

軸索伸長を引き起こすクラッチメカニズムの  
分子ネットワークの解明

久保 祐亮

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

## 目 次

序論 .....	4
材料と方法 .....	7
1. 細胞培養 .....	7
2. プラスミド .....	8
3. 遺伝子導入 .....	9
4. コーティング用の L1-Fc の作製 .....	10
5. ガラスカバースリップ及びガラスボトムディッシュのコーティング .....	10
6. 免疫共沈降 .....	10
7. タンパク質精製 .....	11
8. <i>In vitro</i> binding assay .....	12
9. F-actin sedimentation assay .....	12
10. ウェスタンブロットティング .....	13
11. 免疫細胞染色 .....	13
12. 神経細胞の形態の定量解析 .....	14
13. 細胞内一分子計測 .....	14
14. ビーズトラッキング .....	15
15. Traction force microscopy .....	15
16. 有意差検定 .....	15
結果 .....	16
1. 新規クラッチ分子候補のスクリーニング .....	16
2. 内在性 Cortactin と Shootin1 は相互作用し, これらは直接結合する .....	16
3. Cortactin は逆行性に移動するアクチン線維と相互作用する .....	17
4. Cortactin はアクチン線維と Shootin1 の連結を仲介する .....	18
5. Cortactin はアクチン線維と細胞接着分子 L1 を連結するクラッチ分子として機能する .....	19
6. Shootin1 による軸索伸長は Cortactin 依存的である .....	20
7. Cortactin は L1 依存的な軸索伸長に関与する .....	21
8. Cortactin と Shootin1 の結合は PAK1 を介した Shootin1 のリン酸化により促進される .....	22
9. Cortactin は Netrin-1 により誘導される軸索伸長のための牽引力の促進に関与する .....	23
10. Cortactin と Shootin1 の結合が Netrin-1 により誘導される牽引力の発生と軸	

索伸長に關与する .....	24
<b>考察 .....</b>	<b>26</b>
Cortactin は軸索伸長を引き起こすクラッチ分子として機能する .....	26
シグナル伝達と力発生のインターフェースとしての Cortactin-Shootin1 の連結機構 .....	28
Shootin1 のリン酸化以外によるクラッチメカニズムの制御機構 .....	28
結論 .....	29
<b>謝辞 .....</b>	<b>30</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>31</b>
<b>図表 .....</b>	<b>36</b>

## < 序論 >

神経細胞は神経伝達を直接担う細胞であり、複雑なネットワークの最小の構成単位である。神経細胞は多様な形態をしているが、細胞体、軸索、樹状突起という3つの基本構造から構成されている。細胞体は、核などの細胞内小器官が多く存在し、遺伝情報の保持、遺伝子発現、タンパク質の合成など一般的な細胞としての機能はほとんどここで行われる。細胞体から長く伸長する単一の突起が軸索であり、他の神経細胞に情報伝達を行なっている。樹状突起は、細胞体から複数本出ている突起であり、他の神経細胞の軸索からのシグナルを受け取る。このように、神経細胞がシグナルを受け取り、それを統合し、伝達するためには、神経細胞の軸索が標的となる細胞に正しく到着し、シナプスを形成しなければならず、神経細胞が神経突起を伸長することは極めて重要なプロセスであると考えられる。

神経細胞の軸索が伸長し、標的となる神経細胞に正しく到着してシナプスを形成するには、軸索の先端に存在する成長円錐が重要である。成長円錐は二次元基質上では扇状に広がった手のひらのような構造で、その形態から P-domain (Peripheral domain ; 末端領域) と C-domain (Central domain ; 中央領域) の領域に分けられる[1] (図 1)。また、P-domain と C-domain の境界部分は Transition zone (移行帯) と呼ばれる[1] (図 1)。P-domain は主に Filopodia と Lamellipodia から成り、アクチン線維 (F-actin) が豊富に存在する。一方、C-domain は主に微小管から成り、ミトコンドリアや小胞などの細胞内小器官も多く含まれる。成長円錐は、ダイナミックに構造を変化させながら前方へと移動することで、神経突起を伸長させる。この成長円錐の運動性は、細胞骨格や細胞接着分子、膜輸送により制御されている[1]。また、成長円錐には軸索ガイダンス因子の受容体が多く存在し[2]、軸索の成長円錐は軸索ガイダンス因子に応じて運動性と進行方向を変化させ、神経軸索を標的となる神経細胞に正しく到着させる[1, 2]。

成長円錐の前方への移動の分子メカニズムとして、1988年に Mitchison と Kirschner によりクラッチモデルが提唱された[3] (図 2)。成長円錐の P-domain においてアクチン線維は、Filopodia および Lamellipodia においてプラス端を成長円錐先端に、マイナス端を C-domain 側に向けて規則正しく配置されている。単量体アクチン (G-actin) のアクチン線維への重合は成長円錐の先端で、脱重合は C-domain 側で起こり、この時、アクチン線維は成長円錐の先端から C-domain へ移動する (アクチン線維の逆行

性移動)[4, 5]。アクチン線維の逆行性移動は、先端でのアクチンの重合およびモータータンパク質である Myosin II の収縮力により駆動することがわかっている[6, 7]。クラッチモデルとは、細胞接着分子が細胞外領域の不動性の基質と結合し、“クラッチ分子”を介してアクチン線維の逆行性移動と細胞接着分子が連結すると、アクチン線維の逆行性移動により駆動力が生じ、これを動力源として成長円錐が前進し、軸索が伸長するというモデルである[3, 8]。現在までに、軸索伸長を引き起こすクラッチ分子として Catenin[9]や Ezrin[10]が機能する可能性が示唆されている。

当研究室では、神経細胞の軸索の成長円錐に濃縮し、その濃縮により軸索の伸長を引き起こすタンパク質として Shootin1 を同定した[11]。EGFP-shootin1 の細胞内一分子計測から、Shootin1 が軸索の成長円錐においてアクチン線維の逆行性移動に沿った挙動を示すことが観察された。また、神経細胞において、Shootin1 と細胞接着分子 L1 が相互作用し、成長円錐の一部において Shootin1 と L1 が共局在することが確認されている。さらに、L1 でコーティングしたビーズを、光ピンセットを用いて成長円錐上に載せると、ビーズがアクチン線維の逆行性移動に沿った挙動を示した。これらのことから、Shootin1 はアクチン線維と L1 とを連結するクラッチ分子として機能し、軸索の伸長を引き起こすことが示唆されている[12]。しかしながら、Shootin1 のアクチン線維や L1 との相互作用が直接的であることを示す実験データはなく、未知の分子を介してアクチン線維や L1 と相互作用する可能性があり、クラッチモジュールを構成する他のコンポーネントは明らかになっておらず、その分子ネットワークは不明である。

これまでに当研究室では、酵母ツーハイブリッド法を用いたスクリーニングにより Shootin1 と直接相互作用する分子の同定が行われた。これにより、クラッチメカニズムに関与する可能性のある分子として MEGF10/KIAA1780[13]、KLHL20[14]、MICAL2[15]を同定した[16]。これらの分子について、*in vivo*での結合解析の結果、いずれの分子も HEK293T 細胞では不溶性となり、免疫沈降による相互作用解析を行うことができなかった。また、COS-7 にこれらを遺伝子導入し細胞内局在を検討したところ、Shootin1 との共局在は観察されなかった。これらのことから、酵母ツーハイブリッド法により同定された分子が細胞内で Shootin1 と相互作用する可能性が低いと考えられた[16]。

そこで、酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングから方針を変更し、Shootin1 とアクチン線維の連結を仲介する分子に焦点を当て、アクチン結合タンパク質を免疫共沈降法により網羅的にスクリーニングし

た。その結果，クラッチ分子の候補として **Cortactin** を同定した（後述，結果 1）。**Cortactin** はアクチン結合タンパク質であり，チロシンキナーゼ **v-Src** の基質として同定された[17]。**Cortactin** は，アクチンの重合を制御するタンパク質である **Arp2/3 complex** と直接結合し，アクチン線維の枝分かれに関与することが知られている[18, 19]。また，**Cortactin** は移動性細胞の先端端に局在し，細胞の移動に関与することが報告されている[20, 21]。神経細胞においては，**Cortactin** は成長円錐に濃縮し[22]，発現を抑制すると神経突起が短くなるという報告がある[23]。また，軸索反発因子である **Ephrin** の受容体である **EphA** を介したシグナルとして **Cortactin** のチロシンリン酸化が作用することを示唆する報告がある[24]。これらのことから，成長円錐の形成や軸索伸長，軸索ガイダンスに **Cortactin** が関与する可能性が考えられる。本研究では，同定した分子 (**Cortactin**) がクラッチ分子として機能するのかを解析することで，クラッチメカニズムの分子ネットワークやその制御機構を解明し，軸索伸長の分子機構を明らかにすることを目指した。

## <材料と方法>

### 1. 細胞培養

#### 1-1. HEK293T 細胞および COS-7 細胞の培養

ヒト胎児由来腎臓細胞株 HEK293T 細胞およびアフリカミドリザル腎臓由来細胞株 COS-7 細胞を直径 10 cm ディッシュ (CORNING) 上で、ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum: FBS, 終濃度 10%, ジャパン・バイオシーラム) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) で培養した (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。70-80% コンフルエントになったら, 継代培養を行った。

#### 1-2. XTC 細胞の培養

アフリカツメガエル由来線維芽細胞株 XTC 細胞を 25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコ (greiner bio-one) 中で, FBS (終濃度 10%) を含む 70% Leibovitz's L-15 medium (L-15, GIBCO) で培養した (23°C)。70-80% コンフルエントになったら, 継代培養を行った。

#### 1-3. 海馬神経細胞の初代培養

胎生 18 日目の Wister ラット (日本 SLC, 日本クレア) の全脳を Solution G (0.4% Glucose を含む PBS (pH 7.4, GIBCO)) 中に回収した。速やかに海馬のみ摘出し, Solution A+ (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) 中に回収した。37°C で 20 分インキュベートした後, 上清を除いて, Solution A- (0.18% Glucose, 0.1% BSA, 0.0012% DNase を含む PBS pH 7.4) を 2 ml を加え, パスツールピペットによるピペッティングを 4 回行い, さらに Solution A- を 6 ml 加え, 37°C で 15 分インキュベートした。海馬組織から乖離した細胞を含んだ上清を氷上の別のチューブに回収し, 沈殿している海馬組織に新たに Solution A- を加えて, 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海馬組織の細胞が完全に乖離されるまで繰り返し行なった。遠心分離 (1,000 rpm, 4°C, 15 分) により回収した神経細胞を 10% FBS 含有 Neurobasal medium (GIBCO) 5 ml に再懸濁し, 細胞数を血球計算盤でカウントした後, poly-D-Lysine (Sigma) あるいは L1-Fc (下記に記述) でコートした 13 mm ガラスカバースリップ (MATSUNAMI) もしくはガラスボトムディッシュ (MATSUNAMI) に細胞を播種した。神経細胞は, 2% B-27 supplement (GIBCO), 1mM Glutamine (Sigma) を含む Neurobasal medium で培養した

(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。長期培養するときは、3日に1度、培養液を半分量交換した。

## 2. プラスミド

### 2-1. 遺伝子発現ベクターの構築

ラット Cortactin の cDNA は、成体ラットの脳の cDNA ライブラリー (CLONTECH) を template として、プライマー (下記表参照) を用いて PCR 反応を行い、増幅された DNA を pBluescript I SK (+) (Stratagene) にサブクローニングした。シーケンスにより塩基配列に変異が無いことを確認し、動物細胞への遺伝子導入のための発現ベクター及びタンパク質精製の発現ベクターに組み込んだ。Shootin1 および Cortactin の切断型変異体は、それぞれ pBluescript-shootin1, pBluescript-cortactin を template として PCR 反応を行い、上記と同様の手順で目的の発現ベクターに組み込んだ。

表 1. プライマー一覧

遺伝子名 (付加したサイト)	プライマー	発現ベクター
Cortactin (BamH I)	5'-CTGGATCCATGTGGAAAGCTTCT	pCAGGS-myc
	GCAGGC-3'	pEGFP-C1
	5'-CTGGATCCCTACTGCCGCAGCTC	pCMV-myc
	CACATAG-3'	pCMV-FLAG pGEX-6P-1

### 2-2. 発現抑制ベクターの構築

Cortactin の発現抑制を行う際に使用したベクターの構築には、Invitrogen 社の BLOCK-iT Pol 2 miRNAi expression vector kit を用いた。ラット Cortactin の 2708 番目から 2728 番目 (miRNA#1 : 5'-GCAGCACAGCATGTCCTTGTA-3') と、1719 番目から 1739 番目 (miRNA#2 : 5'-TACATCGCGTCTGCGTGTGTT-3') を標的とする塩基配列を同キット内の pcDNA 6.2-GW/EmGFP-miRNA vector に ligation し、発現抑制ベクターを構築した。ネガティブコントロールとして、同キットに添付されていた pcDNA 6.2-GW/EmGFP-miRNA-neg vector を使用した。このベクターが遺伝子導入された細胞は GFP を発現するため、GFP 陽性の神経細胞において評価を行った。



### **3. 遺伝子導入**

#### **3-1. HEK293T 細胞および COS-7 細胞への遺伝子導入**

HEK293T 細胞および COS-7 細胞への遺伝子導入は、リン酸カルシウム法により行った。遺伝子導入前に培養液を交換し、3 時間培養した (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。プラスミド DNA を含む 250 mM CaCl<sub>2</sub> 溶液に、等量の 2×BES (pH 7.0) をオートピペッターで泡立てながら滴下し、滴下後 25 分間静置した。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、新しい培養液に交換し、さらに 24 時間培養した後に目的の実験に使用した。

#### **3-2. XTC 細胞への遺伝子導入**

XTC 細胞への遺伝子導入は、リポフェクション法により行った。あらかじめ細胞を 6 穴プレート (greiner bio-one) に播種し、細胞を 60-70% コンフルエントになるまで 1-5 日間培養した。100 μl の L-15 medium に FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche) とプラスミド DNA を 6:1, 6:2, 3:2 になるように混合し、室温で 15 分間静置後、混合液を細胞上に滴下し、目的の実験に使用するまで遮光して培養した。

#### **3-3. 海馬神経細胞への遺伝子導入**

海馬神経細胞への遺伝子導入は、Rat Neuron Nucleofector Kit (Lonza) を用いたエレクトロポレーション法で行った。材料と方法 1-3 に示した方法に従って回収した海馬神経細胞を遠心 (1,000 rpm, 4°C, 15 分) により回収し、PBS に再懸濁した。1.0×10<sup>6</sup> 個の細胞を含む PBS (1 反応あたり) を遠心 (1,000 rpm, 4°C, 15 分) し、上清を取り除いた後、回収した細胞を 75 μl の Rat Neuron Nucleofector Solution と 18 μl の Supplement (1 反応あたり) の混合液で再懸濁した。3~10 μg のプラスミド DNA を加えて、専用キュベットに入れ、Nucleofector 装置 (Lonza) のプログラム“O-03”により遺伝子導入した。キュベットから回収した細胞を 10% FBS 含有 Neurobasal medium に懸濁し、細胞数を血球計算盤でカウントした後、poly-D-Lysine あるいは L1-Fc でコートした 13 mm ガラスカバースリップもしくはガラスボトムディッシュに細胞を播種した。3 時間培養 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 後、2% B-27 supplement, 1mM Glutamine を含む Neurobasal medium に交換し、実験に用いるまで培養を行った。

発現抑制ベクターを遺伝子導入した際は、遺伝子導入後に、キュベットから回収した細胞を 10 ml の Neurobasal medium (2% B-27 supplement, 1mM Glutamine, 10% FBS) に懸濁し、24 時間浮遊培養した (37°C, 5%

CO<sub>2</sub>)。冬培養後、細胞を回収し、上記の通り細胞を播種し、実験に用いるまで培養を行った。

#### **4. コーティング用の L1-Fc の作製**

HEK293T 細胞を 80%コンフルエントになるまで培養 (直径 10 cm dish) し、1 dish あたり 40 µg の pCAGGS-L1-Fc ベクターをリン酸カルシウム法により遺伝子導入した。24 時間後に DMEM で洗浄し、48 時間 DMEM (FBS-free) で培養した。その後、培養液を回収し、遠心 (3,500 rpm, 4°C, 25 分) によりゴミを取り除き、さらに滅菌フィルター (0.22 µm) を用いて濾過滅菌し、コーティングに用いた。

#### **5. ガラスカバースリップ及びガラスボトムディッシュのコーティング**

##### **5-1. Poly-D-lysine (PDL)**

ガラスカバースリップまたはガラスボトムディッシュに 1 mg/ml の PDL をのせ、37°C で 4 時間以上インキュベートした。

##### **5-2. L1-Fc**

PDL コートしたカバースリップまたはガラスボトムディッシュに抗 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 で一晩インキュベートした。

#### **6. 免疫共沈降**

##### **6-1. 培養細胞における免疫共沈降**

上記の方法で遺伝子導入した COS-7 細胞または HEK293T 細胞を 2 日間培養し、目的のタンパク質を発現させた。培養液を取り除き PBS で細胞を洗浄した後、ディッシュに NP-40 lysis buffer (0.5% NP-40, 20 mM HEPES pH 7.5, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT) 500 µl を加え、スクレイパーを用いて細胞を掻き取った。細胞懸濁液を氷上で 10 分間静置し、遠心 (15,000 rpm, 4°C, 10 分) した後、上清を回収した。上清に 1 µg の抗体を加え、4°C で 1 時間回転混和した。その後、溶液を遠心 (15,000 rpm, 4°C, 15 分) し、上清を回収し、予め NP-40 buffer で平衡化した Protein G-Sepharose 4B (GE healthcare) 15 µl を加え、4°C で 1 時間回転混和した。反応後、溶液を遠心 (2000 rpm, 4°C, 1 分) により Protein G-Sepharose 4B を沈殿させ、上清を取り除いた。Protein G-Sepharose 4B を 1 ml の NP-40 lysis buffer で懸濁し、遠心し上清を取り除いた。この操作を計 3 回行い、Protein G-Sepharose 4B を洗浄した。

洗浄した Protein G-Sepharose 4B に 20  $\mu$ l の 2 $\times$ SDS sample buffer を加え、SDS-PAGE に用いるサンプルとした。

## 6-2. ラット脳サンプルを用いた免疫共沈降

生後 6 日目のラットより全脳を取り出し、氷冷した PBS に浸し、血液成分等を洗浄した。その後、Homogenate buffer を脳重量の 3 倍量加え、ホモジナイザーを用いて脳組織を破碎した。700G で 5 分間 2 回遠心し、未破碎細胞および核画分を沈殿させ取り除いた上清を超遠心 (10 万 G, 4 $^{\circ}$ C, 30 分) し、Cytosol 成分を含む可用性画分と細胞膜や細胞骨格成分を多く含む不溶性画分に分画した。可用性画分を 0.45  $\mu$ m のフィルターで濾過し、1.5 ml チューブに 500  $\mu$ l ずつ分注した。そこに抗体を加え、4 $^{\circ}$ C で一晩回転混和し、予め Homogenate buffer で平衡化した Protein G-Sepharose 4B を加え 1 時間反応させた。反応終了後、遠心 (2000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 1 分) により Protein G-Sepharose 4B を沈殿させ上清を取り除き、Wash buffer (0.5% Tween 20, 20 mM HEPES pH 7.5, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT) を加えて穏やかに攪拌した。この操作を 5 回繰り返した後、上清をきれいに取り除き、そこに 2 $\times$ SDS sample buffer を加え、SDS-PAGE に用いるサンプルとした。

