナノビーズの動きからモニターする。もし Wave が移動している部分に限局してゲルが後ろ向きに歪めば (蛍光ナノビーズの後ろ向きの移動が観察されれば)、Wave の移動に伴って、クラッチによる力が生じていると考えられる (図 16B)。実際に、蛍光ナノビーズを埋め込んだアクリルアミドゲルを作成し、その上に神経細胞を培養して 5 秒間隔でタイムラプス観察を行った (図 16C、左、動画 9)。その結果、Wave の下に存在するビーズが局所的に動いている様子が観察された (図 16C、右、拡大図、キモグラフ)。さらに、細胞の領域を Shaft と Wave に分類し、それぞれの領域で発生する力の大きさと方向を解析した (図 17A)。その結果、Shaft の下で発生した平均の力の大きさが 0.42 Pa ($n = 42$) であったのに対し、Wave の下は 1.71 Pa ($n = 35$) と、Wave の下で発生した力の方が大きいことがわかった (図 17B)。また、この時の平均の力の方向 (θ' 、図 17A) は Shaft では 21.8° ($n = 42$)、Wave では 24.0° (n

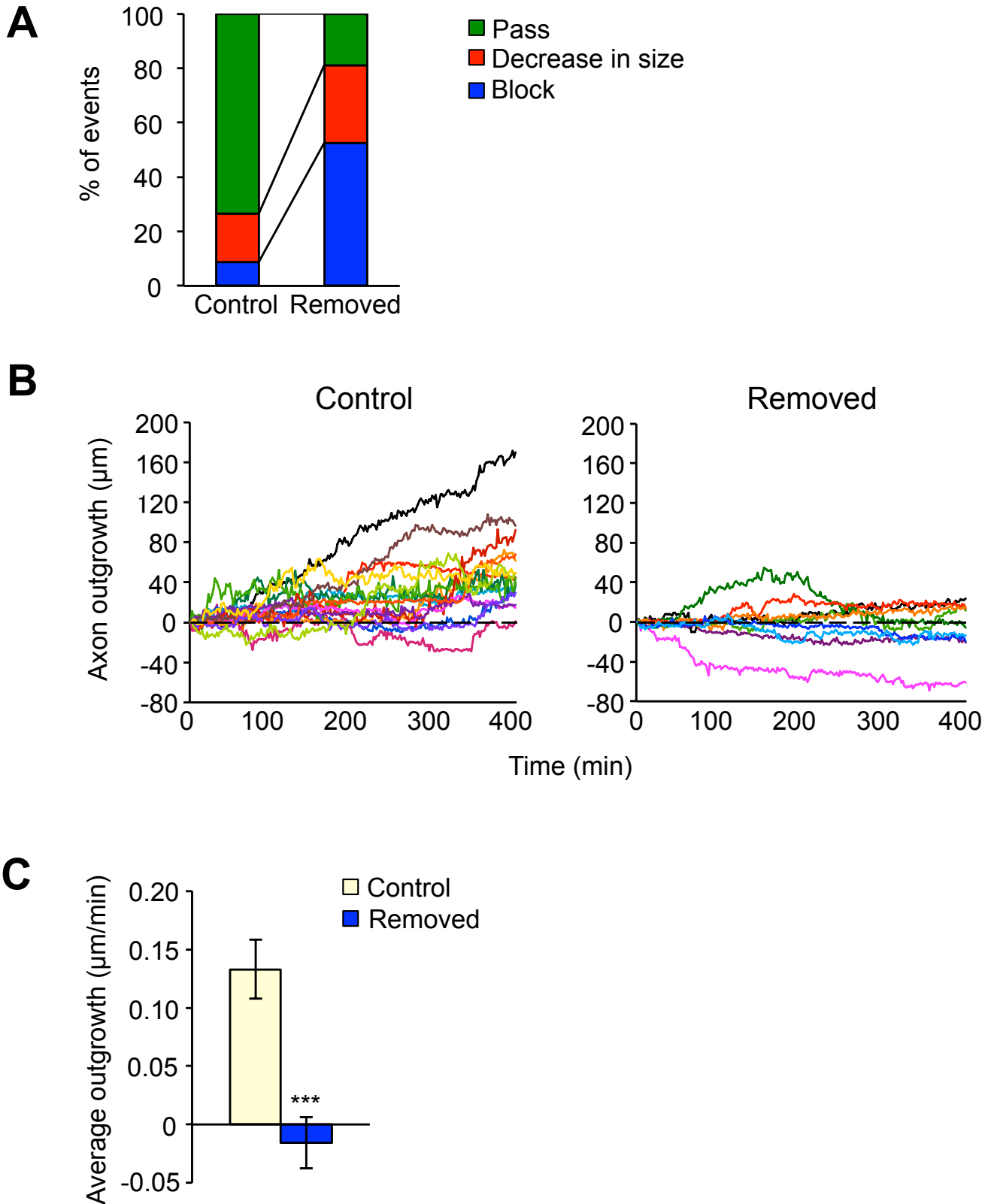


図15. Waveの基質依存的な移動を阻害すると軸索伸長も阻害される

A: 非接着性のストライプ領域により移動が阻害されたWaveの割合。

B: 非接着性のストライプ領域によりWaveの移動を阻害した際の軸索の長さ変化。

C: 非接着性のストライプ領域によりWaveの移動を阻害した際の軸索伸長速度。

Error bars: SE, ***: $P < 0.001$.

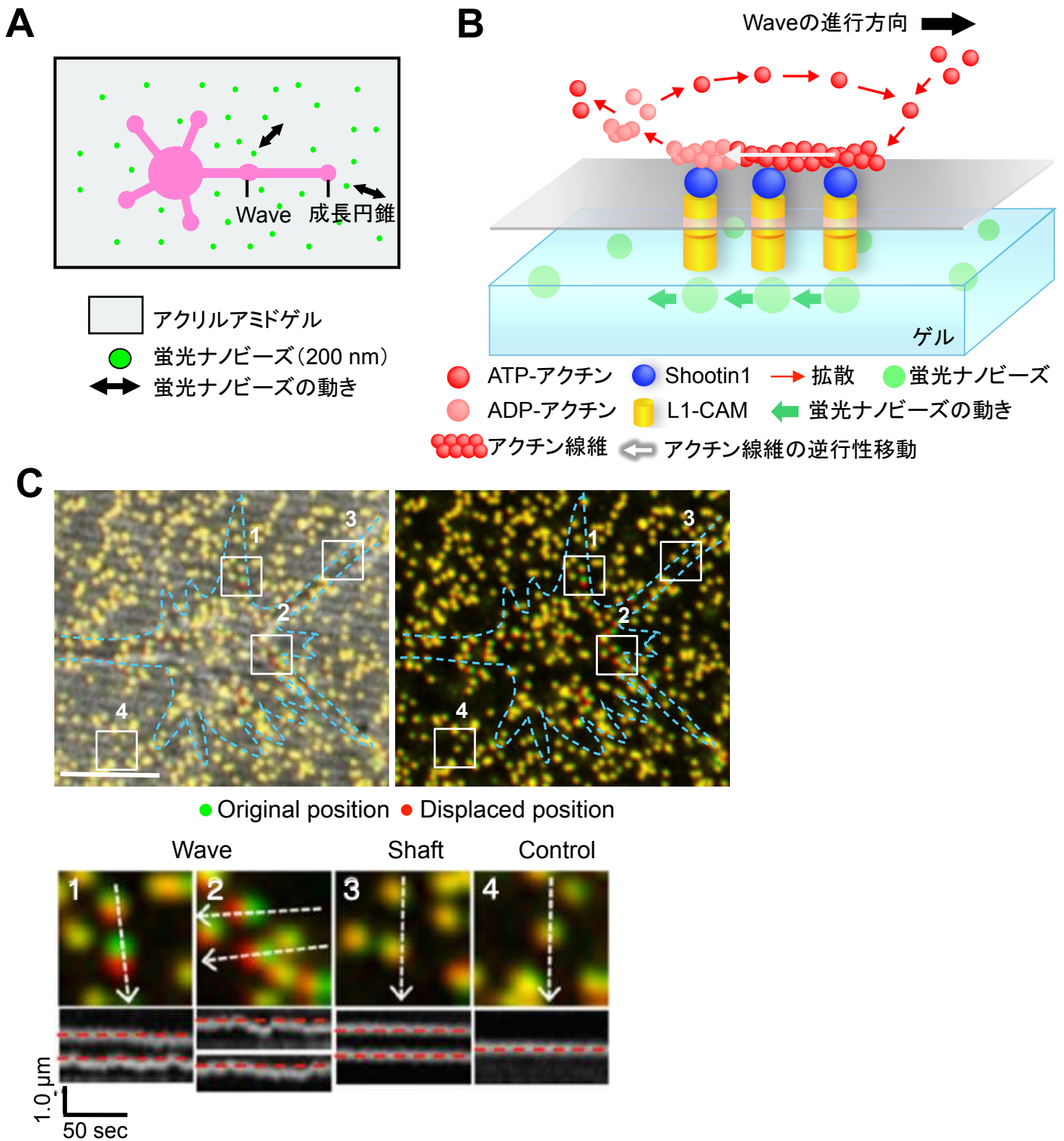


図16. Waveの移動に伴い基質には力が生じる

A, B: Traction force microscopy法の模式図。【A】蛍光ナノビーズを埋め込んだアクリルアミドゲル上に神経細胞を培養し、ビーズの動きをモニターする。【B】クラッチによって力が発生しているのであれば、その力でアクリルアミドゲルに歪みが生じ、蛍光ナノビーズは後ろ向きに動くはずである(緑色矢印)。

C: 【上】蛍光ナノビーズを埋め込んだアクリルアミドゲル上に培養した神経細胞を5秒間隔で撮影した画像(青点線: Waveの輪郭、緑色: 元のビーズの位置、赤色: 移動したビーズの位置)。【下】白四角中のビーズを矢印の方向に切り取ったキモグラフ。(赤点線: ビーズの初期位置)。

Bar: 5 μm。

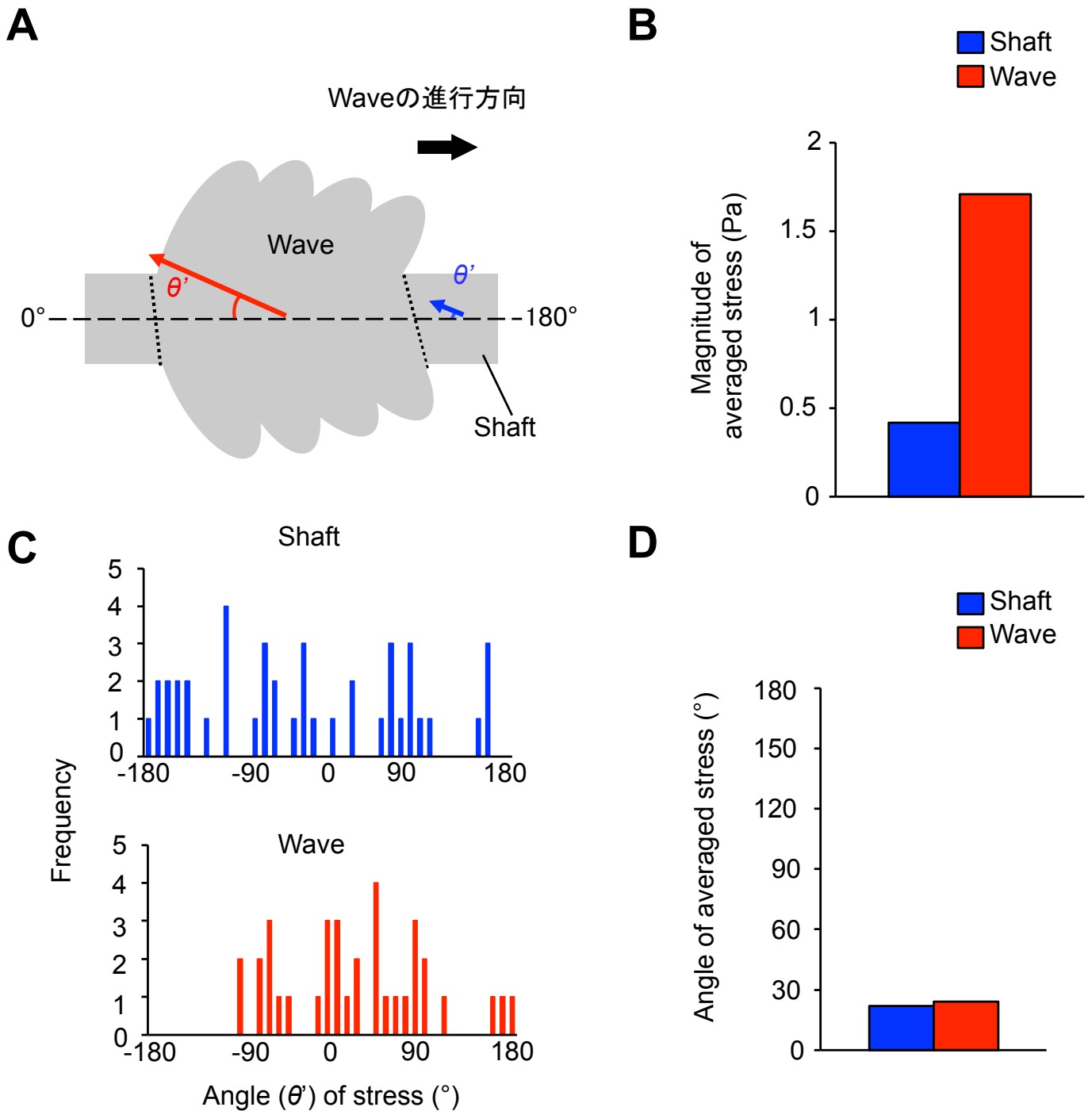


図17. Wave基質に進行方向とは反対向き力をかけながら移動する

A: 力の解析の模式図。赤矢印: Waveの下にかかる平均の力のベクトル、青矢印: Shaftの下にかかる平均の力のベクトル。 θ' : ベクトルの角度。

B: ShaftとWaveの下にかかる平均の力の大きさ。

C: ShaftとWaveの下にかかる力の方向のヒストグラム。

D: ShaftとWaveの下にかかる平均の力の方向。

= 42)と、どちらも細胞体の方向、すなわち Wave の進行方向とは反対方向を向いていた (図 17C)。そこで、さらにこれら発生した力の方向をヒストグラム解析したところ、Shaft の下で発生した力の方向にばらつきがあったが、Wave の下で発生した力の方向は細胞体の方向へ向いている傾向が見られた (図 17D)。