## 7. タンパク質精製

pGEX-6P-1 vector を大腸菌 BL21 (codon plus) に形質転換し、シングルコロニーを抗生物質としてアンピシリンを含む LB 培地で一晩振盪培養を行った。その後、この培養液を新たに用意したアンピシリン含有 LB 培地に移し培養 (200 rpm, 37 $^{\circ}$ C) し、OD:600 が 0.4~0.7 になるまで培養を行った。目標値に達した後、培地を 20 $^{\circ}$ C (Shootin1) あるいは 23 $^{\circ}$ C (Cortactin) に冷却し、IPTG を終濃度 0.1 mM になるように加え、20 $^{\circ}$ C あるいは 23 $^{\circ}$ C で 5 時間振盪培養 (150 rpm) を行った。培養終了後、遠心により菌体を回収し、氷冷した PBS に再懸濁し、再び遠心により菌体を回収した。菌体重量を測定し、菌体重量の 3 倍量の TED buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) を加えて懸濁し、氷上で超音波破碎した。破碎後の溶液を超遠心 (10 万 G, 4 $^{\circ}$ C, 60 分) し、上清を回収した。回収した上清を 0.45  $\mu$ m のフィルターを用いて濾過し、pH を 8.0 に調節した。そこに、予め TED で平衡化した Glutathione sepharose 4B (GE healthcare) を加え、4 $^{\circ}$ C で 3 時間回転混和した。150 mM NaCl を加えた TED buffer で Glutathione sepharose 4B を洗浄し、15 mM 還元型グルタチオンを含む TED buffer で GST 融合タンパク質を溶出した。その後、

PreScission Protease (GE healthcare) と反応させ、GST を切断した。GST は Glutathione sepharose 4B により除去し、GST 切断型タンパク質を回収した。回収したタンパク質は Mini Dialysis Kit (GE healthcare) を用いて TED buffer で透析した。

### **8. In vitro binding assay と in vitro kinase reaction**

精製した FLAG-cortactin (80 nM) と Myc-shootin1 (80 nM) を Reaction buffer (0.3% CHAPS, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) 500  $\mu$ l に加え、4°C で一晩回転混和した。その後、溶液を遠心 (15,000 rpm, 4°C, 15 分) し、上清を回収し、予め Reaction buffer で平衡化した Anti-FLAG M2 affinity gel (SIGMA-ALDRICH) を 15  $\mu$ l 加え、4°C で 2 時間回転混和した。反応終了後、150 mM NaCl を加えた Reaction buffer で 3 回洗浄、TED buffer で 2 回洗浄し、TED buffer で溶かした FLAG peptide (400 ng/ $\mu$ l, SIGMA-ALDRICH) を 50  $\mu$ l 加え、4°C で 1 時間回転混和しながら溶出を行った。その後、遠心 (6,000 G, 4°C, 30 sec) し、上清を回収し、5×SDS sample buffer を加え、SDS-PAGE に用いるサンプルとした。

*In vitro* での PAK1 による Shootin1 のリン酸化は、250 ng の active GST-PAK1 (Invitrogen) と 2.1  $\mu$ g の精製 Shootin1 を 20  $\mu$ l の kinase buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 125  $\mu$ M ATP) 中に混合し、30°C で 120 分反応させた。

### **9. F-actin sedimentation assay**

0.4 mg/ml の Non-muscle Actin (human platelet) (Cytoskeleton) に 1/10 量の polymerization buffer (500mM KCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM ATP) を加え、室温で 1 時間重合させた。超遠心 (10 万 G, 4°C, 60 分) により重合したアクチン線維を沈降させ、上清を取り除き RM+ATP buffer (20mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.5 mM DTT, 0.5 mM ATP) で溶解した。7.5  $\mu$ g のアクチン線維と Shootin1-myc (1.5  $\mu$ M) および Cortactin (1.5  $\mu$ M) を混合し、室温で 1 時間反応させた。10% Sucrose を含む RM+ATP buffer の入った遠心管に、反応溶液をゆっくりと加え、超遠心 (10 万 G, 4°C, 60 分) によりアクチン線維を沈降させた。RM+ATP buffer で 3 回洗浄し、反応溶液と同じ組成の buffer でペレットを溶解し、2×SDS sample buffer を加え、SDS-PAGE に用いるサンプルとした。

## 10. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE後のアクリルアミドゲルからPVDF膜 (Millipore) へのタンパク質の転写には, Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell (Bio-Rad) を使用し,  $2 \text{ mA/cm}^2$  で転写した (室温, 90分)。転写後のPVDF膜を3% Skim milkを含むTBS (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl) 溶液でブロッキング (室温, 60分) し, 3% Skim milkを含むTBSで一晩4°Cで, 一次抗体反応を行った。一次抗体反応後, PVDF膜を0.05% Tween 20を含むTBS (TBST) で3回洗浄し, TBSTで室温1時間, 二次抗体反応を行った。その後, TBST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) に感光させて検出した。

## 11. 免疫細胞染色

神経細胞が培養されている24穴プレート (IWAKI) に7.4%ホルマリンを含むPBSを500  $\mu\text{l}$  加え (終濃度3.7%), 氷上で10分間固定した。そこに氷冷したPBSを2 ml加え, アスピレーターで吸い取り, 新たなPBSを2 mlを加えた。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。アスピレーターでPBSを完全に吸い取り, そこに-20°Cに冷却したメタノールを加え, -20°Cで10分間静置した。アクチン線維の染色を行う際は, 0.05% Triton X-100を含むPBSを加え, 氷上で15分間静置した。透過処理終了後, アスピレーターでメタノール完全に吸い取り, すばやく10% FBSを含むPBSを500  $\mu\text{l}$  を加え, 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穴プレートの蓋に移し, 10% FBSを含むPBSで希釈した一次抗体を加え, 4°Cで一晩反応させた。一次抗体反応終了後, 24穴プレートの蓋に氷冷したPBSを流し込み, カバースリップを3 mlのPBSを入れた24穴プレートに移し, 氷上で1時間静置した。その後, 一次抗体反応時と同様にカバースリップを蓋に移し, PBSで希釈した二次抗体を加え, 遮光して室温で1時間反応させた。アクチン線維の染色を行う際には, 二次抗体反応中に100倍希釈したAlexa Fluor 350 Phalloidinを加え反応を行った。二次抗体反応終了後, PBSを蓋に流し込み, カバースリップを3 mlのPBSを入れた24穴プレートに移し, 室温で1時間静置した。その後, カバースリップをスライドガラス (MATSUNAMI) に移し, カバーガラス (MATSUNAMI) を上にのせ, 50% Glycerolを含むPBSで封入し, マニキュアで密閉した。その後, 蛍光顕微鏡 (Axio plan 2, Carl Zeiss) で観察した。

免疫細胞染色における抗体の希釈条件を以下に示す。

表 2. 一次抗体一覧

抗体名	免疫動物と種類	メーカー	希釈倍率
anti-shootin	rabbit, polyclonal	MBL, 研究室にて精製	x100
anti-cortactin	mouse, monoclonal (4F11)	Millipore	x500
anti-GFP	chicken, polyclonal	Aves Labs	x500
anti-myc-tag	rabbit, polyclonal	MBL	x2000
anti-tau-1	mouse, monoclonal	Chemicon	x500

表 3. 二次抗体一覧

抗体名	メーカー	希釈倍率
Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG	Molecular Probes	x1000
Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG	Molecular Probes	x1000
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG	Molecular Probes	x1000
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG	Molecular Probes	x1000
Alexa Fluor 350 goat anti-mouse IgG	Molecular Probes	x500
Fluorescein-labeled goat anti-chicken IgY	Aves Labs	x500

## 12. 神経細胞の形態の定量解析

それぞれの免疫染色画像を取り込み、定量ソフト ImageGauge (Fujifilm) または ImageJ (NIH) で解析を行い、神経突起の長さや細胞内での蛍光強度を測定し、数値化したデータを得た後、表計算ソフト Excel (Microsoft) により統計解析および有意差検定を行った。

## 13. 細胞内一分子計測

細胞内一分子計測は、EGFP または mCherry または mRFP を融合したタンパク質を遺伝導入した細胞を使用して行った。XTC 細胞においては、観察を開始する前に、細胞をガラスボトムディッシュに移し、37°C で 30 分培養した。神経細胞においては、観察を開始する 3 時間以上前に培養液を 2% B-27 supplement および 1mM Glutamine を含む 70% L-15 medium に置換し、37°C で培養した。その後、蛍光顕微鏡 (Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) または BX52 (Olympus)) 上に置き観察した。蛍光イメージは、露

出 1.5~2 秒, 5 秒間隔で取得した。取得した蛍光イメージから, ImageJ を用いてキモグラフを作成し, 蛍光スペックルの速度を定量した。

#### **14. ビーズトラッキング**

直径 1  $\mu\text{m}$  のカルボキシルポリスチレンビーズ (Spherotech) を 8% Glutaraldehyde で 6 時間処理し, 25 mM  $\text{NaPO}_4$  (pH 7.0) で 3 回洗浄した。その後, 400  $\mu\text{g/ml}$  Protein A (GE healthcare) で処理した (室温, 4 時間)。50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で 3 回洗浄後, 7.5 mg/ml BSA で処理し (室温, 2 時間), 10  $\mu\text{g/ml}$  L1-Fc でコーティングした (4°C, 一晚)。観察を開始する 3 時間以上前に培養液を 2% B-27 supplement および 1mM Glutamine を含む 70% L-15 medium に置換し, 37°C で培養した。その後, 蛍光顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-U (Nikon), plan-Apo 60x W1 1.20 NA (Nikon), EM-CCD camera (C9100; Hamamatsu)) にセットし, 光ピンセットを用いてビーズを成長円錐上に載せた。1 秒間隔で計 5 分間撮影を行い, 画像を取得した。取得した画像は, ImageJ により解析し, ビーズの速度を定量した。

#### **15. Traction force microscopy**

直径 200 nm の蛍光ナノビーズ (FluoSpheres carboxylate-modified microspheres; Invitrogen) を埋め込んだポリアクリルアミドゲルの表面を L1-Fc コーティングし, その上で神経細胞を培養した。観察を開始する 3 時間以上前に培養液を 2% B-27 supplement および 1mM Glutamine を含む 70% L-15 medium に置換し, 37°C で培養した。その後, 共焦点顕微鏡上に置き観察した。Axio Observer Z1 (C-Apochromat 63x/1.20 W Korr M27, LSM 710 scan module, ZEN2009, Carl Zeiss) を用いて蛍光イメージを取得した。観察後, 1% SDS を加えて細胞を溶かし, ビーズの初期位置の画像を取得した。取得した蛍光イメージから, MATLAB (MathWorks) の計算アルゴリズムを使用して成長円錐下の牽引力を定量した。

#### **16. 有意差検定**

Unpaired Student *t* tests を用いて有意差の検定を行った。図 16B のグラフにおいてのみ, 多群比較のために ANOVA によって多重比較検定を行った後, Shaffer's *post hoc* test を行った。

## < 結果 >

### 1. 新規クラッチ分子候補のスクリーニング

アクチン線維と Shootin1 との相互作用を仲介する新規クラッチ分子を探索するために、タグ (FLAG, Myc, EGFP) を付けたアクチン結合タンパク質と Shootin1 を培養細胞 (HEK293T 細胞または COS-7 細胞) に共発現させ、免疫共沈降法により Shootin1 と相互作用するアクチン結合タンパク質を探索した。9 種類のアクチン結合タンパク質 (Fascin, VASP, p21-ARC, Esp8, XAC2, Capping protein  $\beta$ 1, Profilin1, Profilin2a, Cortactin) で免疫共沈降を試みたところ、Profilin2a と Cortactin が Shootin1 と相互作用するアクチン結合タンパク質として同定された (図 3)。その他の分子においては、Shootin1 との相互作用は認められなかった (表 4)。

クラッチ分子はアクチン線維の逆行性移動と相互作用するため、クラッチ分子自身も逆行性に移動する [12]。そこで、二次スクリーニングとして、同定された Profilin2a と Cortactin が逆行性に移動するのかを検討した。それぞれの EGFP 融合タンパク質をアフリカツメガエル由来線維芽細胞株 XTC 細胞に発現させ、細胞内一分子計測を行った。XTC 細胞における EGFP-profilin2a の分子挙動を解析したところ、逆行性に移動する様子は観察されなかった (表 4)。一方、EGFP-cortactin の分子挙動を解析したところ、XTC 細胞において EGFP-cortactin が逆行性に移動することがわかった (図 4, 動画 1)。このことから、Cortactin がクラッチ分子として機能する可能性が考えられたので、以降の実験では Cortactin に着目した。

### 2. 内在性 Cortactin と Shootin1 は相互作用し、これらは直接結合する

神経細胞における内在性 Cortactin の局在を解析するために、胎生 18 日 (E18) のラットの海馬神経細胞を初代培養し、培養 2 日後に抗 Cortactin 抗体と抗 Shootin 抗体を用いて神経細胞の免疫染色を行った。神経細胞において、Shootin1 は軸索の先端に局在しているのに対し、Cortactin は軸索以外の神経突起の先端にも局在していた (図 5A)。Cortactin と Shootin1 は軸索の先端でのみ共局在することがわかった。成長円錐におけるさらに詳しい局在を解析したところ、Cortactin は成長円錐の末端領域に多く存在し、この領域において Shootin1 と共局在していた (図 5B)。

次に、内在性 Cortactin と Shootin1 が相互作用するのかを解析するために、生後 6 日 (P6) のラットの脳からタンパク質を回収し、免疫共沈降



を行った。抗 Shootin 抗体を用いて内在性 Shootin1 を免疫沈降したところ、内在性 Cortactin が共沈降した (図 6A)。

続いて、これらが直接結合するのかを精製タンパク質を用いた *in vitro* binding assay により検討した。精製した FLAG-cortactin と Myc-shootin1 を混合し、抗 FLAG 抗体を用いて FLAG-cortactin を免疫沈降したところ、Myc-shootin1 が共沈降した (図 6B)。このことから、Cortactin と Shootin1 は直接結合することが明らかになった。

以上のことから、成長円錐の末端領域において、内在性 Cortactin と Shootin1 は相互作用し、これらは直接結合することが示唆された。

### **3. Cortactin は逆行性に移動するアクチン線維と相互作用する**

成長円錐における内在性 Cortactin とアクチン線維の局在を解析するために、抗 Cortactin 抗体と Phalloidin を用いて神経細胞の免疫染色を行った。成長円錐の末端領域には逆行性に移動するアクチン線維が多く存在し、この領域において Cortactin は、逆行性に移動すると考えられるアクチン線維と共局在することがわかった (図 7)。

次に、Cortactin が逆行性に移動するアクチン線維と相互作用するのかを検討するために、まず、mCherry-actin と EGFP-cortactin を XTC 細胞に共発現させ、同時に細胞内一分子計測を行い、蛍光一分子像 (以後、スペckル) の速度を比較した。その結果、mCherry-actin のスペckル ( $5.29 \pm 0.11 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $n = 30$ ) と EGFP-cortactin のスペckル ( $5.21 \pm 0.14 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $n = 30$ ) はほとんど同じ速度で逆行性に移動することがわかった (図 8A, 動画 2)。さらに、アクチンの重合を阻害した時に Cortactin はアクチンと同様な挙動を示すのかを検討した。細胞内一分子計測を行なっている時に、アクチンの重合阻害剤である Cytochalasin D を  $1 \mu\text{M}$  添加した。その結果、アクチンのスペckル同様に、Cytochalasin D を添加すると、Cortactin のスペckルが消失し、細胞の中心部で凝集した (図 8B, 動画 3)。Cytochalasin D で処理すると、先端端のアクチン線維ネットワークが崩壊することが報告されており [6, 25]、本実験で観察された Cortactin の挙動は、これらの結果と一致した。これらのことから、Cortactin は逆行性に移動するアクチン線維と相互作用することが示唆された。

次に、成長円錐においても Cortactin が逆行性に移動するアクチン線維と相互作用するのかを検討した。培養海馬神経細胞に EGFP-cortactin を遺伝子導入し、培養 3 日目で細胞内一分子計測を行った。成長円錐において、EGFP-cortactin は逆行性に移動することがわかった (図 9A, 動画

4)。また、細胞内一分子計測中に Cytochalasin D を 1  $\mu$ M 添加したところ、XTC 細胞の時と同様に、EGFP-cortactin のスペckルが消失し、成長円錐の中心部で凝集する様子が観察された (図 9B, 動画 5)。

以上の結果から、成長円錐において Cortactin は、逆行性に移動するアクチン線維と相互作用することが示唆された。

#### **4. Cortactin はアクチン線維と Shootin1 の連結を仲介する**

上記のように、Cortactin は Shootin1 および逆行性に移動するアクチン線維と相互作用することが示唆された。そこで、アクチン線維と Shootin1 の連結を Cortactin が仲介するのかを検討するために、まず F-actin sedimentation assay を行った。アクチン結合タンパク質である Cortactin はアクチン線維と共沈降し、アクチン線維と直接結合することが確認された (図 10)。一方、Shootin1 はアクチン線維と共沈降せず、直接結合は認められなかった (図 10)。しかし、これに Cortactin を加えることにより、Shootin1 がアクチン線維と共沈降した (図 10)。このことから、*in vitro* において、Cortactin がアクチン線維と Shootin1 の連結を仲介することが示唆された。

続いて、*in vivo* においてアクチン線維と Shootin1 の連結を Cortactin が仲介するのかを検討するために、RNAi 法により Cortactin を発現抑制させた神経細胞における、内在性 Shootin1 の局在への影響を解析した。解析に先立ち、Cortactin に対する miRNA の効果を検討した。培養海馬神経細胞に Cortactin に対する miRNA を遺伝子導入し、それらからタンパク質を抽出し、抗 Cortactin 抗体によるウエスタンブロッティングを行った。その結果、コントロール細胞に対し、Cortactin miRNA を導入した神経細胞では Cortactin の発現が低下した (図 11A)。また、miRNA を導入した神経細胞 (GFP 陽性) について、抗 Cortactin 抗体による免疫細胞染色を行った結果、コントロール miRNA を導入した神経細胞と比較し、miRNA #1, #2 共に抗 Cortactin 抗体による染色強度が低下していた (図 11B)。このことから、作成した miRNA は内在的に発現する Cortactin の発現を抑制することがわかった。次に、RNAi 法により Cortactin の発現を抑制させた神経細胞を、抗 Cortactin 抗体と抗 Shootin 抗体を用いて免疫細胞染色を行い、神経突起先端の Shootin1 の濃縮を比較した。Shootin1 は軸索が長いほど成長円錐に濃縮しやすいことが報告されている [26]。そのため、Cortactin の発現を抑制してもコントロール細胞と軸索の長さが同じ (後述, 結果 7) だった poly-D-lysine (以後, PDL) コーティング上で神経細胞を培養した。その結果、コントロール細胞においては、こ