これらのことから、Wave は基質に進行方向とは反対向きの力をかけながら移動していることが示唆された。この結果は、Wave がクラッチモデルによって移動するという我々の仮説をさらに支持するものである。

ミオシン II は Wave の移動を促進する

ミオシン II はアクチン線維と相互作用するモータータンパク質である。神経細胞の成長円錐において、ミオシン II はアクチン線維を突起の伸長方向とは反対向きに引っ張ると同時に、アクチン線維を脱重合させ、アクチンモノマーを産生する [Lin et al., 1996; Medeiros et al., 2006; Wilson et al., 2010; Yang et al., 2012]。また、Wave においては、ミオシン II を阻害すると、Wave の発生頻度が増加することが報告されている [Flynn et al., 2009]。そこで、Wave の移動にミオシン II が関わっているのかどうかを、ミオシン II に対する阻害剤のブレビスタチンを用いて検証した。まず、ブレビスタチンを終濃度 2.5 μM で添加した神経細胞の Wave 内におけるアクチン線維の逆行性移動速度を計測した。その結果、コントロールとして DMSO を添加した細胞では $3.82 \pm 0.10 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 92$) であったのに対し、ブレビスタチンを添加した神経細胞では $2.30 \pm 0.10 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 72$) と、Wave 内のアクチン線維の逆行性移動速度が遅くなることがわかった (図 18A)。さらに、ブレビスタチン添加前と添加後の Wave の移動速度を計測した結果、添加前 $2.91 \pm 0.04 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 274$)、添加後 $2.28 \pm 0.04 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 264$) と Wave の移動速度は有意に速くなることがわかった (図 18B)。コントロールとして DMSO を加えた神経細胞では、Wave の移動速度に変化は見られなかった。

また、ミオシン II が Wave の移動に必要な力の発生に関わっているかどうかを Traction force microscopy 法により検証した。その結果、発生した平均の力の大きさは、コントロール細胞では 2.94 Pa ($n = 24$)、ブレビスタチン添加細胞では 2.29 Pa ($n = 21$) と、ブレビスタチン添加すると若干 Wave の移動に伴い基質に発生する力は若干小さくなる傾向があったが、それほど大きな差は見られなかった (図 18C 左)。また、このときの力の方向には大きな差は見られなかった (図 18C 右)。

これらの結果から、ミオシン II は Wave の移動を促進するが、移動時の力

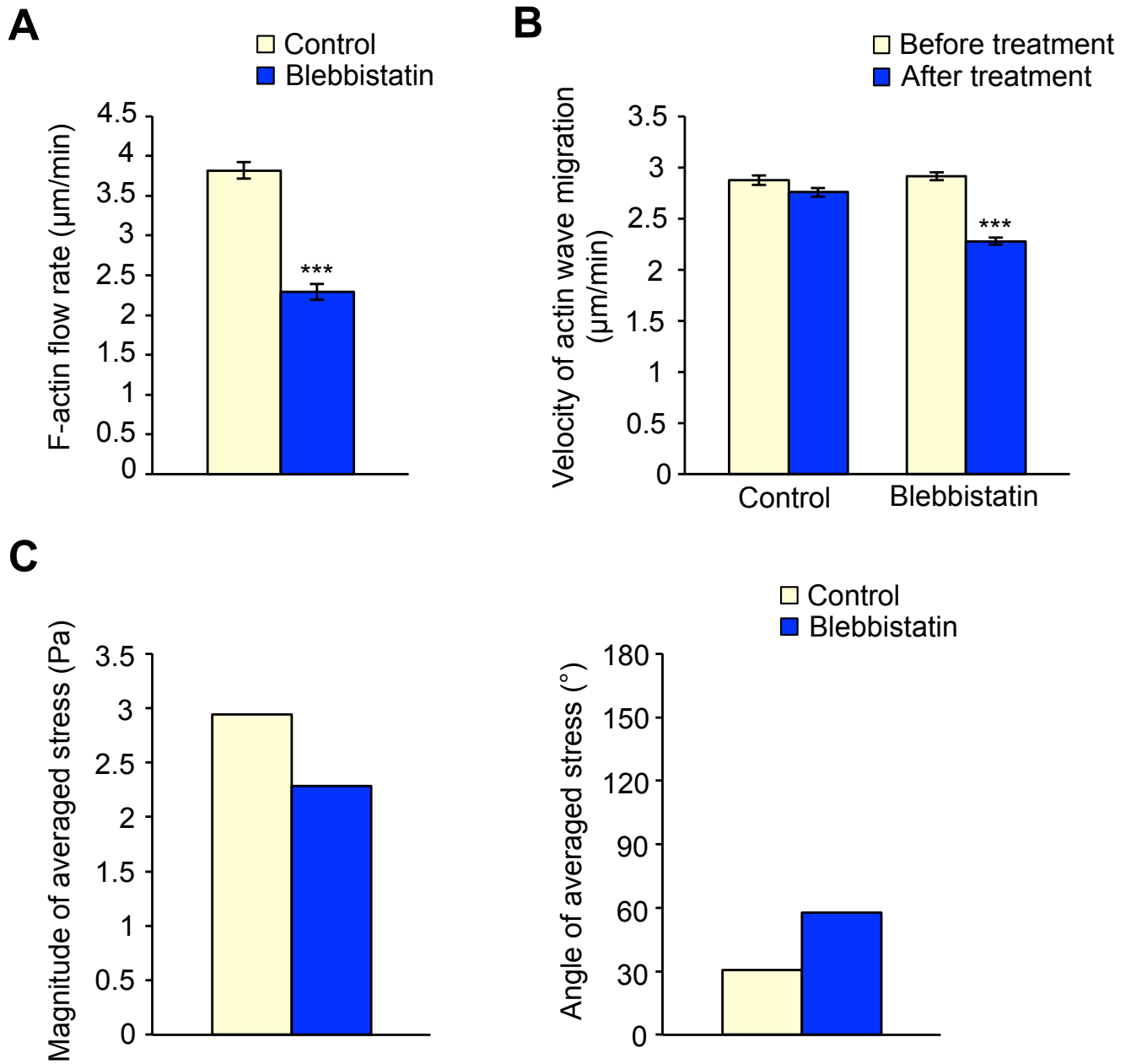


図18. ミオシン II はWaveの移動を促進する

A: ブレビスタチン添加した ($2.5 \mu\text{M}$) 神経細胞におけるWave内のアクチン線維の逆行性移動速度。

B: ブレビスタチン添加前と添加後の神経細胞におけるWaveの移動速度。

C: 【左】ブレビスタチン添加した神経細胞のWaveの下にかかる平均の力の大きさと【右】平均の力の方向。

Error bars: SE, ***: $P < 0.001$ 。

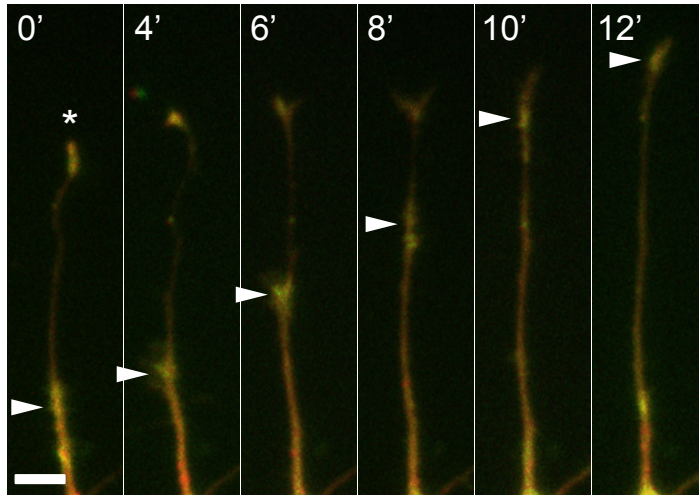
の発生には大きく影響しないことがわかった。

アクチン結合タンパク質は Wave に濃縮して移動する

本研究のモデルでは、アクチン以外の Slow component b に分類されるアクチン結合タンパク質群はアクチン線維結合することで Wave と共に輸送されると考えている。そこで、アクチン結合タンパク質の一つである Cortactin の EGFP 融合タンパク質を神経細胞に発現させ、Wave と共に輸送されるかどうかを調べた。その結果、Wave に Cortactin が濃縮して移動する様子が観察された (図 19A)。また、同様に他のアクチン結合タンパク質である Cofilin の mRFP 融合タンパク質を神経細胞に発現させ、タイムラプス観察を行ったところ、Wave に Cofilin が濃縮して移動する様子が観察された (図 19B)。さらに、この Cofilin の輸送は、Shootin1 を RNAi した神経細胞ではコントロールと比べて有意に遅くなった (図 19C)。これらのことから、Wave はアクチンだけでなく他の Slow component b も輸送していることがわかった。

本研究により、神経軸索上に現れる Wave は、アクチン線維の重合・脱重合とアクチン線維の細胞外基質への結合によって移動することがわかった。さらに Wave はアクチン以外の Slow component b であるアクチン結合タンパク質も輸送していることから、Wave の移動機構の解明は、神経軸索軸索内輸送のひとつである Slow component b の輸送機構の解明につながると考えられる。

A EGFP-cortactin / mRFP



B mRFP-cofilin / EGFP

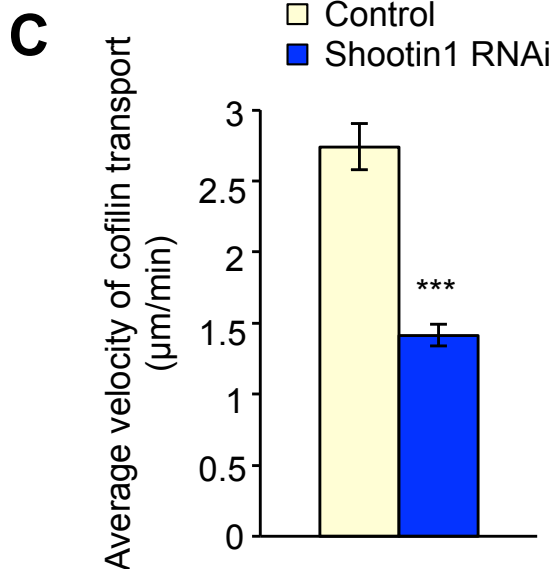
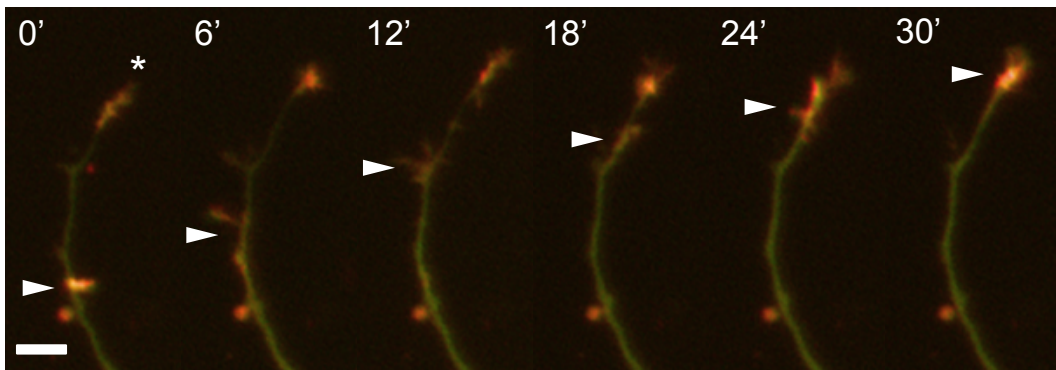


図19. Waveはアクチン結合タンパク質を輸送する

A: EGFP-cortactinとmRFPを発現させた神経細胞を4分間隔で撮影した画像。

B: mRFP-actin-CofilinとEGFPを発現させた神経細胞を6分間隔で撮影した画像。

C: Shootin1をRNAiした神経細胞で発生したCofilinの濃縮したWaveの移動速度。矢頭: Wave、星印: 成長円錐。Bars: 10 µm, Error Bar: SE, ***: P<0.001。

考察

これまでに数多くの研究グループが、Slow component b の分子機構の解明に挑戦してきたが、35 年間解明に至らなかった。本研究では、長年の謎である Slow component b の分子機構について改めて焦点を当て、その解明を目指した。そして、Slow component b の輸送機構のひとつとして、Wave という構造体に着目し、アクチン線維の重合・脱重合と細胞外基質との連結によるクラッチシステムを利用した新たな輸送機構を提唱した (図 1)。

クラッチシステムは Slow component b を輸送する機構のひとつである

神経軸索内を輸送されるタンパク質のうち、Fast component と Slow component a はモータータンパク質によって輸送されることが明らかになっているが[Vale et al., 1985b; Schnapp & Reese, 1989; Hirokawa, 1998; Brown, 2003]、Slow component b に分類されるタンパク質群の輸送機構については未だ明確な答えが出ていない。最近になって、Slow component b のタンパク質群が、モータータンパク質によって徐々に輸送されるという新たな仮説が発表された[Scott et al., 2011]。しかしながら、Slow component b の一部の構成タンパク質についてしか検証しておらず、その主要なタンパク質であるアクチンの輸送機構についても未だ不明なままである。

最近の研究から、神経軸索内を移動する Wave と呼ばれるアクチン線維に富んだ構造体が Slow component b の輸送形式のひとつであると考えられてきた[Ruthel and Banker, 1998; Flynn et al., 2009]。そこで本研究では Wave に濃縮するアクチン線維に着目し、Wave 内のアクチン線維がクラッチシステムによって移動するのではないかと仮定した。さらに Wave 内のアクチン線維にアクチン結合タンパク質が結合することで、アクチン線維とともにアクチン結合タンパク質も輸送するという、既知のモータータンパク質によるものとは異なる新たな軸索輸送機構を想定し (図 1、動画 1)、その検証を試みた。