れまでの報告と同じように[11], Shootin1 が軸索の先端に濃縮した (図 12A)。一方, Cortactin を発現抑制させた神経細胞においては, 軸索先端での Shootin1 の濃縮が減少した (図 12A)。そこで, 神経細胞の軸索先端における内在性 Shootin1 の染色強度を定量した。その結果, 神経細胞の軸索先端における内在性 Shootin1 の染色強度の相対比は, コントロール細胞を 1 ( $n = 3, 79$  cells;  $n = 3, 64$  cells) とすると, Cortactin を発現抑制させた細胞 miRNA #1 では,  $0.48 \pm 0.06$  ( $n = 3, 85$  cells), miRNA #2 は  $0.49 \pm 0.10$  ( $n = 3, 61$  cells) となり, 有意に減少していた (図 12B,  $p < 0.05$ )。さらに, Cortactin を発現抑制させた神経細胞におけるアクチン線維への影響を検討した。神経細胞を上記と同様な方法で培養し, Phalloidin を用いて免疫細胞染色を行った。その結果, Cortactin を発現抑制してもアクチン線維の染色像に影響は認められなかった (図 13A)。またアクチン線維の染色強度を定量したところ, コントロール細胞を 1 ( $n = 3, 110$  cells) とすると, Cortactin を発現抑制させた細胞では,  $1.2 \pm 0.2$  ( $n = 3, 110$  cells) となり, 有意な差は認められなかった (図 13B)。

以上の結果より, *in vivo* においても, Cortactin がアクチン線維と Shootin1 の連結を仲介することが示唆された。

## **5. Cortactin はアクチン線維と細胞接着分子 L1 を連結するクラッチ分子として機能する**

以上, アクチン線維と Shootin1 の連結は Cortactin を介している可能性が示唆された。これまでに, クラッチ分子によりアクチン線維と細胞接着分子との連結が起こると, 先端端でのアクチン線維の逆行性移動の速度が遅くなると考えられている[27-29]。そこで, Cortactin の発現を抑制させ, アクチン線維と細胞接着分子 L1 の連結を弱めた時の, アクチン線維の逆行性移動速度への影響を解析するために, Cortactin を発現抑制させた神経細胞におけるアクチン線維の細胞内一分子計測を行った。L1-Fc でコーティングされたガラスボトムディッシュ上で神経細胞を培養し, 培養 3 日目で GFP 陽性の神経細胞における mRFP-actin の細胞内一分子計測を行った (図 14A)。その結果, コントロール細胞における mRFP-actin のスペックルの速度は  $3.4 \pm 0.12 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 30$ ) であり, 一方, Cortactin を発現抑制させた細胞における mRFP-actin のスペックルの速度は miRNA #1 が  $4.3 \pm 0.12 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 30$ ), miRNA #2 が  $4.3 \pm 0.14 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 30$ ) と有意にスペックルの速度が速くなった (図 14B,  $p < 0.01$ )。また, 神経細胞を Netrin-1 (後述, 結果 8) で刺激 (300 ng/ml, 1 時間) で刺激すると, コントロール細胞における mRFP-actin のスペック

ルの速度は  $2.8 \pm 0.10 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 30$ ) となり、有意に遅くなった (図 14B,  $p < 0.02$ )。この結果は先行研究の結果と一致した[30]。一方、Cortactin を発現抑制させた細胞における mRFP-actin のスペックルの速度は miRNA #1 が  $5.2 \pm 0.13 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 30$ )、miRNA #2 が  $5.8 \pm 0.14 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 30$ ) と Netrin-1 刺激前に比べて有意に速くなった (図 14B,  $p < 0.01$ )。

次に、Cortactin を介してアクチン線維の逆行性移動が細胞接着分子 L1 に伝わっているのかをビーズトラッキング法により検討した。Cortactin を発現抑制させた神経細胞を L1-Fc コートしたガラスボトムディッシュ上に播種した。培養 3 日目に L1-Fc コーティングした直径  $1 \mu\text{m}$  のビーズを加え、光ピンセットを用いてビーズを成長円錐上に載せ、タイムラプス観察を行い、移動したビーズにおける速度を定量した。コントロール細胞 (図 15A) において、L1 コーティングビーズの 70% (図 15C 左,  $n = 54$ ) が逆行性に移動し、速度の平均は  $0.93 \pm 0.07 \mu\text{m}/\text{min}$  (図 15C 中央,  $n = 38$ ) だった。一方、Cortactin を発現抑制させた細胞 (図 15B) においては、L1 コーティングしたビーズの 69% (図 15C 左,  $n = 55$ ) が逆行性に移動し、速度の平均は  $0.48 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$  (図 15C 中央,  $n = 38$ ) で有意に減少した ( $p < 0.01$ )。また、ヒストグラム解析から、移動したビーズの速度のピークが Cortactin の発現を抑制させることにより、実質的に  $0.8\text{-}1.0 \mu\text{m}/\text{min}$  から  $0.2\text{-}0.4 \mu\text{m}/\text{min}$  に減少した (図 15C 右)。

以上の結果より、Cortactin はアクチン線維と細胞接着分子 L1 を連結し、アクチン線維の逆行性移動を細胞接着分子 L1 に伝えるクラッチ分子として機能することが示唆された。

## **6. Shootin1 による軸索伸長は Cortactin 依存的である**

結果 4 において、Cortactin と Shootin1 は軸索の先端でのみ共局在することがわかった。また先行研究により、Shootin1 を過剰発現すると、軸索を複数本持つ神経細胞の割合が増加することがわかっている[11]。これらのことから、Shootin1 による軸索伸長は Cortactin に依存する可能性が考えられた。そこで、この可能性を検証するために、Shootin1 を過剰発現させた細胞で Cortactin の発現を抑制した時の複数本の軸索を持つ細胞の割合を検討した。Cortactin に対する miRNA と Myc-shootin1 (過剰発現ベクター pCAGGS) を同時に遺伝子導入し、1 日浮遊培養後に L1-Fc コートしたカバースリップ上に播種し 5 日間培養した。その後、抗 Myc 抗体による免疫染色を行い、2 本以上の軸索を持つ神経細胞の割合を定量した。なお、ポジティブコントロールにはコントロール miRNA と

Myc-shootin1 を遺伝子導入した細胞を，ネガティブコントロールにはコントロール miRNA と Myc-GST を遺伝子導入した細胞を用いた。その結果，ネガティブコントロールの細胞は，軸索マーカーの Tau-1 陽性の長い神経突起を 2 本以上持つ細胞が  $13.5 \pm 3.3\%$  ( $n = 4, 94$  cells) みられ (図 16A 上段左，図 16B)，ポジティブコントロールの細胞は， $37.2 \pm 3.9\%$  ( $n = 4, 95$  cells) の細胞が複数本の軸索を形成しており (図 16A 上段右，図 16B)，複数本の軸索を持つ神経細胞の割合が有意に増加した (図 16B,  $p < 0.01$ )。この結果は，先行研究の結果とほぼ一致した [11]。一方，Cortactin の発現を抑制した細胞に Shootin1 を過剰発現させた細胞では，miRNA#1 の細胞が  $15.4 \pm 3.1\%$  (図 16A 下段左，図 16B)，miRNA#2 の細胞が  $17.1 \pm 3.4\%$  (図 16A 下段右，図 16B) の割合で複数本の軸索を形成し，ポジティブコントロールと比較すると有意にその割合が減少し (図 16B,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.02$ )，Cortactin の発現抑制により Shootin1 による軸索伸長が抑制された。また，Cortactin の発現を抑制した細胞で，Shootin1 を過剰発現しても，軸索を複数本形成する神経細胞の割合はネガティブコントロールとほぼ同じ割合であることがわかった (図 16B)。

以上の結果より，Shootin1 による軸索伸長は Cortactin 依存的であることが示唆された。

## **7. Cortactin は L1 依存的な軸索伸長に関与する**

上記までに，Cortactin を介してアクチン線維の逆行性移動と細胞接着分子 L1 が連結することでアクチン線維の駆動力が L1 に伝わり，その結果，Cortactin が牽引力の発生に関与することが示唆された。次に，Cortactin を発現抑制させた細胞を L1 コーティング上で培養した時の軸索伸長への影響を検討した。Cortactin を発現抑制させた神経細胞を L1 コーティングしたカバースリップ上に播種した。培養 3 日目に抗 Cortactin 抗体を用いて免疫細胞染色を行った。Cortactin に対する miRNA を遺伝子導入した神経細胞において，GFP 陽性であり，かつ Cortactin の発現が抑制されている神経細胞について軸索 (一番長い突起) の解析を行った (図 17A)。L1 コーティング上で培養した細胞において，コントロール細胞の軸索の長さは  $188.5 \pm 18.4 \mu\text{m}$ ， $146.1 \pm 14.0 \mu\text{m}$  (図 17B 左， $n = 4, 130$  cells；図 17B 右， $n = 5, 147$  cells) であるのに対し，Cortactin を発現抑制させた細胞 miRNA #1 の軸索の長さは  $84.4 \pm 4.1 \mu\text{m}$  (図 17B 左， $n = 4, 138$  cells)，miRNA #2 の軸索の長さは  $82.2 \pm 9.2 \mu\text{m}$  (図 17B 右， $n = 5, 169$  cells) と有意に短くなった (図 17B 左， $p < 0.01$ ；図 17B 右， $p < 0.01$ )。一方，PDL コーティング上で培養した細胞においては，コントロール細

胞の軸索の長さは  $91.5 \pm 8.1 \mu\text{m}$ ,  $71.2 \pm 3.4 \mu\text{m}$  (図 17B 左,  $n = 4$ , 113 cells; 図 17B 右,  $n = 5$ , 140 cells) であり, Cortactin を発現抑制させた細胞 miRNA #1 の軸索の長さは  $74.2 \pm 4.2 \mu\text{m}$  (図 17B 左,  $n = 4$ , 113 cells), miRNA #2 の軸索の長さは  $64.9 \pm 4.4 \mu\text{m}$  (図 17B 右,  $n = 5$ , 123 cells) であり, 有意な差は無かった。Cortactin を発現抑制した細胞は, L1 コーティング上で培養することにより軸索伸長が抑制されるが, PDL コーティング上では, コントロール細胞と軸索の長さが変わらないことから, Cortactin は L1 依存的な軸索伸長に関与することが示唆された。

## **8. Cortactin と Shootin1 の結合は PAK1 を介した Shootin1 のリン酸化により促進される**

Netrin-1 は, 代表的な軸索誘引因子であり, 軸索が標的となる細胞に正しく誘導されるために重要な役割を果たす。本研究室において, Netrin-1 が受容体 DCC に結合すると Cdc42 と Rac1 が活性化し, これらにより PAK1 が活性化され, 活性化した PAK1 が Shootin1 の 101 番目のセリン残基と 249 番目のセリン残基を直接リン酸化することを明らかにした[30]。また, Shootin1 がリン酸化されることにより, クラッチの連結が増強し軸索が伸長することを明らかにした[30]。そこで, Cortactin と Shootin1 の結合が PAK1 により促進されるのかを検討するために, まず, Cortactin と Shootin1 のリン酸化体との結合能を比較した。精製した FLAG-cortactin と Shootin1 の野生型 (WT), 101 番目と 249 番目のセリン残基をアスパラギン酸に置換した擬似リン酸化体 (DD) を用いて *in vitro* binding assay を行い, 結合能を比較した。その結果, Shootin1 DD も Shootin1 WT と同様に Cortactin と結合した (図 18A)。また, Shootin1 DD のほうが Shootin1 WT よりも Cortactin とより強く結合した (図 18A)。これらの見かけ上の解離定数を求めたところ, Shootin1 DD の解離定数が  $11.5 \pm 1.2 \text{ nM}$ , Shootin1 WT の解離定数が  $25.0 \pm 4.9 \text{ nM}$  であり, Shootin1 DD のほうが Shootin1 WT よりも 2.2 倍有意に減少した (図 18B,  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ )。また, 精製 Shootin1 WT を *in vitro* で PAK1 によりリン酸化した後に *in vitro* binding assay を行ったところ, リン酸化していない Shootin1 よりも PAK1 でリン酸化した Shootin1 のほうが Cortactin との結合量が多かった (図 18C)。

次に, FLAG-cortactin と Myc タグを付加した Shootin1 WT, Shootin1 DD, 101 番目と 249 番目のセリン残基をアラニンに置換した非リン酸化体 (AA) を COS-7 細胞に同時に遺伝子導入し, 抗 FLAG 抗体による免疫共沈降を行い, 結合能を比較した。その結果, Shootin1 AA は Cortactin との

相互作用が認められなかったが, Shootin1 DD との相互作用は認められた (図 19A)。また, Shootin1 WT と比較すると, Shootin1 WT より Shootin1 DD のほうが Cortactin との結合量が多かった (図 19A)。さらに, Shootin1 WT と PAK1 の恒常活性化型変異体 (CA) もしくはドミナントネガティブ変異体 (KD) を COS-7 細胞に同時に発現させて, 抗 FLAG 抗体による免疫共沈降を行ったところ, PAK1 CA により Shootin1 のリン酸化が上昇し, Cortactin との結合量が増加した (図 19B)。一方, PAK KD を共発現させると, Shootin1 のリン酸化が減少し, Shootin1 と Cortactin との結合が抑制された (図 19B)。

以上のことから, Cortactin と Shootin1 の結合は, PAK1 を介した Shootin1 のリン酸化により制御されていることが示唆された。

## **9. Cortactin は Netrin-1 により誘導される軸索伸長のための牽引力の促進に参与する**

成長円錐が伸長する際に Cortactin が牽引力の発生に参与するのかを検討するために, Traction force microscopy を行った。Traction force microscopy は, 蛍光ナノビーズを埋め込んだ弾性のあるゲル上で神経細胞を培養し, 突起が伸長する際にゲルが変性し, それによりビーズが移動するので, それを顕微鏡下でモニターすることで牽引力を計測できる実験系である [31, 32]。培養海馬神経細胞を L1-Fc コートしたポリアクリルアミドゲル上に播種し, 培養 3 日目に共焦点顕微鏡を用いてタイムラプス観察を行った (図 20A, 動画 6)。成長円錐で牽引力が発揮されると, 蛍光ナノビーズは成長円錐中央に向かってダイナミックに移動する “load-and-fail” 様式に従って動くことが報告されており [32], 本実験結果はその結果と一致した。また, コントロール細胞を Netrin-1 で刺激するとビーズが刺激前よりも大きく移動した (図 20A, 動画 6)。そこで, ゲルの弾性とビーズの移動度から牽引力を定量すると, 刺激前が  $3.8 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$  だったのに対し, Netrin-1 刺激後は  $6.0 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$  ( $n = 10$  growth cones) と牽引力が上昇した (図 20B)。この結果は, Netrin-1 がクラッチの連結を増強させ牽引力が上昇する過去の結果と一致した [30]。一方, Cortactin を発現抑制させた細胞においては, Netrin-1 刺激前の牽引力が  $2.6 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$  であり, コントロール細胞よりも牽引力が減少した。また, Netrin-1 刺激後の牽引力が  $2.2 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$  ( $n = 11$  growth cones) であり, Netrin-1 刺激前後で牽引力に変化が認められなかった (図 20B)。

次に, Netrin-1 で刺激した神経細胞における Cortactin の発現抑制の影響を検討した。Cortactin を発現抑制させた神経細胞を L1 コーティング

したカバースリップ上に播種し、3時間後に Netrin-1 を 300 ng/ml (コントロールとして BSA) 加え、その 40 時間後に免疫細胞染色を行った。その後、軸索の長さを計測した。その結果、BSA を添加して培養した神経細胞の軸索の長さは、コントロール細胞が  $96.1 \pm 2.7 \mu\text{m}$  ( $n = 3, 70 \text{ cells}$ ), Cortactin を発現抑制させた細胞 miRNA #1 が  $51.7 \pm 4.9 \mu\text{m}$  ( $n = 3, 68 \text{ cells}$ ), miRNA #2 が  $50.0 \pm 4.7 \mu\text{m}$  ( $n = 3, 76 \text{ cells}$ ) であり、コントロール細胞よりも Cortactin を発現抑制させた細胞の軸索の長さが有意に短くなった (図 21A,  $p < 0.01$ )。また、Netrin-1 を添加して培養した神経細胞の軸索の長さは、コントロール細胞が  $137.2 \pm 8.8 \mu\text{m}$  ( $n = 3, 65 \text{ cells}$ ), Cortactin を発現抑制させた細胞 miRNA #1 が  $55.4 \pm 0.7 \mu\text{m}$  ( $n = 3, 67 \text{ cells}$ ), miRNA #2 が  $53.3 \pm 2.2 \mu\text{m}$  ( $n = 3, 73 \text{ cells}$ ) であり、こちらもコントロール細胞よりも Cortactin を発現抑制させた細胞の軸索の長さが有意に短くなった (図 21A,  $p < 0.02, p < 0.01$ )。Netrin-1 刺激による軸索伸長の促進を解析するために、Netrin-1 刺激による軸索の長さから BSA 刺激による軸索の長さを差し引いた。その結果、Netrin-1 刺激による軸索伸長は、コントロール細胞が  $41.1 \pm 8.4 \mu\text{m}$  ( $n = 3$ ), Cortactin を発現抑制させた細胞 miRNA #1 が  $3.7 \pm 5.7 \mu\text{m}$  ( $n = 3$ ), miRNA #2 が  $3.3 \pm 6.9 \mu\text{m}$  ( $n = 3$ ) であり、Netrin-1 刺激による軸索伸長が、Cortactin の発現抑制により有意に抑制された (図 21B,  $p < 0.05$ )。

以上の結果より、Cortactin が Netrin-1 により誘導される牽引力の発生および軸索伸長に関与することが示唆された。

## **10. Cortactin と Shootin1 の結合が Netrin-1 により誘導される牽引力の発生と軸索伸長に関与する**

結果 8 において、Cortactin と Shootin1 の結合が PAK1 による Shootin1 のリン酸化により制御されることが示唆された。そこで、これらの結合が軸索伸長のための牽引力の発生や軸索伸長に関与するのかどうかを検討した。最初に、Cortactin が結合する Shootin1 の領域を決定するために、Shootin1 の切断型変異体を作製し (図 22A), *in vitro* binding assay を行った。その結果、Cortactin は Shootin1 の 261-377 アミノ酸領域で結合することがわかった (図 22B)。

次に、この領域の切断型変異体 (以下、Shootin1 (261-377)) が Cortactin と全長の Shootin1 との相互作用を阻害するのかが検討するために、Shootin1 (261-377) を過剰発現させた神経細胞において、EGFP-shootin1 の細胞内一分子計測を行った。なお、Shootin1 (261-377) を神経細胞に過剰発現させると、核に局在してしまうため (data not shown), 核外移行シ