得られた実験結果のまとめを図 20 に示す。まず、Wave 内のアクチン線維は方向性をもった重合・脱重合を繰り返しており (①)、アクチン線維の重合を阻害すると Wave の移動が抑制され (②)、反対にアクチン線維の重合を促進すると Wave の移動が促進された (③)。このことから、Wave の移動にはアクチン線維の方向性をもった重合・脱重合が重要であると考えられた。また、クラッチを介したアクチン線維と細胞外基質との結合を弱めるために、Shootin1 のノックダウンや、Shootin1 と相互作用する細胞接着分

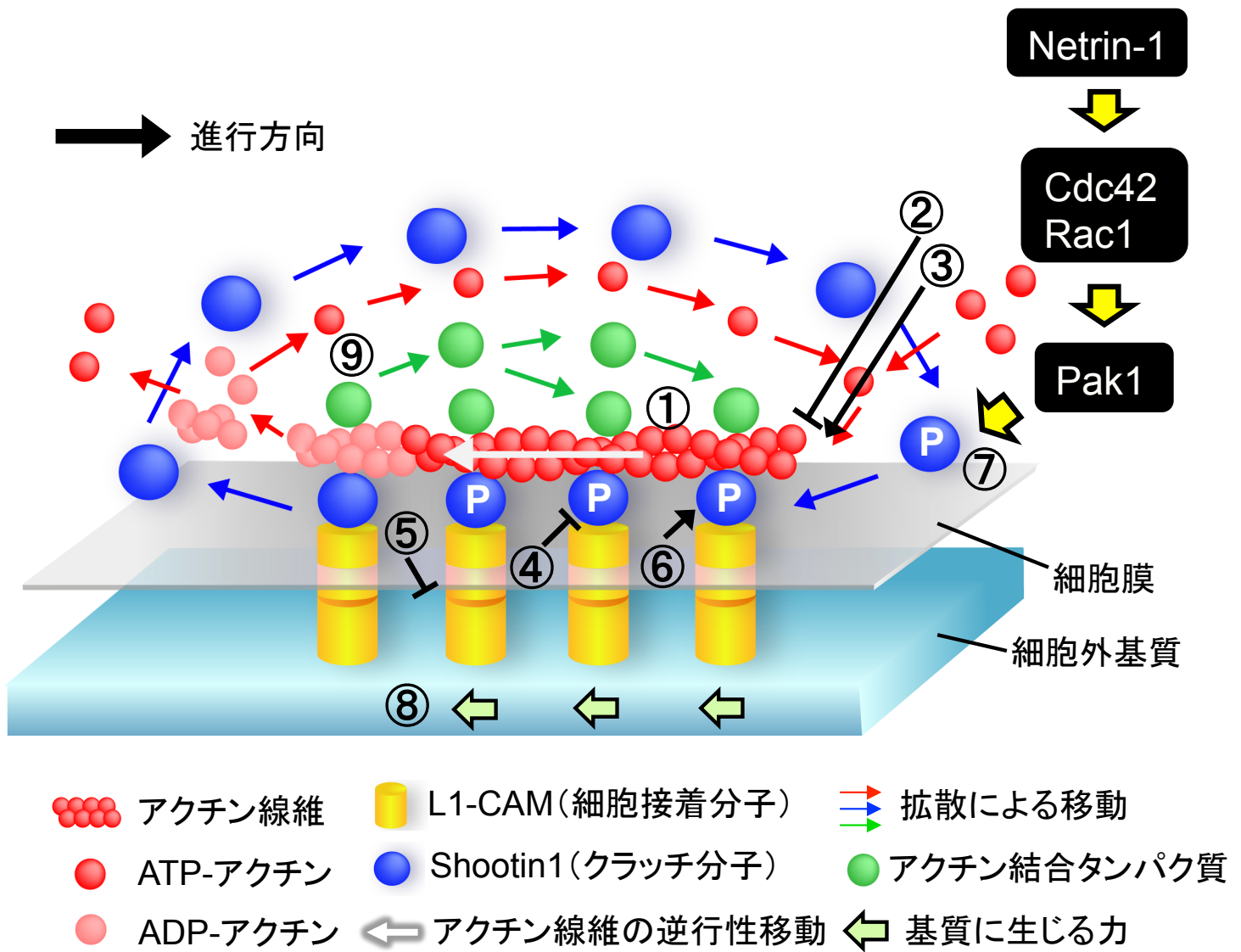


図20. 結果のまとめ

- ①: Wave内のアクチン線維は進行方向とは反対向きにトレッドミルしている(白矢印)。
 - ②: アクチン線維の重合を阻害すると、Waveの移動速度は遅くなる。
 - ③: アクチン線維の重合を促進すると、Waveの移動速度は速くなる。
 - ④: Shootin1によるクラッチ効率を下げると、Waveの移動速度は遅くなる。
 - ⑤: L1-CAMはWave内のアクチン線維を細胞外基質につなぎとめると考えられ、L1特異的な結合を弱めるとWaveの移動速度は遅くなる。
 - ⑥: Shootin1によるクラッチ効率を上げると、Waveの移動速度は速くなる。
 - ⑦: Netrin1刺激によりクラッチを増強するとWaveの移動速度は速くなる。
 - ⑧: Waveは基質依存的に移動し、Waveの移動時には基質に移動方向とは反対向きの力がかかる。
 - ⑨: アクチン結合タンパク質はWaveに濃縮して移動する。
- Slow component bの輸送形式と考えられているWaveは、クラッチシステムによって移動している可能性が示唆された。

子 L1-CAM を介したアクチン線維の細胞外基質へのつなぎとめを弱めることでクラッチ効率の減少させると、Wave の移動は遅くなった (④、⑤)。その際、Wave 内のアクチン線維の逆行性移動速度は速くなっており、アクチン線維と細胞外基質との間にスリップが生じていたと考えられる。反対に、クラッチ効率を強めるために Shootin1 の過剰発現や Netrin1 刺激を行うと Wave の移動速度は速くなった (⑥、⑦)。Netrin1 刺激をした際にはアクチン線維の逆行性移動速度が遅くなっていたことから、Shootin1 を介したクラッチを増強することで、アクチン線維と細胞外基質の間の滑りが小さくなったと考えられる。また、非接着性のストライプ領域では Wave の移動が停止する割合が増加し、ストライプ領域を通過した Wave はサイズが小さくなる傾向が見られた。そして、非接着性のストライプ領域をまたぐ軸索の伸長は遅くなった。さらに Wave が前進する際には、進行方向とは反対向きの力が細胞外基質上に発生していた (⑧)。また、アクチン以外のアクチン結合タンパク質も Wave に濃縮して軸索内を移動していた (⑨)。これらのデータはすべて、今回のクラッチシステムを介した Wave による軸索内タンパク質輸送のモデルを支持するものである。

以上の結果から、Slow component b を輸送する機構のひとつと考えられている Wave は、アクチンの重合・脱重合を伴ったクラッチシステムによって移動すると考えられた。