グナル (NES) を付加した。そして、1 分間における  $1 \mu\text{m}^2$  あたりの出現する EGFP-shootin1 のスペックルの数を計測した。その結果、コントロール細胞 (GST 過剰発現) 細胞において、EGFP-shootin1 のスペックルの数が  $63.2 \pm 3.8$  個 ( $n = 8$  growth cones, 動画 7) だったのに対し、Shootin1 (261-377) 過剰発現細胞における EGFP-shootin1 のスペックルの数は  $22.5 \pm 3.1$  個 ( $n = 7$  growth cones, 動画 8) と有意に減少した (図 23,  $p < 0.01$ )。このことから、Shootin1 (261-377) が Cortactin と全長の Shootin1 の相互作用を阻害することが示唆された。

さらに、Cortactin と Shootin1 の相互作用を阻害したときの影響を検討するために、Shootin1 (261-377) を過剰発現させた神経細胞において、Netrin-1 刺激前後の牽引力および軸索の長さを結果 9 の方法と同様に定量した。コントロール細胞において、Netrin-1 刺激前の牽引力が  $5.7 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$  だったのに対し、Netrin-1 刺激後は  $8.5 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$  ( $n = 10$  growth cones) と牽引力が上昇した (図 24A)。一方、Shootin1 (261-377) 過剰発現細胞においては、Netrin-1 刺激前の牽引力が  $1.8 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$  であり、コントロール細胞よりも牽引力が減少した (図 24A)。また、Netrin-1 刺激後の牽引力が  $1.9 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$  ( $n = 9$  growth cones) であり、Netrin-1 刺激前後で牽引力に変化が認められなかった (図 24A)。また、BSA を添加して培養した神経細胞の軸索の長さは、コントロール細胞が  $115.6 \pm 5.3 \mu\text{m}$  ( $n = 3$ , 136 cells), Shootin1 (261-377) 過剰発現細胞が  $58.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$  ( $n = 3$ , 136 cells) であり、コントロール細胞よりも Shootin1 (261-377) 過剰発現細胞の軸索の長さが有意に短くなった (図 24B,  $p < 0.01$ )。一方、Netrin-1 を添加して培養した神経細胞の軸索の長さは、コントロール細胞が  $147.9 \pm 5.3 \mu\text{m}$  ( $n = 3$ , 129 cells), Shootin1 (261-377) 過剰発現細胞が  $64.1 \pm 1.0 \mu\text{m}$  ( $n = 3$ , 143 cells) であり、こちらもコントロール細胞よりも Shootin1 (261-377) 過剰発現細胞の軸索の長さが有意に短くなった (図 24B,  $p < 0.01$ )。さらに、Netrin-1 刺激による軸索伸長の促進を解析したところ、Netrin-1 刺激による軸索伸長は、コントロール細胞が  $32.3 \pm 0.8 \mu\text{m}$  ( $n = 3$ ), Shootin1 (261-377) 過剰発現細胞が  $5.9 \pm 1.3 \mu\text{m}$  ( $n = 3$ ) であり、Netrin-1 刺激による軸索伸長が、Shootin1 (261-377) の過剰発現により有意に抑制された (図 24C,  $p < 0.01$ )。

以上のことから、Cortactin と Shootin1 の結合が Netrin-1 により誘導される牽引力の促進と軸索伸長に関与することが示唆された。

## < 考察 >

本研究において、Shootin1 と相互作用するアクチン結合タンパク質の探索を行ったところ、Cortactin を同定した。神経細胞の軸索の成長円錐の末端領域において、Cortactin と Shootin1 は共局在し、かつアクチン線維の逆行性移動と相互作用することを見いだした。また、Cortactin を介してアクチン線維の逆行性移動の力が細胞接着分子 L1 に伝わり、その結果牽引力が生じて軸索が伸長することが明らかになった。さらに、軸索誘引因子 Netrin-1 により Cortactin と Shootin1 の連結が強くなり、それにより軸索伸長のための牽引力が増加し、軸索が伸長することが明らかになった。以上の結果から、Cortactin が軸索伸長を引き起こすクラッチ分子として機能し、かつ、Cortactin と Shootin1 の結合が、Netrin-1 によるシグナル伝達を力に変換するインターフェースとして機能することが示唆された。

### Cortactin は軸索伸長を引き起こすクラッチ分子として機能する

Cortactin はアクチン線維の逆行性移動と Shootin1 の連結を仲介することが明らかになった (結果 2-4)。Cortactin と Shootin1 の結合領域を明らかにするために、Cortactin の欠損変異体を用いた *in vitro* binding assay を行ったが、Cortactin を切断すると、Shootin1 の全長との結合力が弱まった (補足図 1)。このことから、Cortactin と Shootin1 は多点を認識して結合している可能性が考えられる。今後、構造解析などにより、Cortactin と Shootin1 の結合部位の詳細な解析を行いたい。

序論でも述べたように、アクチン線維の逆行性移動と細胞接着分子の連結により、アクチン線維の逆行性移動の力 (駆動力) が細胞接着分子に伝えられ、これにより軸索伸長が引き起こされると考えられている。アクチン線維の逆行性移動と細胞接着分子の連結は、非神経細胞において機械的な力が生み出されることが報告されており [33, 34]、これにより細胞の遊走などにも関与することが示唆されている [28]。成長円錐においては、当研究室の先行研究や他のグループらにより、クラッチ分子が同定されつつあるが、その分子ネットワークは不明である。本研究で、クラッチ分子の候補として Cortactin を同定したが、実際にクラッチ分子として機能するのかを解析した。

アクチン線維の逆行性移動と細胞接着分子が Cortactin を介して連結しているのかを検証したところ、Cortactin の発現抑制によりアクチン線維の逆行性移動が速くなった (図 14)。また、Cortactin 存在下において、

Netrin-1 刺激によりアクチン線維の逆行性移動が Netrin-1 刺激前よりも遅くなったが、Cortactin の発現を抑制した神経細胞においては、Netrin-1 刺激によりアクチン線維の逆行性移動がさらに速くなった (図 14)。これは、Cortactin 存在下においては、Netrin-1 刺激により PAK1 が活性化し Shootin1 がリン酸化され、Cortactin と Shootin1 の結合が強くなり、それによりクラッチの連結がより強化されるため、アクチン線維の逆行性移動がより遅くなったと考えられる (補足図 2A)。一方、Cortactin を発現抑制した場合、Netrin-1 刺激により Cdc42 や Rac1 が活性化し、それらがアクチン線維の重合促進に働いたため、アクチン線維の逆行性移動がより速くなったと考えられる (補足図 2B)。これらのことから、Cortactin がアクチン線維の重合促進ではなく、アクチン線維と細胞接着分子 L1 を連結していることが示唆された。また、ビーズトラッキングの結果より、Cortactin の発現抑制によりビーズの動きが鈍くなった (図 15)。結果の項にも記したように、クラッチ分子によりアクチン線維と細胞接着分子が連結すると、先端端でのアクチン線維の逆行性移動の速度が遅くなると考えられている [27-29]。最近、当研究室では、Shootin1 の発現を抑制するとアクチン線維の逆行性移動の速度が速くなることを見出している [30]。また、ビーズトラッキングを用いた実験より、Shootin1 の発現を抑制するとビーズの動きが鈍くなることがわかっている [12]。本実験結果は、これらの結果と一致しており、アクチン線維-Cortactin-Shootin1-L1 の複合体を形成していると考えられる。これらの複合体が実際に牽引力の発生に関与するのかを Traction force microscopy により検討したところ、Cortactin の発現抑制あるいは Cortactin と Shootin1 の結合を阻害することにより、軸索伸長のための牽引力が減少した (図 20, 図 24)。また、Shootin1 の発現を抑制すると牽引力が減少する [30] ことから、Cortactin は牽引力の発生に関与すると考えられる。さらに、図 17 の結果から、L1 コーティング上で培養した神経細胞の軸索の長さは、Cortactin の発現を抑制すると短くなることから、Cortactin は L1 依存的な軸索伸長にも関与することが示唆された。しかし、図 16 のように培養を続けていくと、軸索は伸長する。このことから、他のクラッチ候補分子、例えば L1 と結合する Ezrin [10] などの関与も考えられる。

以上のことから、成長円錐において Cortactin はアクチン線維、Shootin1、L1 と複合体を形成することで、アクチン線維の逆行性移動の力を L1 に伝え、その時に牽引力が生じて軸索の伸長を引き起こすクラッチ分子として機能することが示唆された。

## シグナル伝達と力発生のインターフェースとしての Cortactin-Shootin1 の連結機構

我々の脳内では、神経細胞は Netrin-1 などの軸索ガイダンス分子からの科学的なシグナルを機械的な力に変換することで、正しく標的となる神経細胞に軸索を伸長させる。機械的な力の発生にクラッチメカニズムが関与することが報告されているが[32]、化学的なシグナルをどのように機械的な力に変換しているのか、その分子機構は不明である。

当研究室では最近、軸索誘引因子 Netrin-1 によりセリン/スレオニンキナーゼである PAK1 が活性化し、活性化した PAK1 により Shootin1 が直接リン酸化されることを見いだした[30]。さらに、Netrin-1 刺激による Shootin1 のリン酸化によりクラッチの連結が増強すること、クラッチの連結が増強されることで牽引力が強くなり、その結果として軸索の伸長が促進することが示された[30]。本研究において、Cortactin が Netrin-1 のシグナルによるクラッチ連結に関与するのかを検討した。結果 8 (図 18, 19) より、Cortactin は Shootin1 の野生型よりも擬似リン酸化体との相互作用が強いこと明らかになった。興味深いことに、Cortactin は Shootin1 の野生型よりも PAK1 でリン酸化された Shootin1 のほうがより相互作用しやすいことが明らかになった。また、Cortactin を発現抑制した細胞あるいは Cortactin と Shootin1 との結合を阻害した細胞は、Netrin-1 刺激による牽引力の発生および軸索伸長が抑制されることが明らかになった (図 21, 図 24)。これらのことから、Netrin-1 の刺激により下流の PAK1 が活性化し、活性化した PAK1 が Shootin1 を直接リン酸化することで Shootin1 と Cortactin が結合しやすくなり、結果的にクラッチが増強される可能性が示唆された。

今後、PAK1 による Shootin1 の構造変化や Cortactin との結合様式を解析し、シグナル伝達を機械的な力の発生に変換する仕組みを構造学的に解明することで、これまで不明であったクラッチインターフェースを明らかにできると考えられる。

## Shootin1 のリン酸化以外によるクラッチメカニズムの制御機構

Shootin1 のリン酸化によりクラッチメカニズムが制御されることを示唆する結果を得た。しかしながら、Cortactin もリン酸化を受けるタンパク質である。細胞外シグナル制御キナーゼ (Erk) の標的である Cortactin の 405 番目と 418 番目のセリンがリン酸化されるとアクチンの重合が促進されることが報告されている[35]。また、線維芽細胞において、PAK1 の恒常活性化型変異体を遺伝子導入すると、Cortactin が先端端に局在を

変化させるという報告がある[36]。これらのことから、神経細胞において、Cortactin のセリンのリン酸化がクラッチメカニズムの制御、クラッチの増強に関わる可能性が考えられる。一方、Cortactin のチロシンリン酸化もクラッチメカニズムの制御に関わっている可能性が考えられる。Cortactin のチロシンリン酸化は Src や Fyn, Fer などのキナーゼにより行われ[37]、遊走中の細胞や転移中の癌細胞でよく見られることから、細胞移動の促進に働くと考えられている[38-42]。しかし、何種類かの腫瘍においては、Cortactin のチロシンリン酸化が細胞の移動を抑制するとの報告がある[43]。また、網膜の神経細胞において、反発性因子からのシグナルにより Cortactin がチロシンリン酸化され、成長円錐が回転する可能性が示唆されている[24]。これらのことから、Cortactin のチロシンリン酸化がクラッチ分子の解離の制御にも関与する可能性も考えられる。今後、Cortactin のリン酸化によるクラッチメカニズムの制御機構を解析することで、より詳細なクラッチメカニズムの分子ネットワークの解明が期待される。

## **結論**

軸索伸長の分子機構としてクラッチメカニズムが提唱されてきた。これまで、Shootin1 がクラッチ分子として機能し、軸索伸長を引き起こすことが報告されていた。しかし、クラッチモジュールを構成する他の分子は明らかではなく、その分子ネットワークは不明であった。

本研究では、アクチン線維と Shootin1 を連結する分子として Cortactin を同定した。相互作用や機能解析の結果、Cortactin はアクチン線維と Shootin1 の連結を仲介するクラッチ分子として機能し、軸索伸長を引き起こすことを見いだした (図 25)。また、Netrin-1 によるシグナル伝達により、Cortactin とリン酸化 Shootin1 が結合し、それによりクラッチの連結が強化され、牽引力が増加し、軸索の伸長が促進されることが明らかとなった (図 25)。

今後の課題として、クラッチメカニズムの分子ネットワークを解明するためには、Shootin1 と L1 との相互作用を明らかにする必要がある。リン酸化 Shootin1 と L1 は直接結合するのか、あるいは他の分子を介して結合しているのかを解析し、クラッチメカニズムによる軸索伸長の分子機構の理解を深めていく必要があると考えている。

## < 謝辞 >

7年間という長期に渡る奈良先端科学技術大学院大学での研究生活に関わってきたすべての人に感謝申し上げます。特に直接の指導教官である神経システム生物学研究室の稲垣直之教授には、研究の進め方や研究者としての基本姿勢をご指導頂き、そして何不自由ない研究環境を与えてくださり、心より感謝しております。

分子情報薬理学研究室の伊東広教授には、アドバイザー委員としてだけでなく、修士課程から博士課程1年の3年間同じ研究室として学ばせて頂いた際には、研究を進める上での貴重なディスカッションをして頂き、また多くの励ましをして頂きました。また、アドバイザー委員として川市正史教授、塩坂貞夫教授、別所康全教授には、鋭いご指摘や適切な助言を頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。

神経システム生物学研究室の鳥山道則博士（現 テキサス大学）には、実験技術や解析方法など多くのものを学ばせて頂いたこと、感謝致します。そして、稲垣研同期の前野貴則さん、伊東研の太田茂之さん、稲垣研先輩の中澤瞳さん、柴田浩孝さん、そして勝野弘子さんをはじめとする後輩の皆様には、研究のディスカッションだけでなく、日々の生活を楽しく過ごさせて頂いたことに深く感謝いたします。

情報科学研究科計算システムズ生物学研究室の杉浦忠男准教授と松本将宜博士には、光ピンセットによるビーズトラッキングに関して、ご指導とご協力をして頂きました。また、同研究科の数理情報学研究室の小沢哲博士（現 脳情報通信総合研究所）には、Traction force microscopyに関する解析についてご協力頂きました。これらの方々に、心から感謝申し上げます。

最後に、長期間の学生生活を経済的に支えてくれた両親、および多くの楽しみや喜び、そして苦しみを共に励ましあった友人に心より感謝申し上げます。

## < 参考文献 >

1. Dent, E. W., and Gertler, F. B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40, 209–27.
2. Dickson, B. J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298, 1959–64.
3. Mitchison, T., and Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1, 761–72.
4. Mallavarapu, A., and Mitchison, T. (1999). Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *The Journal of Cell Biology* 146, 1097–106.
5. Katoh, K., Hammar, K., Smith, P. J., and Oldenbourg, R. (1999). Birefringence imaging directly reveals architectural dynamics of filamentous actin in living growth cones. *Molecular Biology of the Cell* 10, 197–210.
6. Medeiros, N. A., Burnette, D. T., and Forscher, P. (2006). Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nature Cell Biology* 8, 215–26.
7. Lin, C. H., Espreafico, E. M., Mooseker, M. S., and Forscher, P. (1997). Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *The Biological Bulletin* 192, 183–5.
8. Suter, D. M., and Forscher, P. (2000). Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *Journal of Neurobiology* 44, 97–113.
9. Bard, L., Boscher, C., Lambert, M., Mège, R.-M., Choquet, D., and Thoumine, O. (2008). A molecular clutch between the actin flow and N-cadherin adhesions drives growth cone migration. *The Journal of Neuroscience* 28, 5879–90.

10. Marsick, B. M., San Miguel-Ruiz, J. E., and Letourneau, P. C. (2012). Activation of ezrin/radixin/moesin mediates attractive growth cone guidance through regulation of growth cone actin and adhesion receptors. *The Journal of Neuroscience* 32, 282–296.
11. Toriyama, M., Shimada, T., Kim, K. B., Mitsuba, M., Nomura, E., Katsuta, K., Sakumura, Y., Roepstorff, P., and Inagaki, N. (2006). Shootin1: A protein involved in the organization of an asymmetric signal for neuronal polarization. *The Journal of Cell Biology* 175, 147–57.
12. Shimada, T., Toriyama, M., Uemura, K., Kamiguchi, H., Sugiura, T., Watanabe, N., and Inagaki, N. (2008). Shootin1 interacts with actin retrograde flow and L1-CAM to promote axon outgrowth. *The Journal of Cell Biology* 181, 817–29.
13. Suzuki, E., and Nakayama, M. (2007). The mammalian Ced-1 ortholog MEGF10/KIAA1780 displays a novel adhesion pattern. *Experimental Cell Research* 313, 2451–64.
14. Tang, B. L. (2001). Protein trafficking mechanisms associated with neurite outgrowth and polarized sorting in neurons. *Journal of Neurochemistry* 79, 923–30.
15. Seng, S., Avraham, H. K., Jiang, S., Venkatesh, S., and Avraham, S. (2006). KLHL1/MRP2 mediates neurite outgrowth in a glycogen synthase kinase 3beta-dependent manner. *Molecular and Cellular Biology* 26, 8371–84.
16. 上原宏章 (2008). 神経極性タンパク質 Shootin1 と相互作用する分子の同定および機能解析. 修士論文.
17. Wu, H., and Parsons, J. T. (1993). Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *The Journal of Cell Biology* 120, 1417–1426.



18. Uruno, T., Liu, J., Zhang, P., Fan Yx, Egile, C., Li, R., Mueller, S. C., and Zhan, X. (2001). Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nature cell biology* 3, 259–266.
19. Weaver, A. M., Heuser, J. E., Karginov, A. V, Lee, W., Parsons, J. T., and Cooper, J. a (2002). Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex. *Current Biology* 12, 1270–8.
20. Bryce, N. S., Clark, E. S., Leysath, J. L., Currie, J. D., Webb, D. J., and Weaver, A. M. (2005). Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Current Biology* 15, 1276–85.
21. Lai, F. P. L., Szczodrak, M., Oelkers, J. M., Ladwein, M., Acconcia, F., Benesch, S., Auinger, S., Faix, J., Small, J. V., Polo, S., et al. (2009). Cortactin promotes migration and platelet-derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to Rho-GTPases. *Molecular biology of the cell* 20, 3209–3223.
22. Du, Y., Weed, S. A., Xiong, W. C., Marshall, T. D., and Parsons, J. T. (1998). Identification of a novel cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. *Molecular and Cellular Biology* 18, 5838–51.
23. Cheng, Y., Leung, S., and Mangoura, D. (2000). Transient suppression of cortactin ectopically induces large telencephalic neurons towards a GABAergic phenotype. *Journal of Cell Science* 113 ( Pt 1, 3161–72.
24. Knöll, B., and Drescher, U. (2004). Src family kinases are involved in EphA receptor-mediated retinal axon guidance. *The Journal of Neuroscience* 24, 6248–57.
25. Forscher, P., and Smith, S. J. (1988). Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *The Journal of Cell Biology* 107, 1505–16.
26. Toriyama, M., Sakumura, Y., Shimada, T., Ishii, S., and Inagaki, N. (2010). A diffusion-based neurite length-sensing mechanism involved in neuronal symmetry breaking. *Molecular Systems Biology* 6, 394.