Wave はアクチンだけでなく他の分子群も輸送する

Slow component b の輸送メカニズムは長年不明であったが、過去の研究報告から、アクチン線維はミオシンによって輸送され、さらにそのアクチン線維を足場として Slow component b のタンパク質群が輸送されるのではないかと考えられていた [Willard et al., 1974; Willard, 1977; Black and Lasek, 1979]。しかし最近になって、Slow component b に分類される分子の中でも、 α -synuclein、synapsin- I、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH)、CaMK II a など主にシナプスを構成するタンパク質が、モータータンパク質によって輸送されるモデルが提唱された [Roy et al., 2008; Scott et al., 2011]。これらの Slow component b はアクチン線維の重合を阻害しても軸索内を方向性をもって移動することから、タンパク質同士で複合体を形成することで、軸索内をモータータンパク質依存的に徐々に輸送されると考えられている。しかしながら、Slow component b の主要な構成分子であるアクチンや、アクチンのダイナミクスを制御するようなアクチン結合タンパク質群については、その輸送メカニズムは不明なままである。

本研究で着目した Wave 内には、豊富なアクチン線維だけでなく、アクチ

ンダイナミクスを制御する分子群である Rac1、Arp2/3、Cortactin、Cdc42、Cofilin、LIM-kinase、Slingshot など、他の分子も数多く含まれている[Flynn et al., 2009]。また、本研究結果において、ライブイメージングにより Cortactin や Cofilin が Wave に濃縮して移動する様子が観察された(図 19)。私はこれらの分子が Wave 内のアクチン線維と特異的に結合と解離を繰り返すことで、Wave 内のアクチン線維と共に輸送されると想定している(図 1)。Wave が軸索の伸長を促進する点や[Ruthel and Banker, 1999; Flynn et al., 2009; Toriyama et al., 2010]、Wave の移動を阻害すると軸索伸長が遅くなる点(図 15)から考えても、これらの軸索伸長に関わる分子群が Wave によって輸送されている可能性は高い。従って、今回提唱したモデルによって、アクチンだけでなく他のアクチンダイナミクスを制御する分子群の輸送機構も説明することができるのではないかと考えている。

アクチン分子はモノマーとポリマーに動的に変化しながら神経軸索内の細胞膜直下において輸送される

神経軸索を輪切りに切断すると軸索の中心部には微小管が走行しており、一方アクチン線維は主に細胞膜直下に存在する。これまでの RI 標識を用いた研究から、Slow component a が軸索の中心部に多く局在しているのに対し、Slow component b は細胞膜直下に多く局在していることが報告されている[Heriot et al., 1985]。前述した Slow component b が、モータータンパク質によって輸送されているのであれば[Scott et al., 2011]、Slow component b の局在は軸索の中心部に多いはずであり、RI 標識を用いた結果とは矛盾が生じる。一方、今回のモデルは、アクチン線維が膜直下で細胞外基質に連結するクラッチシステムによって前進するというものであり(図 1)、輪切りの軸索内における Slow component b のデータと整合性がある。さらに、他の Slow component b の分子群も細胞膜直下で重合したアクチン線維に結合することで、膜直下に局在できると考えられる。

また、軸索輸送はその輸送様式についても不明な点があり、神経軸索において、チューブリン、ニューロフィラメント、アクチンなどの細胞骨格系の分子群が、モノマーとして輸送されるのか、それともポリマーとして輸送されるのかという問題は、以前から大きな議論がなされてきた。[Filliatreau et al., 1988; Tashiro and Komiya, 1989; Okabe and Hirokawa, 1990; Valle and Bloom, 1991]。アクチン分子に関しては、RI 標識をすることによって軸索における輸送様式を調べたところ、安定したアクチン線維の形態で輸送されることが示唆された[Filliatreau et al., 1988; Tashiro and Komiya, 1989]。しかし一方、蛍光標識したアクチンを発現させた神経細胞の軸索の

一部を退色させると、拡散によって退色部分の蛍光が戻ったことから、アクチン分子は安定したアクチン線維としてではなくモノマーとして輸送されることを主張する報告もある[Okabe and Hirokawa, 1990]。

神経細胞内のアクチン分子は、アクチンモノマーは均一に拡散しているが(図 3B)、Wave にはアクチン線維が濃縮し、Total アクチンの点から見ても豊富に存在している(図 3A)。さらに、Wave 内に濃縮するアクチン線維は方向性をもった重合・脱重合を繰り返している(図 5D)。また最近、光変換蛍光タンパク質で標識したアクチンを発現させた神経細胞を用いた実験で、Wave はアクチン分子を入れ替えながら移動することが報告された[Flynn et al., 2009]。以上のことと我々のクラッチモデルから、私はアクチン分子の軸索輸送様式に関して以下のことを想定した。まず、Wave には Total アクチンが濃縮してその一部がアクチン線維を形成している。そして、均一に拡散しているアクチンモノマー分子を取り込んで重合し、脱重合したアクチンモノマーは再び拡散する。これを繰り返してアクチン線維の状態を保ちつつ、ターンオーバーしながら軸索を移動するのではないかと考えた(図 1、動画 1)。このモデルは、軸索内のアクチン分子の輸送様式に関してこれまで対立していた 2 つの主張を統合するものであり、アクチン線維としての輸送もアクチンモノマーの拡散のデータも説明することができる。

したがって、本研究で提唱するクラッチシステムによるアクチンの輸送メカニズムをさらに解析することにより、長年議論されてきた神経軸索内における細胞骨格分子の輸送形態についても解明が進む可能性がある。さらに、このような細胞内の分子輸送機構はこれまで報告がなく、既知のモータータンパク質による輸送機構とは異なる新しい輸送機構であると考えている。

Wave による不連続なタンパク質輸送は神経細胞の極性形成に関与する

成熟した神経細胞は、一本の長い軸索と複数の短い樹状突起を有している。しかし、神経細胞は初めからこのような極性を持った形をしているのではない。神経細胞は成熟過程の初期段階で、まず同じ位の長さの未成熟な突起を複数本形成し、その後、その突起のうち的一本が伸長して軸索となり、残りの突起が樹状突起になる[Craig and Banker, 1994]。神経細胞が正しく機能するためにはこの極性形成が非常に重要である。当研究室で同定された Shootin1 は、神経細胞の極性形成時に軸索の先端に特異的に濃縮し、軸索の伸長に関わることがわかっている[Toriyama et al., 2006]。また、本研

究で示したように、Shootin1はWaveに濃縮して軸索内を移動する(図8A)。Waveは特に神経細胞の極性形成時に多く神経突起に現れ、各突起にランダムかつ不連続に発生する。この不連続なWaveの発生を定量的数理モデルを用いてWaveをモデル上で継続的に発生させると、極性形成が妨げられることが報告されている [Toriyama et al., 2010]。これらのことから、不連続なWaveの発生は神経細胞の極性形成に重要であると考えられる。Waveはモータータンパク質に比べて移動速度は遅いが、構造体が大きいため一度に大量に輸送することができる。そのため、Waveが発生した突起では急激に伸長が促進され、他の突起よりも軸索になりやすくなり、極性形成が促進されると考えている。また、Waveの発生が不連続であることにより、各突起間に伸長速度の差が生まれやすく、一本だけが急激に伸長しやすくなるのではないかと考えている。一方、モータータンパク質は移動速度は速いが、一度に輸送できるタンパク質の量が少ない。また、継続的に突起内を移動してタンパク質を輸送しているため、極性形成に与えるインパクトが小さいのではないかと考えられる。この様に、Waveは単にタンパク質を輸送するだけでなく、不連続に発生することで神経細胞の極性形成にも関わると考えられる。