27. Lowery, L. A., and Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *10*, 332–43.
28. Giannone, G., Mège, R.-M., and Thoumine, O. (2009). Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends in Cell Biology* *19*, 475–86.
29. Le Clainche, C., and Carlier, M. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological Reviews* *88*, 489–513.
30. Toriyama, M., Kozawa, S., Sakumura, Y., and Inagaki, N. (2013). Conversion of a signal into forces for axon outgrowth through Pak1-mediated shootin1 phosphorylation. *Current biology* *23*, 529–34.
31. Iwadate, Y., and Yumura, S. (2008). Actin-based propulsive forces and myosin-II-based contractile forces in migrating Dictyostelium cells. *Journal of Cell Science* *121*, 1314–24.
32. Chan, C. E., and Odde, D. J. (2008). Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science* *322*, 1687–91.
33. Jiang, G., Giannone, G., Critchley, D. R., Fukumoto, E., and Sheetz, M. P. (2003). Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin. *Nature* *424*, 334–7.
34. Grashoff, C., Hoffman, B. D., Brenner, M. D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M. T., McLean, M. a, Sligar, S. G., Chen, C. S., Ha, T., et al. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* *466*, 263–6.
35. Martinez-Quiles, N., Ho, H. H., Kirschner, M. W., Ramesh, N., and Geha, R. S. (2004). Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP. *Molecular and Cellular Biology* *24*, 5269–80.

36. Vidal, C., Geny, B., Melle, J., Jandrot-Perrus, M., and Fontenay-Roupie, M. (2002). Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin. *Blood* *100*, 4462–9.
37. Ammer, A. G., and Weed, S. A. (2008). Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motility and the Cytoskeleton* *65*, 687–707.
38. Huang, C., Liu, J., Haudenschild, C. C., and Zhan, X. (1998). The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* *273*, 25770–6.
39. Liu, J., Huang, C., and Zhan, X. (1999). Src is required for cell migration and shape changes induced by fibroblast growth factor 1. *Oncogene* *18*, 6700–6.
40. Bourguignon, L. Y., Zhu, H., Shao, L., and Chen, Y. W. (2001). CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. *The Journal of Biological Chemistry* *276*, 7327–36.
41. Li, Y., Tondravi, M., Liu, J., Smith, E., Haudenschild, C. C., Kaczmarek, M., and Zhan, X. (2001). Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Research* *61*, 6906–11.
42. Huang, J., Asawa, T., Takato, T., and Sakai, R. (2003). Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma. *The Journal of Biological Chemistry* *278*, 48367–76.
43. Jia, L., Uekita, T., and Sakai, R. (2008). Hyperphosphorylated cortactin in cancer cells plays an inhibitory role in cell motility. *Molecular Cancer Research* *6*, 654–62.

## 图 表

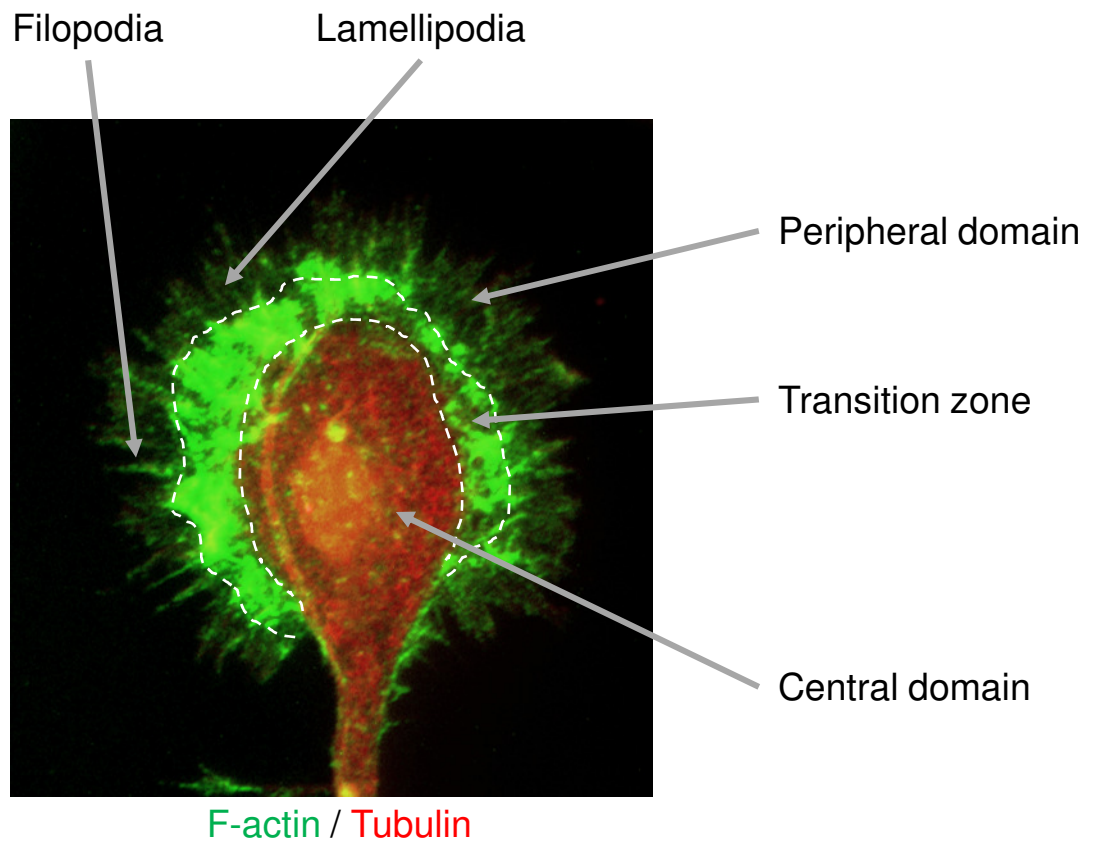
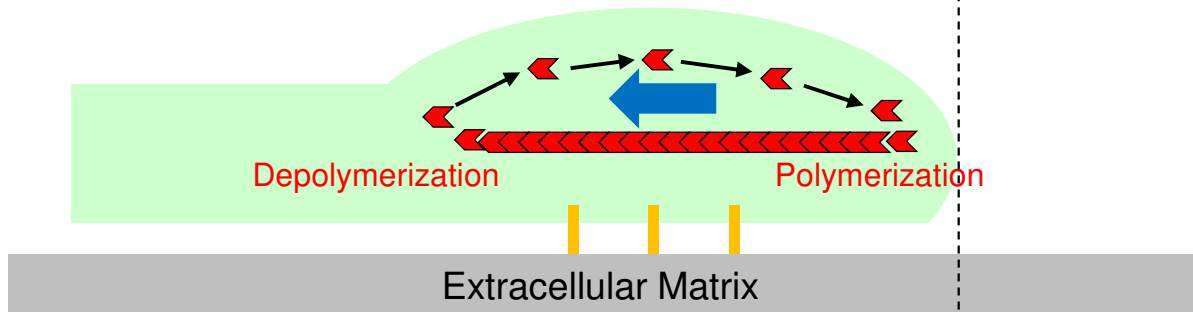


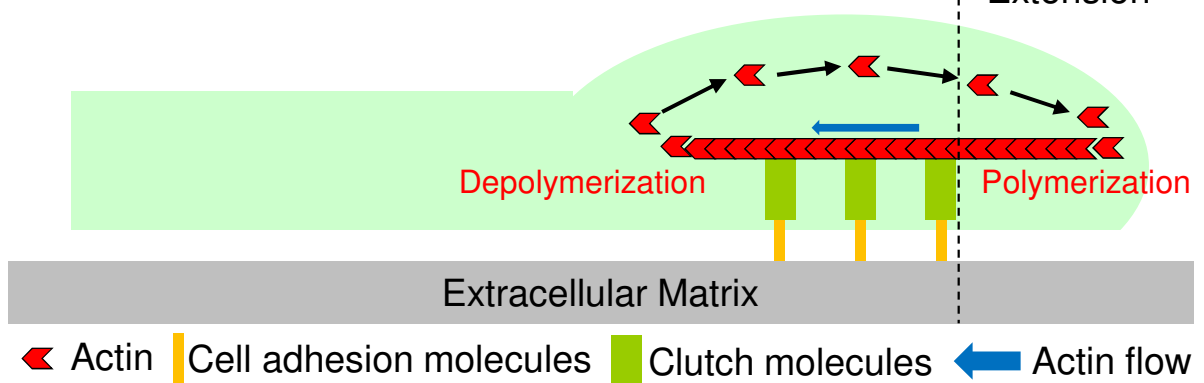
図1. 神経細胞の成長円錐

成長円錐におけるアクチン線維 (緑) とTubulin (赤) を重ね合わせた画像。

## Unengaged clutch

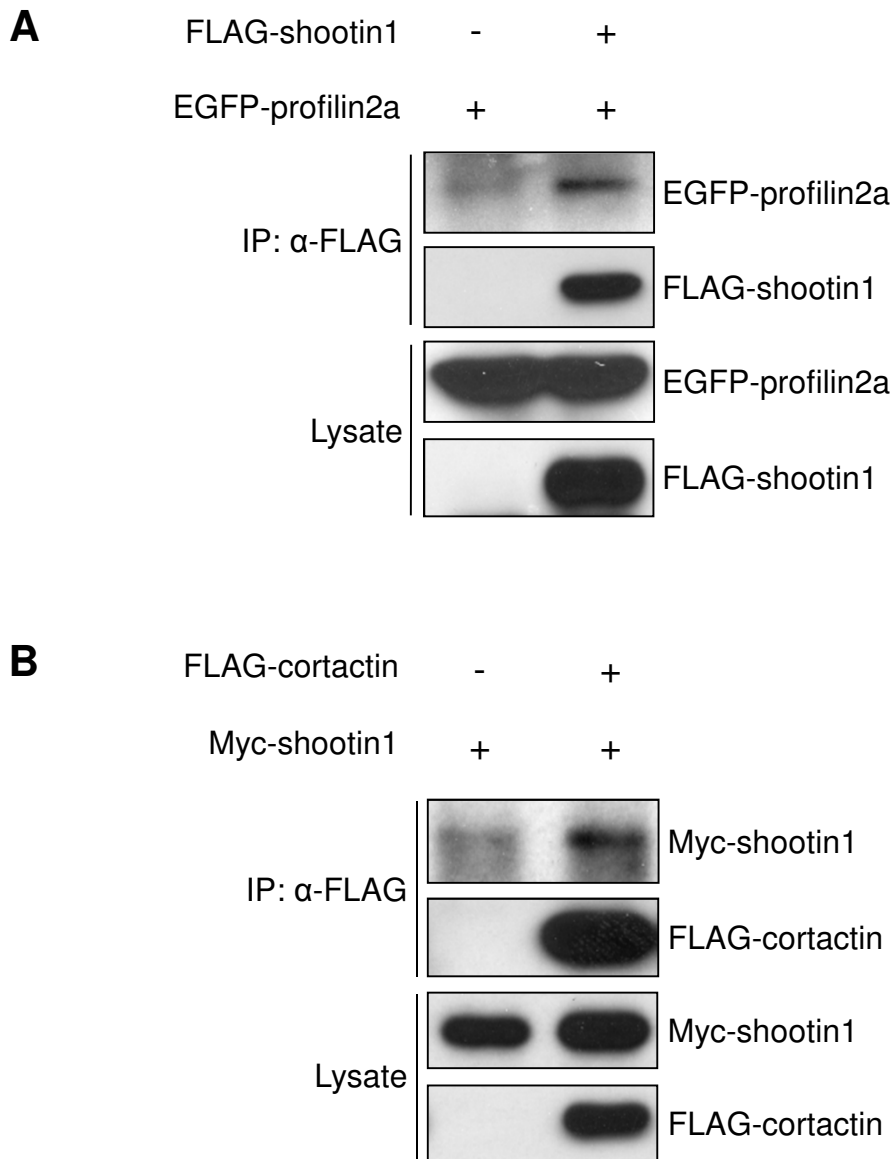


## Engaged clutch



### 図2. クラッチメカニズムによる軸索伸長

アクチン線維は重合と脱重合を繰り返しながら逆行性に移動する。アクチン線維がクラッチ分子を介して細胞接着分子に連結することにより、アクチン線維の逆行性移動の力（駆動力）が細胞接着分子に伝わり、この時に牽引力が生じて軸索が伸長する。



**図3. Shootin1と相互作用するアクチン結合タンパク質の探索**

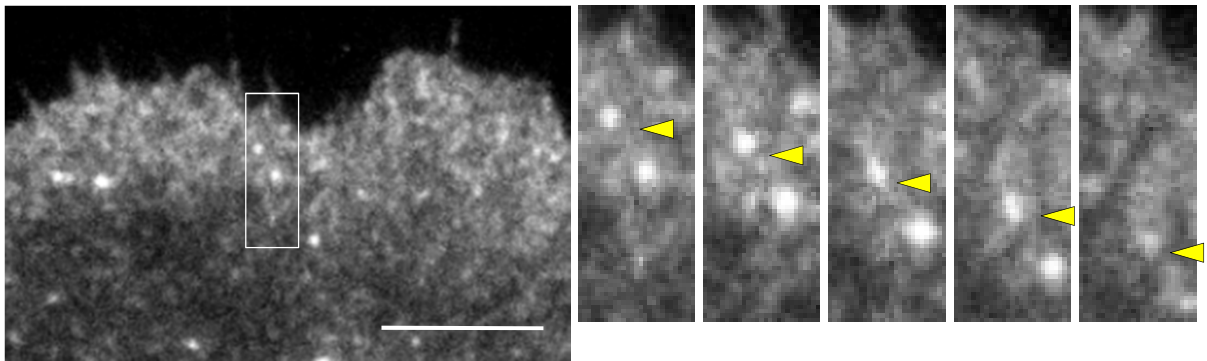
(A) HEK293T細胞を用いた免疫共沈降。FLAG-shootin1を免疫沈降し、EGFP-profilin2aをウエスタンブロッティングにより検出した。

(B) COS-7細胞を用いた免疫共沈降。FLAG-cortactinを免疫沈降し、Myc-shootin1をウエスタンブロッティングにより検出した。

表4. Shootin1と結合するアクチン結合タンパク質のスクリーニング

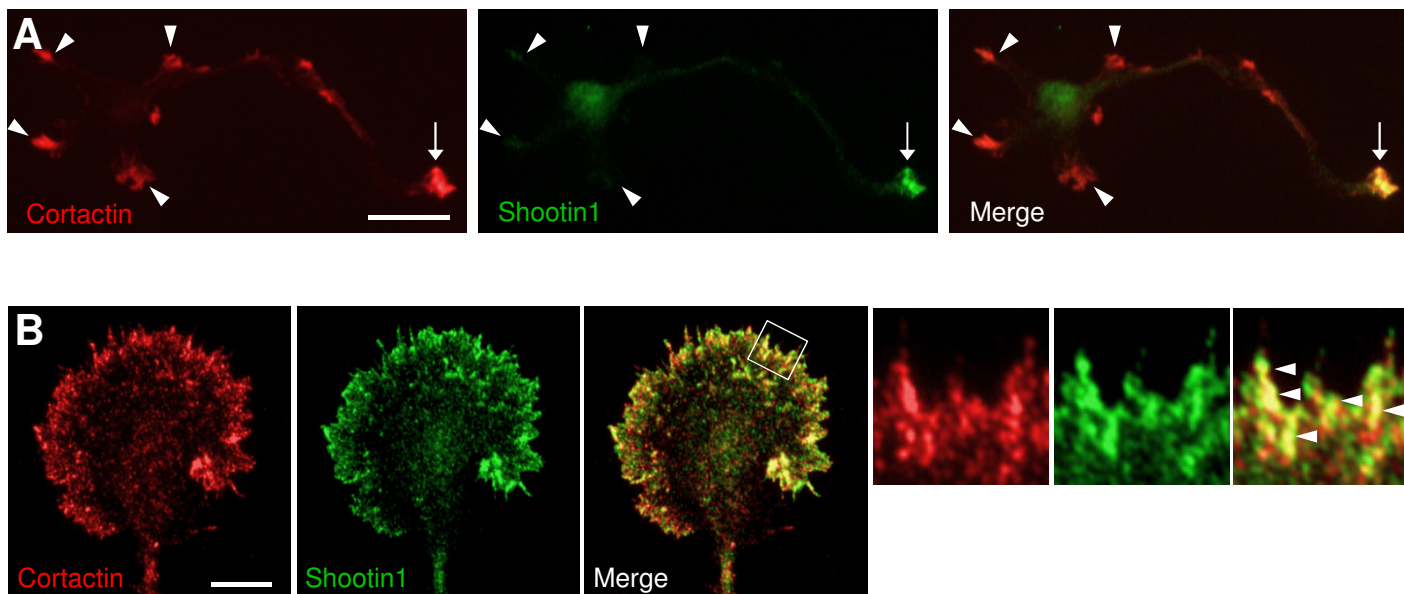
Actin-binding protein	Interaction with shootin1	Retrograde flow
Fascin	×	—
VASP	×	—
p21-ARC	×	—
Eps8	×	—
XAC2	×	—
Capping protein $\beta$ 1	×	—
Profilin1	×	—
Profilin2a	○	×
Cortactin	○	○





#### 図4. XTC細胞におけるEGFP-cortactinの細胞内一分子計測

EGFP-cortactinを遺伝子導入したXTC細胞の先端端におけるタイムラプスイメージ。タイムラプスイメージは5秒間隔で撮影した。白枠の領域を拡大し、図の右側に示した。 Bar: 5  $\mu$ m