ミオシンIIはWaveの発生・移動に関与する

神経細胞の成長円錐において、アクチン線維はleading edge側で重合し、軸索の伸長方向とは反対向きに移動する。このアクチン線維の逆行性移動は、アクチン線維が自身の重合により膜側から内側へ押し戻されると同時に、成長円錐の内側に存在するミオシンIIによって引っ張られることにより起こると考えられている [Lin et al., 1996; Yang et al., 2012]。その他にも、ミオシンIIは、アクチン線維の脱重合にも関わることがわかっている [Medeiros et al., 2006; Wilson et al., 2010]。

本研究では、ブレビスタチン添加によりミオシンIIを阻害すると、Wave内のアクチン線維の逆行性移動速度が遅くなり、Waveの移動速度も遅くなった(図18A、B)。このことから、ミオシンIIはアクチン線維を切断してアクチンモノマーを産生し、重合・脱重合のターンオーバーを促進することで、Waveの移動を促進すると考えられる。一方、Waveの移動時に基質に生じる力の大きさはさほど変わらなかった(図18C)。これは、ミオシンIIはWave内のアクチン線維をshaftへと引っ張るアクチン線維の逆行性移動にはそれほど関与していないことを示唆している。

また興味深いことに、これまでに、ミオシンIIを阻害するとWaveの発生頻度が増加することが報告されている [Flynn et al., 2009]。実際に、ミオシ

ンⅡ阻害剤の添加前後で Wave の発生頻度を比較すると、確かに阻害剤添加後では Wave の発生頻度が増加した（未発表データ）。このことから、ミオシンⅡは Wave の発生を抑制すると考えられる。Wave の発生メカニズムは未だ不明であるが、ミオシンⅡ阻害実験の結果から、私は次のように考えている。神経細胞内で新しく形成を開始した Wave は、アクチン線維が短いため、ミオシンⅡによってアクチン線維が切断され、Wave の発生まで至らない。しかし、一度 Wave が形成されると、Wave 内のアクチン線維はある程度長くなるため、ミオシンⅡによる切断でアクチン線維が短くなることよりも、それによって生産されたアクチンモノマーによる重合促進の方が優位に働き、Wave 内のアクチン線維のターンオーバーが促進され、その結果、Wave の移動が促進されると考えている。

神経細胞以外の細胞における Wave の発生

興味深いことに、アクチン線維やアクチンに関連するタンパク質群が Wave 状に移動する現象は、線維芽細胞やメラノーマ細胞、白血球等神経細胞以外の細胞でも報告されている[Vicker, 2002; Gerisch et al., 2004; Weiner et al., 2007]。これらの細胞群では、神経軸索と同様に Wave 状に移動したアクチン線維や関連タンパク質群が Leading edge に到達すると、新たに Leading edge を形成したり、Leading edge が突出する現象が報告されている。したがって、Wave は神経細胞に限らず、他の細胞群でも細胞内タンパク質輸送を担う可能性がある。しかしながら、神経細胞と同様に他の細胞群においても Wave の移動機構はわかっていない。神経細胞における Wave の移動メカニズムを解明は、これら神経以外の細胞における Wave の移動及びタンパク質輸送のメカニズム解明に寄与することができるかもしれない。

今後の課題

本研究で着目した Wave は、確かにアクチンやアクチン結合タンパク質を輸送するが、Wave は主に神経細胞の成熟過程の前半で発生し、成熟した神経細胞の軸索ではあまり見られない[Ruthel and Banker, 1999]。しかしながら、アクチンやアクチン結合タンパク質の輸送は、神経細胞が活着している期間を通して必要である。私は、本研究で着目した Wave は顕著な Filopodia 構造を有する大きな構造体であるが、成熟した神経細胞の軸索では、Wave のような Filopodia 構造を持たない Shaft に沿ったアクチン線維が存在し、Wave と同様にクラッチシステムによって移動しているのではないかと考えている。今後は、より高度なイメージング技術を活用し、Shaft に沿って移動するアクチン線維について検証したい。そして、神経細胞だけにとど

まらず、さまざまな細胞におけるアクチンやアクチン結合タンパク質の輸送機構の解明につなげてゆきたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、神経システム生物学研究室の稲垣直之教授には、最高の研究環境を整えていただくと共に、多くのご助言、ご指導を頂き、深く御礼と感謝を申し上げます。また、アドバイザーの分子情報薬理学研究室内の伊東広教授、動物遺伝子機能研究室の川市正史教授、これまでアドバイザーを務めて頂きました高橋淑子教授、中島欽一教授には、本研究を開始したころから現在まで多くのご助言を頂き、心より感謝しております。

また、本研究を進めるにあたって、プラスミドを提供いただきました東北大学大学院生命科学研究所の水野健作教授、フェムト秒レーザー使用にあたりレーザー機器のご供与及びご指導いただきました本学の物質創成科学研究科の細川陽一郎准教授、飯野敬矩助教、坂口さや香さん、Traction force microscopy法の解析プログラムの立ち上げにご協力いただきました本学の情報科学研究科の池田和司教授、小沢哲さん、愛知県立大学情報科学部の作村諭一准教授には深く感謝申し上げます。

その他にも、同研究室の浦崎明宏助教、鳥山道則研究員、久保祐亮さん、前野貴則さん、神経機能科学研究室の中澤瞳さんには直接的な実験手法のご指導や貴重なご助言を頂き、心より感謝申し上げます。また、秘書の植田さんをはじめ、後輩の東口さん、吉田さん、高野さん、渡瀬さん、馬場さん、岡本さん、黄さん、嶺岸さんにも本研究を進めるにあたり多くのサポートを頂きました。

最後に、本研究を行うにあたって影ながら支えてくれた家族、ならびに友人たちに深く感謝します。

参考文献

Black, M. M. & Lasek, R. J. (1979). Axonal transport of actin: slow component b is the principal source of actin for the axon. *Brain Res.* 171, 401-413.

Brady, T. S. (1985). A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature* 317, 73-75.

Brown, A. (2003). Axonal transport of membranous and nonmembranous cargoes: a unified perspective. *J. Cell Biol.* 160, 817-821.

Brown, A., Wang, L. & Jung, P. (2005). Stochastic simulation of neurofilament transport in axons: the “stop-and-go” hypothesis. *Mol. Biol. Cell* 16, 4243-4255.

Chan, C. E. & Odde, D. J. (2008). Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science* 322, 1687-1691.

Craig, A. M. & Banker, G. (1994). Neuronal polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 268-310.

Endo, M., Ohashi, K., Sasaki, Y., Goshima, Y., Niwa, R., Uemura, T. & Mizuno, K. (2003). Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *J. Neurosci.* 23, 2527-2537.

Filliatreau, G., Denoulet, P., de Nechaud, B. & Di Giamberardino, L. (1988). Stable and metastable cytoskeletal polymers carried by slow axonal transport. *J. Neurosci.* 8, 2227-2233.

Flynn, K. C., Pak, C. W., Shaw, A. E., Bradke, F. & Bamberg, J. R. (2009). Growth cone-like waves transport actin and promote axonogenesis and neurite branching. *Dev. Neurobiol.* 69, 761-779.

Fournier, M. F., Sauser, R., Ambrosi, D., Meister, J-J. & Verkhovskiy, A. b. (2010). Force transmission of migrating cells. *J. Cell Biol.* 188, 287-297.