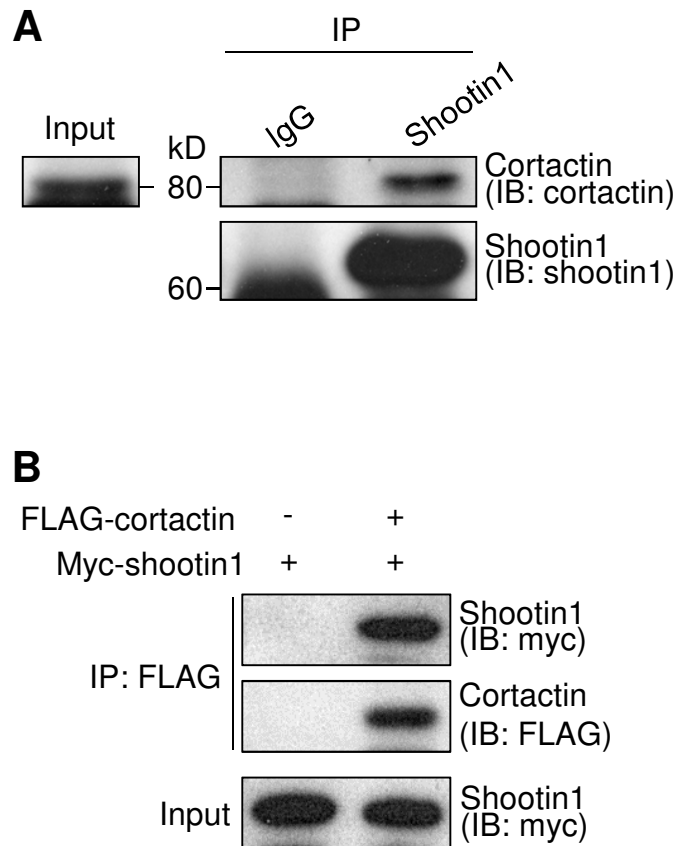


**図5. 培養海馬神経細胞におけるCortactinとShootin1の細胞内局在**

(A) 培養海馬神経細胞におけるCortactin (写真上, 赤) とShootin1 (写真中央, 緑) の免疫細胞染色。写真下に重ね合わせたものを示した。矢印と矢頭はそれぞれ、軸索の成長円錐とマイナープロセスの成長円錐を示している。

(B) 培養海馬神経細胞の成長円錐におけるCortactin (写真左, 赤) とShootin1 (写真中央, 緑) の免疫細胞染色。写真右に重ね合わせたものを示した。白枠の領域を拡大したものを写真の右側に示した。

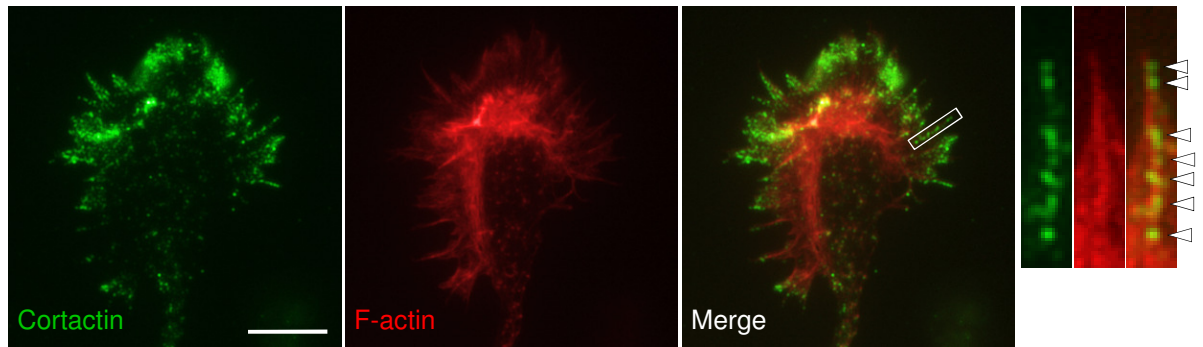
Bars: (A) 20  $\mu\text{m}$ ; (B) 10  $\mu\text{m}$



### 図6. CortactinとShootin1の相互作用解析

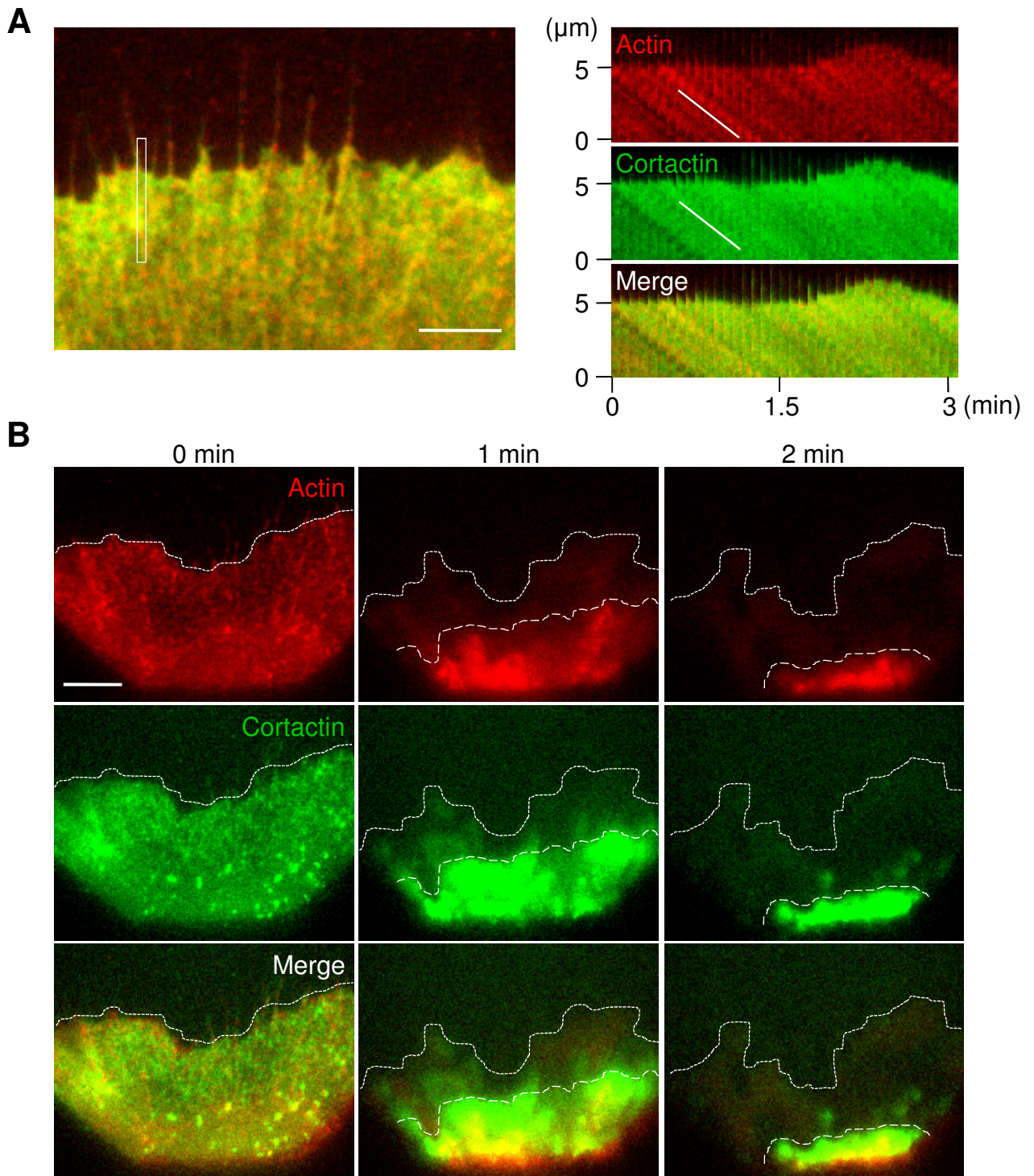
(A) 生後6日目 (P6) のラットの脳を用いた免疫共沈降。抗Shootin1抗体によりShootin1を免疫沈降し、ウエスタンブロッティングによりCortactinを検出した。コントロールとして、rabbit normal IgGを使用した。

(B) 精製タンパク質を用いた*in vitro* binding assay。精製タンパク質同士を混合し、抗FLAG抗体を用いて免疫沈降し、抗Myc抗体を用いてウエスタンブロッティングした。



**図7. 培養海馬神経細胞におけるCortactinとアクチン線維の細胞内局在**

培養海馬神経細胞の成長円錐におけるCortactin (写真左, 緑) とアクチン線維 (写真中央, 赤) の免疫細胞染色。写真右に重ね合わせたものを示した。白枠の領域を拡大したものを写真の右側に示した。Bar: 10  $\mu$ m



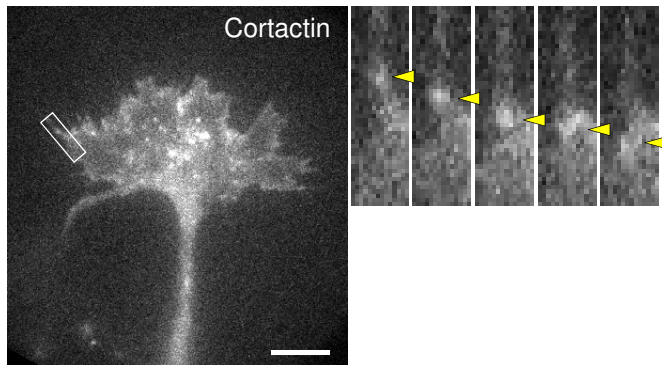
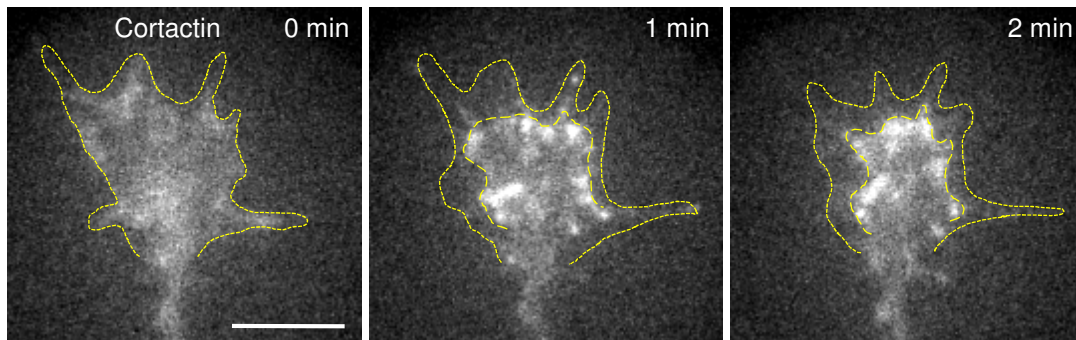
**図8. XTC細胞におけるEGFP-cortactinとmCherry-actinの挙動解析**

(A) XTC細胞におけるEGFP-cortactin (緑) とmRFP-actin (赤) の細胞内一分子計測。タイムラプスイメージは5秒間隔で撮影した。白枠の領域のキモグラフを図の右側に示した。キモグラフ中の白線は、それぞれのスペックルの速度を示している。

(B) 1  $\mu\text{M}$  cytochalasin Dで処理した時のEGFP-cortactin (緑) とmCherry-actin (赤) の細胞内一分子計測。1  $\mu\text{M}$  cytochalasin Dを加える前を0 min (写真左)とし、添加後1 min (写真中央) と2 min (写真右) のタイムラプスイメージを示した。細かい破線は先端端を、粗い破線はスペックルの境界線を示している。

Bars: 5  $\mu\text{m}$



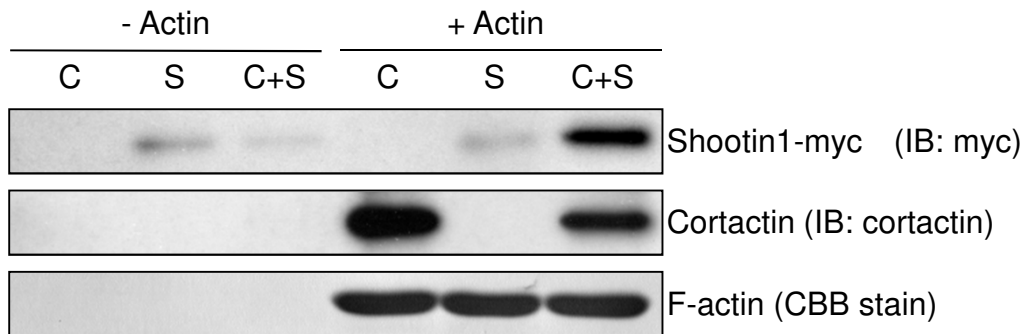
**A****B**

### 図9. 成長円錐におけるEGFP-cortactinの挙動解析

(A) XTC細胞におけるEGFP-cortactin (緑) とmRFP-actin (赤) の細胞内一分子計測。タイムラプスイメージは5秒間隔で撮影した。白枠の領域を拡大し、図の右側に示した。

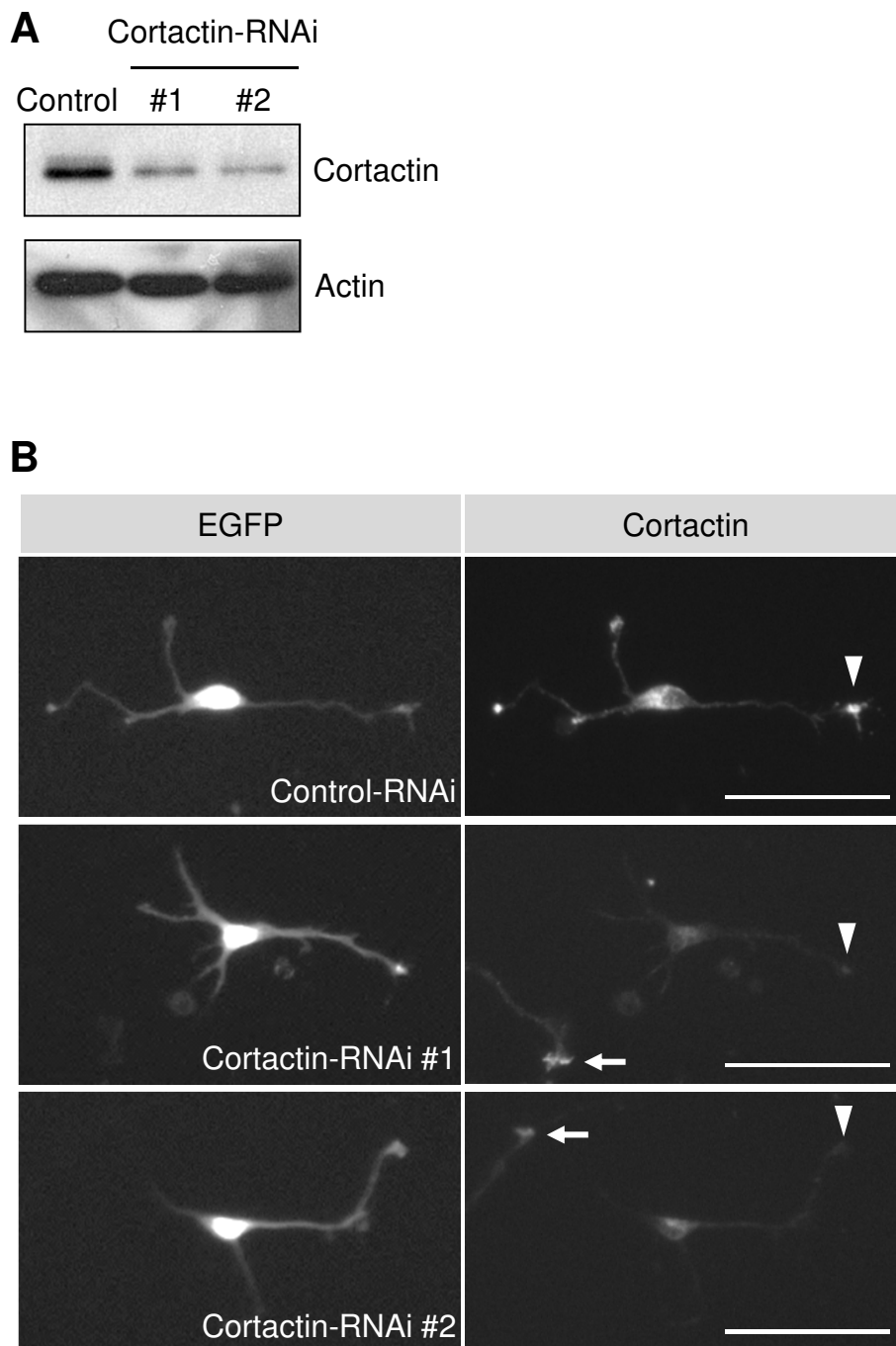
(B) 1  $\mu$ M cytochalasin Dで処理した時のEGFP-cortactinの細胞内一分子計測。1  $\mu$ M cytochalasin Dを加える前を0 min (写真左)とし、添加後1 min (写真中央)と2 min (写真右)のタイムラプスイメージを示した。細かい破線は先端端を、粗い破線はスペckルの境界線を示している。

Bars: (A) 20  $\mu$ m; (B) 10  $\mu$ m



**図10. F-actin sedimentation assayによる解析**

重合したアクチン線維 (5  $\mu\text{M}$ ) と精製したCortactin (1.5  $\mu\text{M}$ , C) あるいはShootin1-myc (1.5  $\mu\text{M}$ , S) あるいはCortactin+Shootin1-myc (C+S) をインキュベートした。重合したアクチン線維を超遠心により沈降させ、アクチン線維と相互作用するタンパク質をウエスタンブロッティング (抗Myc抗体あるいは抗Cortactin抗体) により検出した。アクチン線維はCBB染色により検出した。



### 図11. CortactinのmiRNAによる発現抑制

(A) 培養海馬神経細胞における内在性Cortactinに対する発現抑制効果を、ウエスタンブロットングにより評価。

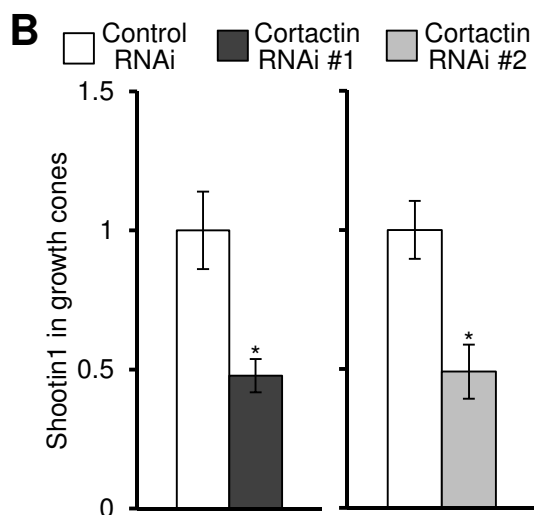
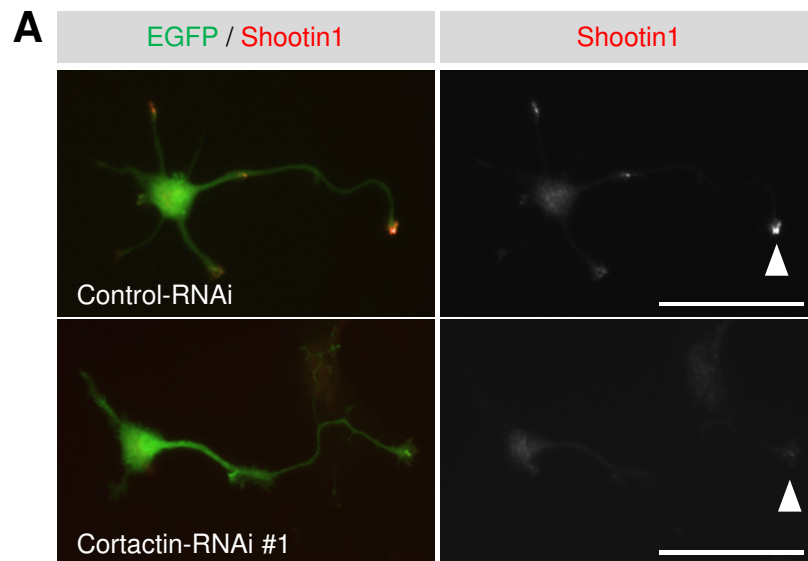
(B) miRNAを遺伝子導入した培養海馬神経細胞における抗Cortactin抗体による免疫細胞染色。

写真左：miRNAを遺伝子導入した細胞 (GFP陽性)

写真右：抗Cortactin抗体による免疫染色像

矢頭はmiRNAが遺伝子導入された細胞の成長円錐を，矢印は遺伝子導入されていない細胞の成長円錐を示す。Bar: 50  $\mu$ m





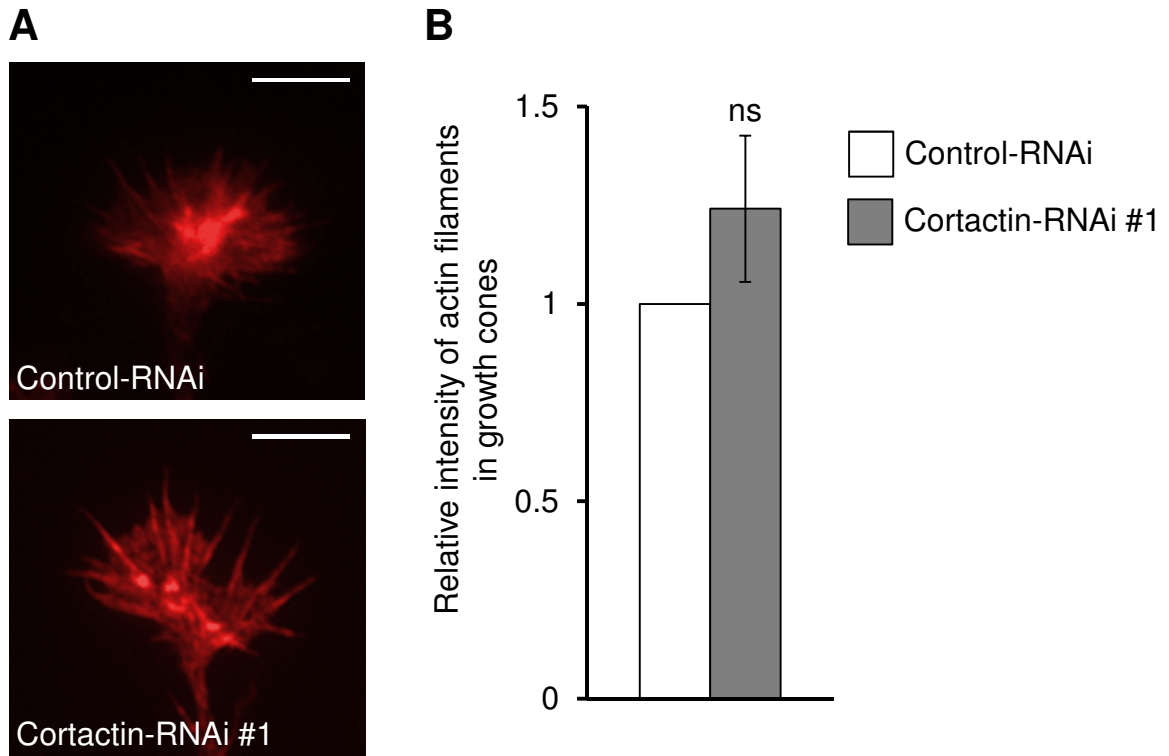
## 図12. Cortactinの発現抑制による内在性Shootin1の局在解析

(A) コントロール細胞とCortactinを発現抑制させた細胞 (培養3日目) の抗Shootin抗体による免疫細胞染色。Bar: 50  $\mu$ m

写真左: EGFP (緑) とShootin1 (赤) を重ね合わせた画像

写真右: 抗Shootin抗体による免疫細胞染色像。矢頭は軸索の成長円錐を示している。

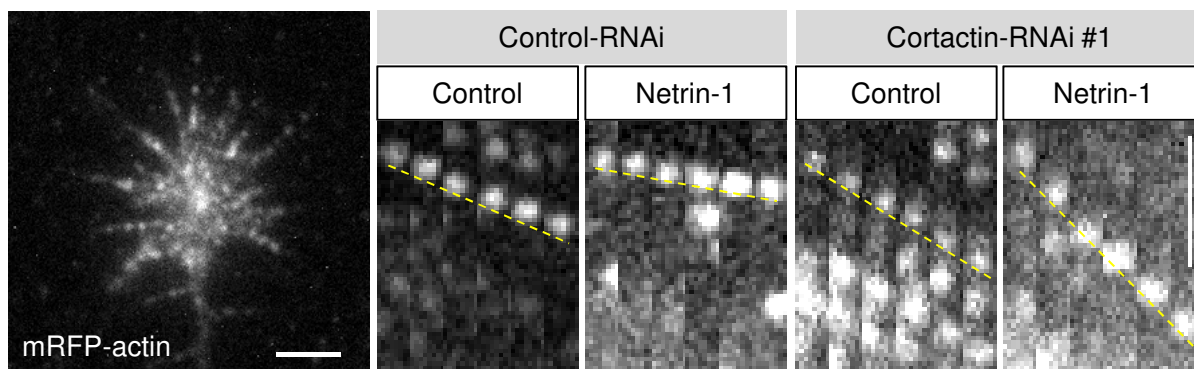
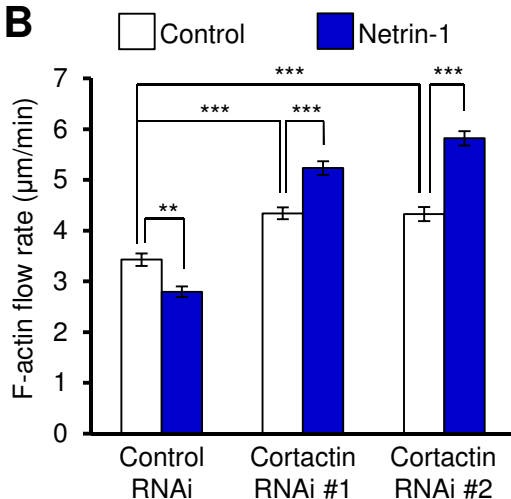
(B) コントロール細胞またはCortactinの発現を抑制した細胞の成長円錐における内在性Shootin1の染色強度を定量し、コントロール細胞を1としてグラフに示した。(\*,  $p < 0.05$ )



**図13. Cortactinの発現抑制によるアクチン線維への影響**

(A) コントロール細胞 (写真上) とCortactinを発現抑制させた細胞 (写真下) (培養3日目) のPhalloidinによる免疫細胞染色。Bar: 5  $\mu$ m

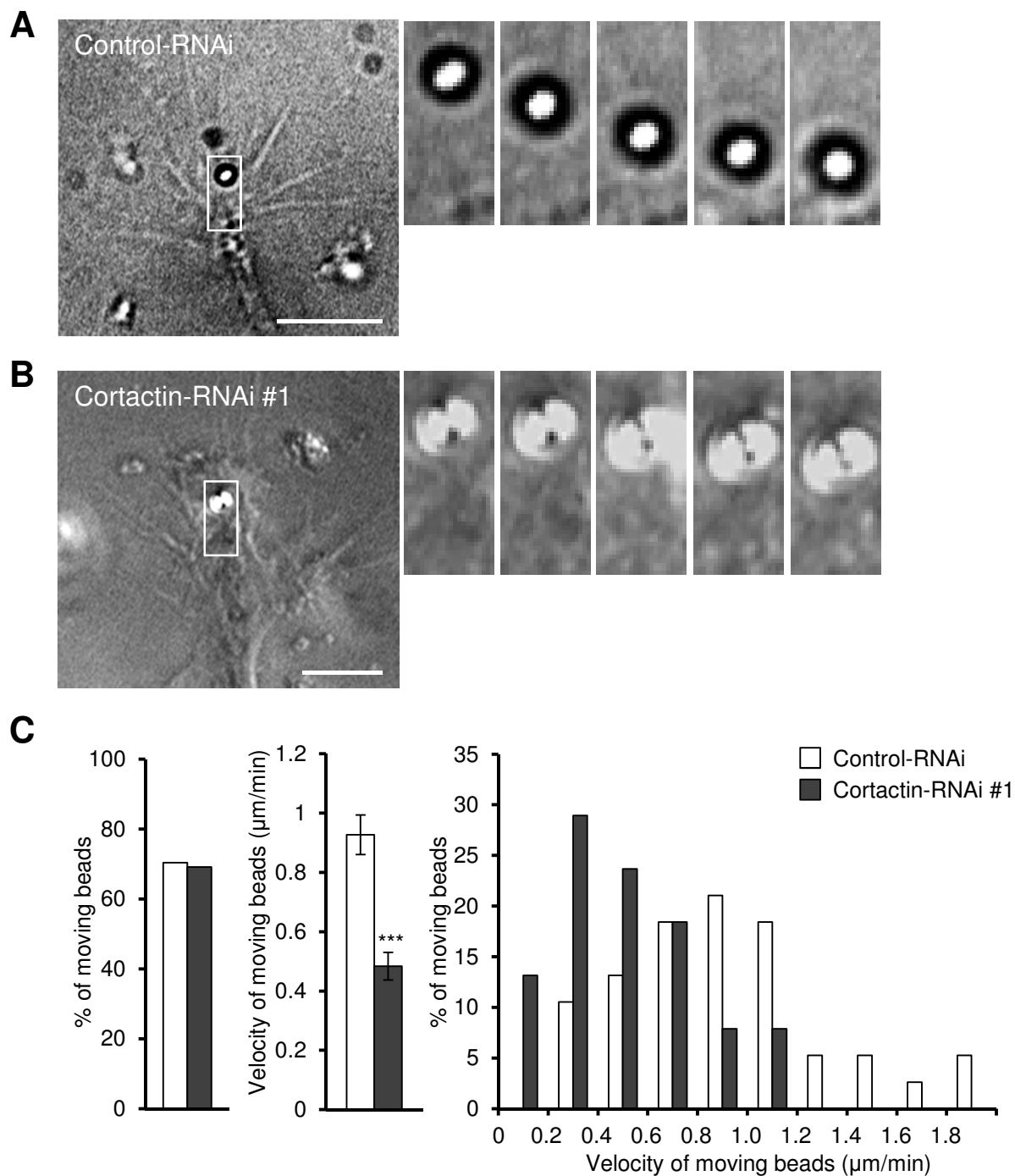
(B) コントロール細胞またはCortactinの発現を抑制した細胞の成長円錐におけるアクチン線維の染色強度を定量し、コントロール細胞を1としてグラフに示した。

**A****B**

**図14. Cortactinの発現抑制によるmRFP-actinスペckルの速度解析**

(A) コントロール細胞またはCortactinの発現を抑制した細胞の軸索の成長円錐におけるmRFP-actinの細胞内一分子計測。図はFilopodiaでのmRFP-actinのスペckル像をキモグラフにしたものを示した。タイムラプスイメージは5秒間隔で撮影した。Netrin-1は終濃度300 ng/mlで1時間刺激した。Bars: 2 µm

(B) (A) で作成したキモグラフから、mRFP-actinのスペckルの速度を定量し、グラフに示した。(\*\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*,  $p < 0.02$ )



**図15. ビーズトラッキングによるActin-L1連結の解析**

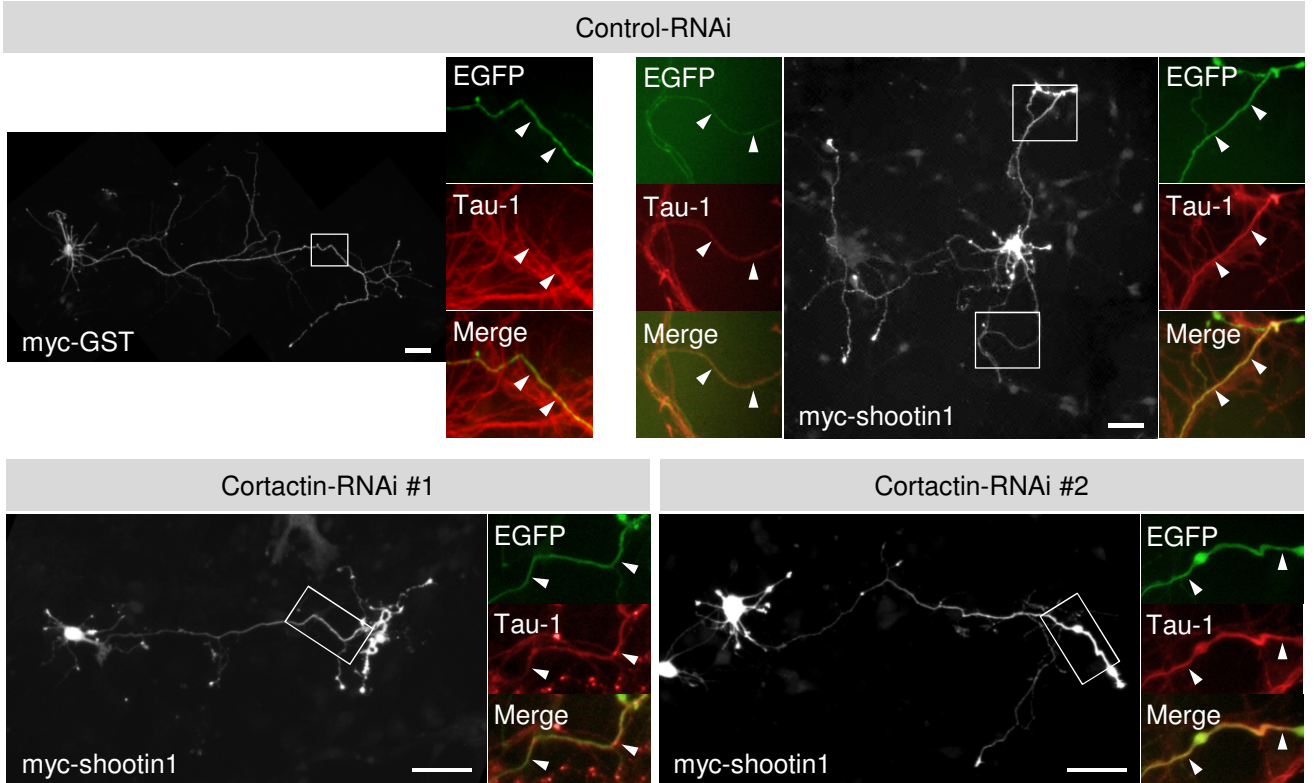
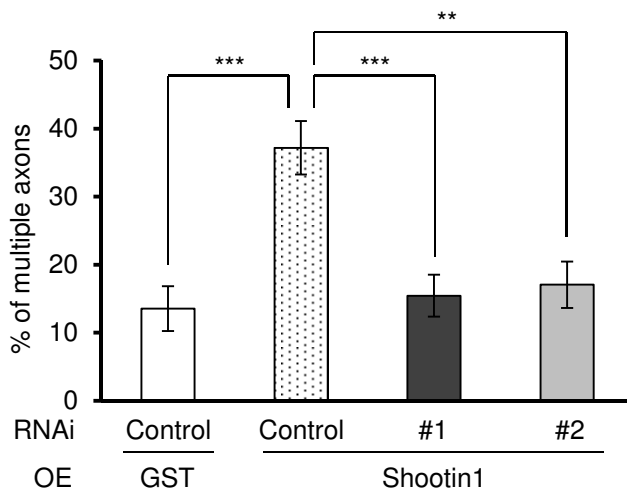
(A-B) コントロール細胞 (A) またはCortactinの発現を抑制した細胞 (B) の軸索の成長円錐におけるビーズトラッキング。図はL1-Fcコーティングビーズが成長円錐上に載っている明視野像を示す。白枠の領域の30秒間隔の画像を図の右側に示した。Bar: 10 μm

(C) 移動したビーズについて解析し、グラフに示した。

グラフ左：移動したビーズの割合。

グラフ中央：移動したビーズの平均速度。 (\*\*\*,  $p < 0.01$ )

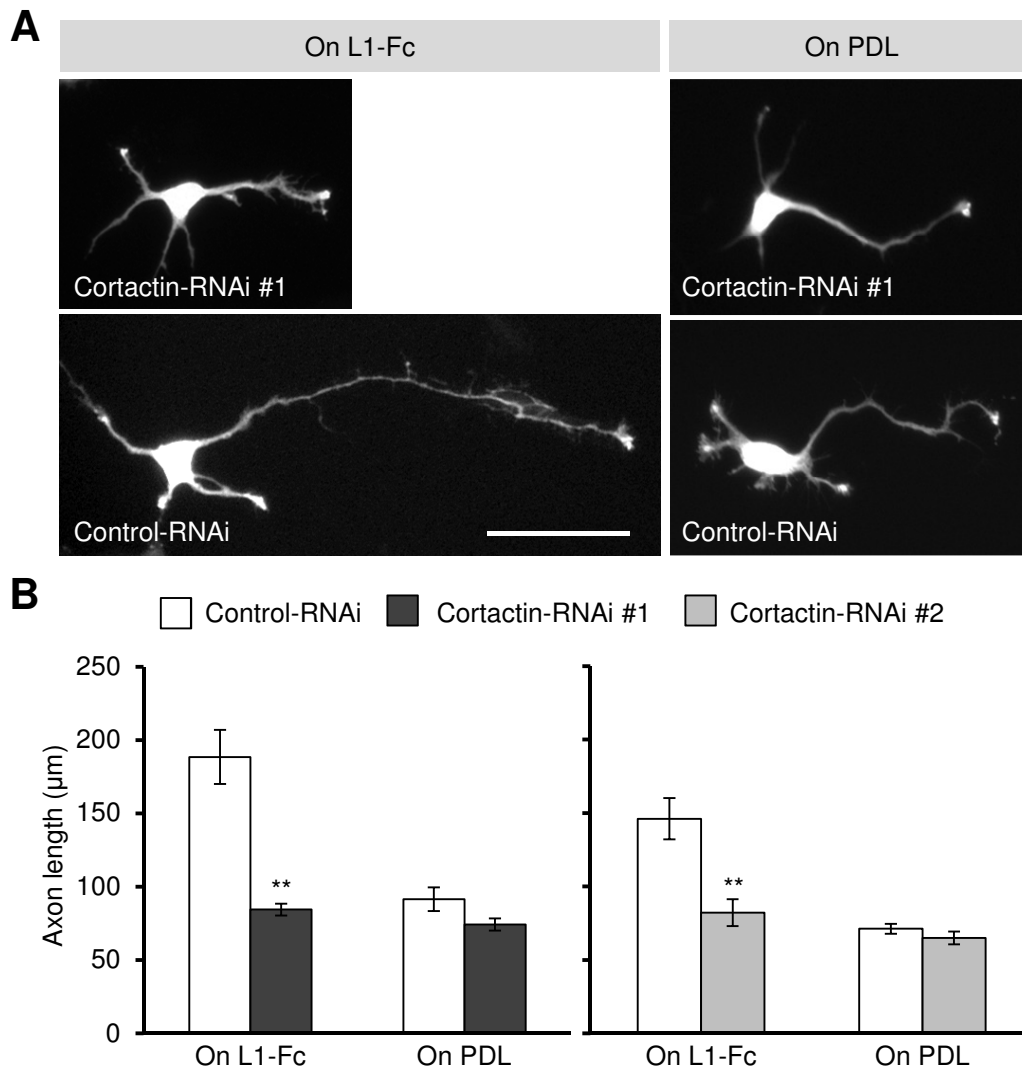
グラフ右：移動したビーズの平均速度におけるヒストグラム解析

**A****B**

**図16. Cortactinの発現抑制時にShootin1を過剰発現させた神経細胞の形態解析**

(A) コントロール細胞とCortactinを発現抑制させた細胞にMyc-shootin1を過剰発現させ、培養6日目 (L1-Fcコーティング上で培養) に抗Myc抗体 (モノクロ)、軸索マーカーである抗Tau-1抗体 (赤) で免疫細胞染色を行った。EGFP (緑) の発現が認められた細胞を解析した。白枠の領域を拡大したものを図の右側に示し、矢頭はTau-1によって染色された神経突起を示した。ネガティブコントロールとして、コントロール細胞にMyc-GSTを過剰発現させた細胞を用いた。Bars: 50  $\mu$ m