Gerisch, G., Bretschneider, T., Taubenberger, A. M., Simmeth, E., Ecke, M., Dize, S. & Anderson, K. (2004). Mobile actin clusters and traveling waves in cells recovering from actin depolymerization. *Biophys. J.* 87, 3493-3503.

Gibbones, I. R. & Rowe, A. J. (1965). Dynein: a protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science* 149, 424-426.

Gibbons, I. R. (1981). Cilia and flagella of eukaryotes. *J. Cell Biol.* 91, 107-124.

Goddette, D.W., & Friden, C. (1986). The kinetics of cytochalasin D binding to monomeric actin. *J Biol. Chem.* 261, 15970-15973.

Goor, D. V., Hyland, C., Schaefer, A. & Forscher, K. (2012). The role of actin turnover in retrograde actin network flow in neuronal growth cones. *Plos One* 7(2), e30959.

Heriot K., Gambetti P. & Leask. R. J. (1985). Proteins transported in slow components a and b of axonal transport are distributed differently in the transverse plane of axon. *J. Cell Biol.* 100, 1167-1172.

Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279, 519-526.

Iwadate, Y. & Yuyama, S. (2008). Actin-based propulsive force and myosin-ii-based contractile force in migrating dictyostelium cells. *J. Cell Sci.* 121, 1314-1324.

Katoh, K., Hammar, K., Smith, P. J. S. & Oldenbourg, R. (1999). Birefringence imaging directly reveals architectural dynamics of filamentous actin in living growth cone. *Mol. Biol. Cell* 10, 197-210.

Lasek, R. J., Garner, J. A. & Brady, S. T. (1984). Axonal transport of the cytoplasmic matrix. *J. Cell Biol.* 99, S212-S221.

Lemmon, V., Farr, K. L. & Lagenaur, C. (1989). L1-mediated axon outgrowth

occurs via a hemophilic binding mechanism. *Neuron* 2, 1597-1603.

Lin, C.H., Espreafico, E.M., Mooseker, M.S. & Forscher, P. (1996). Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron*. 16:769–782.

Mallavarapu, A. & Mitchison, T. (1999). Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J. Cell Biol.* 146, 1097-1106.

Medeiros, N.A., Burnette, D.T. & Forscher, P. (2006). Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nat. Cell Biol.* 8:215– 226.

Mitchison, T. & Kirschner, M. (1988) Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1, 761-772.

Nolen, B.J., Tomasevic, N., Russell, A., Pierce, D.W., Jia, Z., McCormick, C.D., Hartman, J., Sakowicz, R., & Pollard, T.D. (2009). Characterization of two classes of small molecule inhibitors of Arp2/3 complex. *Nature* 460, 1031-1034.

Okabe, S. & Hirokawa, N. (1990). Turnover of fluorescently labeled tubulin and actin in the axon. *Nature* 343, 479-482.

Pak, C. W., Flynn, K. C. & Bamberg, J. R. (2008). Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nature Rev. Neurosci.* 9, 136-147.

Paschal, B. M., Shpetner, H. S. & Vallee, R. B. (1987) MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J. Cell Biol.* 105, 1273-1282.

Rizvi, S.A., Neidt, E.M., Cui, L., Feiger, Z., Skau, C.T., Gardel, M.L., Kozmin, S.A., & Kovar, D.R. (2009). Identification and characterization of a small molecule inhibitor of formin-mediated actin assembly. *Chem. Biol.* 16, 1158-1168.

Ruthel, G. & 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. & 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.

Roy, S., Winton, M. J., Black, M. M., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M.-Y. (2008). Cytoskeletal requirements in axonal transport of slow component-b. *J. Neurosci.* 28, 5248-5256.

Sampath, P., & Pollard, T.D. (1991). Effects of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments. *Biochemistry* 30, 1973-1980.

Schnapp, B. J. & Reese, T. S. (1989). Dynein is the motor for retrograde axonal transport of organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1548-1552.

Scott, D. A., Das, U., Tang, Y. & Roy S. (2011). Mechanistic logic underlying the axonal transport of cytosolic proteins. *Neuron* 70, 441-454.

Shimada, S., Toriyama, M., Uemura, K., Kamiguchi, H., Sugiura, T., Watanabe, N. & Inagaki, N. (2008). Shootin1 interacts with actin retrograde flow and L1-CAM to promote axon outgrowth. *J. Cell Biol.* 181, 817-829.

Tashiro, T. & Komiya, Y. (1989). Stable and dynamic forms of cytoskeletal proteins in slow axonal transport. *J. Neurosci.* 9, 760-768.

Toriyama, M., Shimada, T., Kim, K. B., Mitauba, M., Nomura, E., Katsuta, K., Sakumura, Y., Roepstorff, P. & Inagaki, N. (2006). Shootin1: a protein involved in the organization of an asymmetric signal for neural polarization. *J. Cell. Biol.* 175, 147-157.

Toriyama, M., Sakumura, Y., Shimada, T., Ishii, S. & Inagaki, N. (2010). A diffusion-based neurite length-sensing mechanism involved in neuronal symmetry breaking. *Mol. Systems Biol.* 6, 1-16.

Toriyama, M., Kozawa, S., Sakumura, Y. & Inagaki, N. (2013) Conversion of a signal into forces for axon outgrowth through pak1-mediated shootin1 phosphorylation. *Curr. Biol.* 23, 529-534.

Vale, R. D., Reese, T. S. & Sheetz, M. P. (1985a). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42, 39-50.

Vale, R. D., Reese, Schnapp, B. J., Mitchison, T., Steuer, E., Reese, T. S. & Sheetz, M. P. (1985b). Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell* 43, 623-632.

Vallee, R. B. & Bloom, G. S. (1991). Mechanism of fast and slow axonal transport. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 59-92.

Vicker, M. G. (2002). Eukaryotic cell locomotion depends on the propagation of self-organized reaction-diffusion waves and oscillations of actin filament assembly. *Exp. Cell Res.* 275, 54-66.

Watanabe, N. & Mitchison, T. J. (2002). Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science* 295, 1083-1086.

Weiner, O. D., Marganski, W. A., Wu, L. F., Altschuler, S. J. & Kirschner, M. W. (2007). An actin-based wave generator organizes cell motility. *Plos Biol.* 5, 2053-2063.

Willard, M., Cowan, W. M. & Vagelos, P. R. (1974). The polypeptide composition of intra-axonally transported proteins: evidence for four transport velocities. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 2183-2187.

Willard, M. (1977). The identification of two intra-axonally transported polypeptides resembling myosin in some respects in the rabbit visual system. *J Cell Biol.* 75, 1-11.

Wilson, C.A., Tsuchida, M.A., Allen, G.M., Barnhart, E.L., Applegate, K.L.,

Yam, P.T., Ji, L., Karen, K., Danuser, G. & Theriot, L.A. (2010). Myosin II contributes to cell-scale actin network treadmilling through network disassembly. *Nature* 465, 373-377.

Yang, Q., Zhang, X.F., Pollard, T.D., & Forscher, P. (2012). Arp2/3 complex-dependent actin networks constrain myosin II function in driving retrograde actin flow. *J. Cell Biol.*, 197, 939-956.