(B) (A) の免疫細胞染色から、複数本の軸索を持つ細胞の割合を定量し、グラフに示した。(\*\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*,  $p < 0.02$ )



### 図17. Cortactinの発現抑制による軸索伸長への影響

(A) コントロール細胞とCortactinを発現抑制させた細胞 (培養3日目)において、抗Cortactin抗体による免疫細胞染色を行い、発現の抑制が認められた細胞を解析した。写真はEGFPによる画像を示している。Bar: 50 μm

写真左: L1-Fcでコーティングしたカバースリップ上で培養した神経細胞。

写真右: PDLコーティングしたカバースリップ上で培養した神経細胞。

(B) コントロール細胞またはCortactinの発現を抑制した細胞の軸索の長さを定量し、グラフに示した。(\*\*,  $p < 0.01$ )

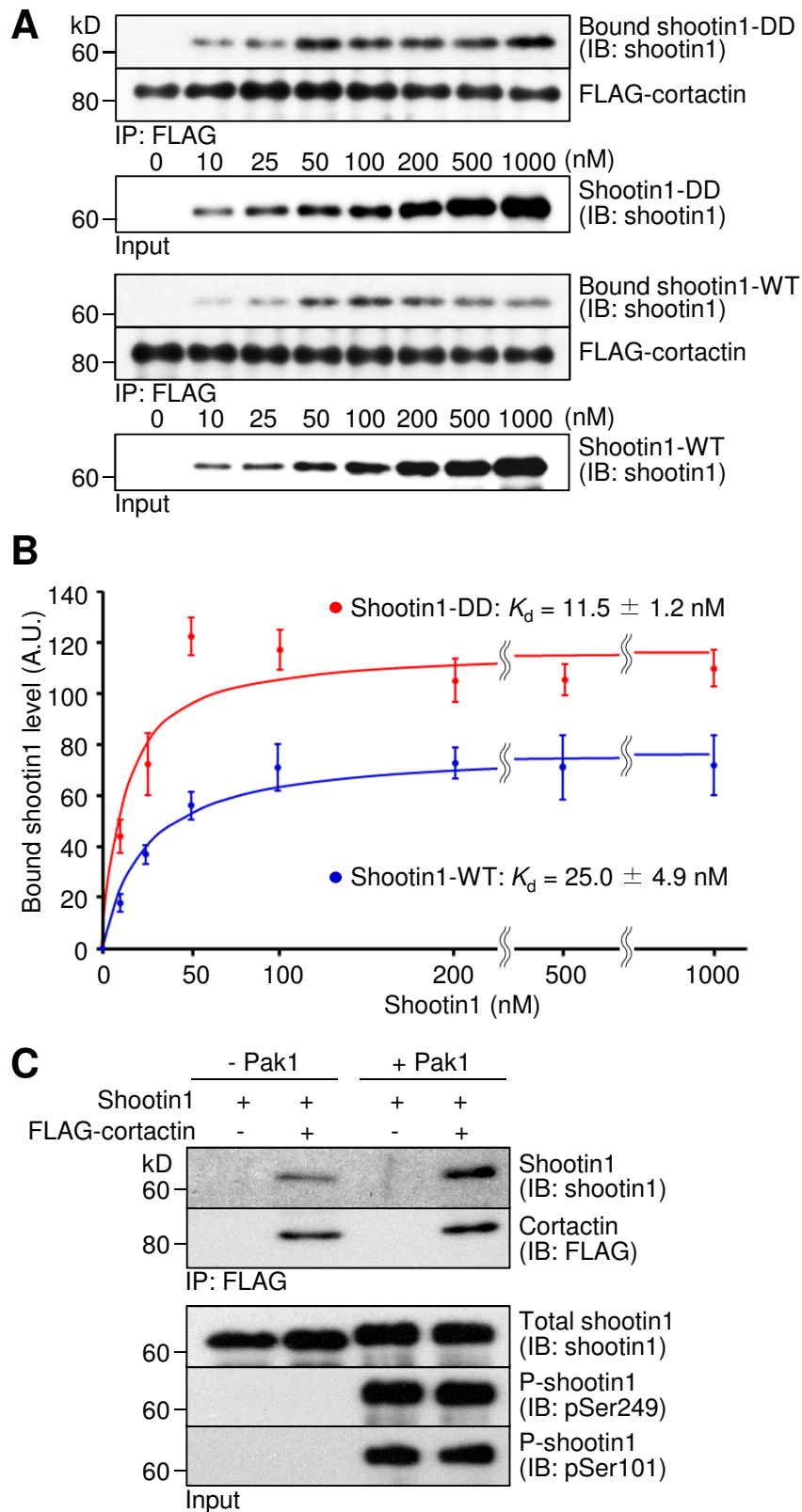


図18. *In vitro*におけるCortactinとリン酸化Shootin1の結合解析

(A) 精製タンパク質を用いた*in vitro* binding assay。Shootin1 WTおよびShootin1 DDの濃度を増加させて免疫沈降を行い、抗Shootin1抗体を用いてウエスタンブロッティングした。WTはShootin1の野生型、DDはShootin1の擬似リン酸化体を示す。

(B) (A) のバンドの輝度を定量し、グラフに示した。

(C) Pak1によりリン酸化した精製Shootin1と精製FLAG-cortactinを用いた*in vitro* binding assay。リン酸化の確認のために二種類の抗リン酸化shootin1抗体 (249番目もしくは101番目のセリン残基を認識) を用いてウエスタンブロッティングした。

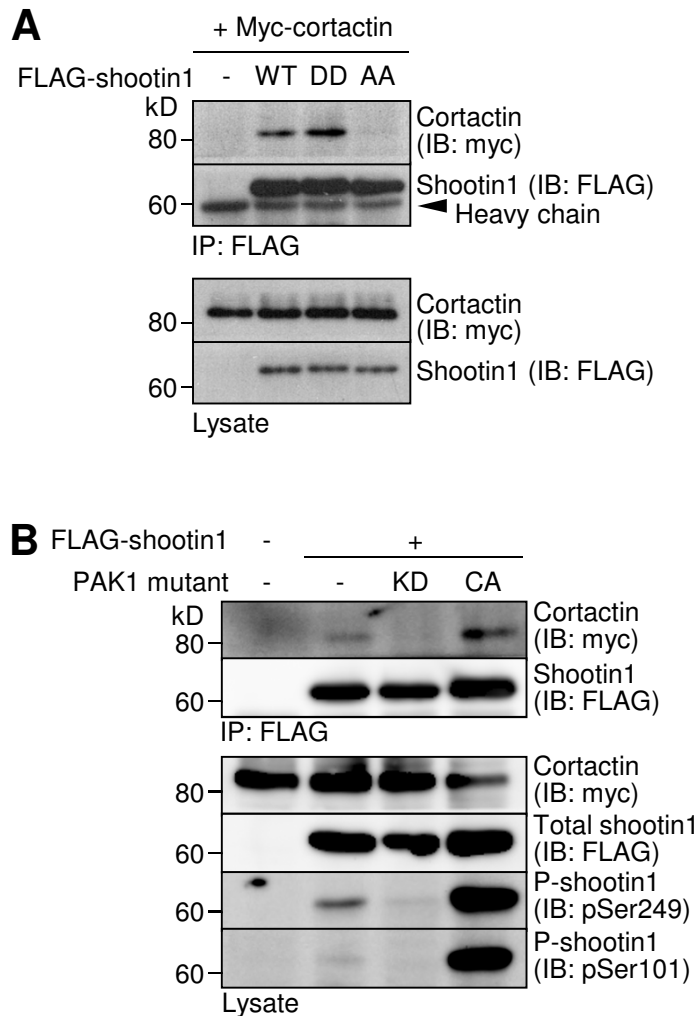
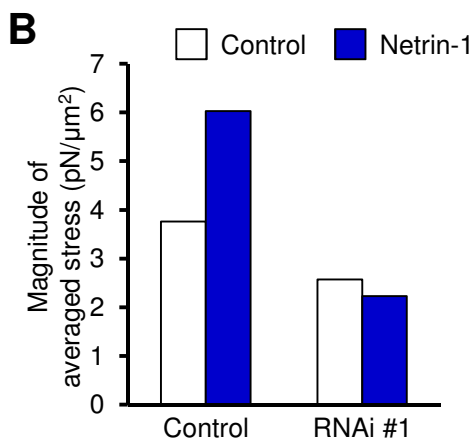
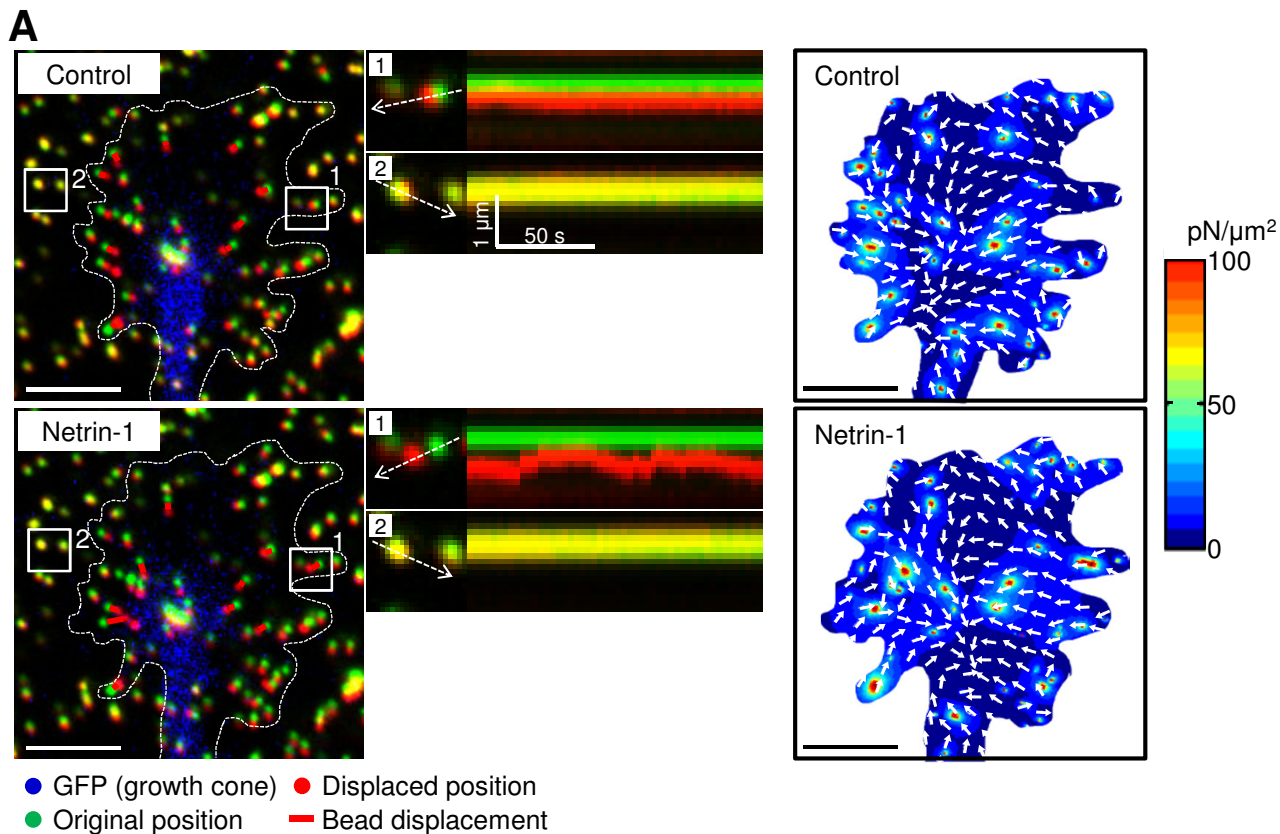


図19. COS-7細胞におけるCortactinとリン酸化Shootin1の結合解析

(A) COS-7細胞を用いた免疫共沈降。FLAG-shootin1を免疫沈降し、Myc-cortactinをウエスタンブロッティングにより検出した。WTはShootin1の野生型、DDはShootin1の擬似リン酸化体、AAはShootin1の非リン酸化体を示す。

(B) COS-7細胞を用いた免疫共沈降。FLAG-shootin1を免疫沈降し、Myc-cortactinをウエスタンブロッティングにより検出した。CAはPAK1の恒常活性化型、KDはPAK1のドミナントネガティブ変異体を示す。

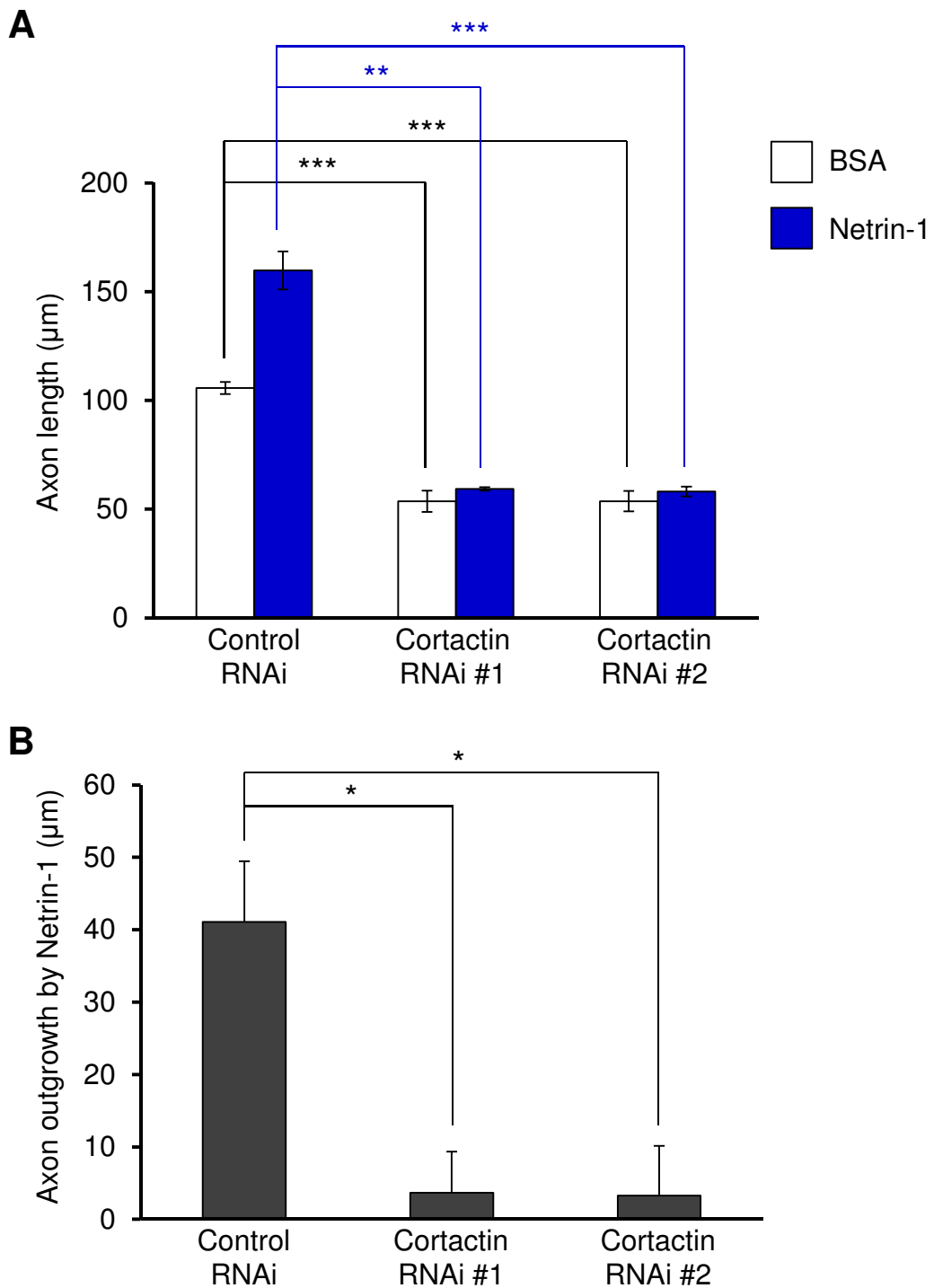




**図20. Traction force microscopyによる牽引力の解析**

(A) コントロール細胞の軸索の成長円錐 (上段, Netrin-1刺激前; 下段, Netrin-1刺激後) におけるTraction force microscopy。直径200 nm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の表面をL1-Fcコーティングし, その上で神経細胞を2日間培養した。Netrin-1刺激は, 終濃度300 ng/mlを添加し, 1時間インキュベートした。タイムラプスイメージは3秒間隔で撮影した。画像はビーズの初期位置 (緑) と移動したビーズ (赤) とEGFPを発現している成長円錐 (青) を示した。白枠で示したビーズのキモグラフを作成し, 中央に示した。右図は, 最初から30秒間における力の平均をヒートマップに示した。破線は成長円錐の境界を示している。Bar: 5 μm

(B) 成長円錐下の単位時間あたりの平均の牽引力を定量し, グラフに示した。



**図21. Netrin-1刺激による軸索伸長への影響**

培養海馬神経細胞をL1コーティングしたカバースリップに播種後、300 ng/mlのNetrin-1 (コントロールとしてBSA) を加え40時間培養し、抗Cortactin抗体を用いて免疫染色を行った。

(A) 軸索の長さを定量し、グラフに示した。(\*\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*,  $p < 0.02$ )

(B) Netrin-1で刺激した神経細胞の軸索の長さをBSAで刺激した神経細胞の軸索の長さを差し引いた長さを、Netrin-1刺激による軸索伸長としグラフに示した。

(\* ,  $p < 0.05$ )

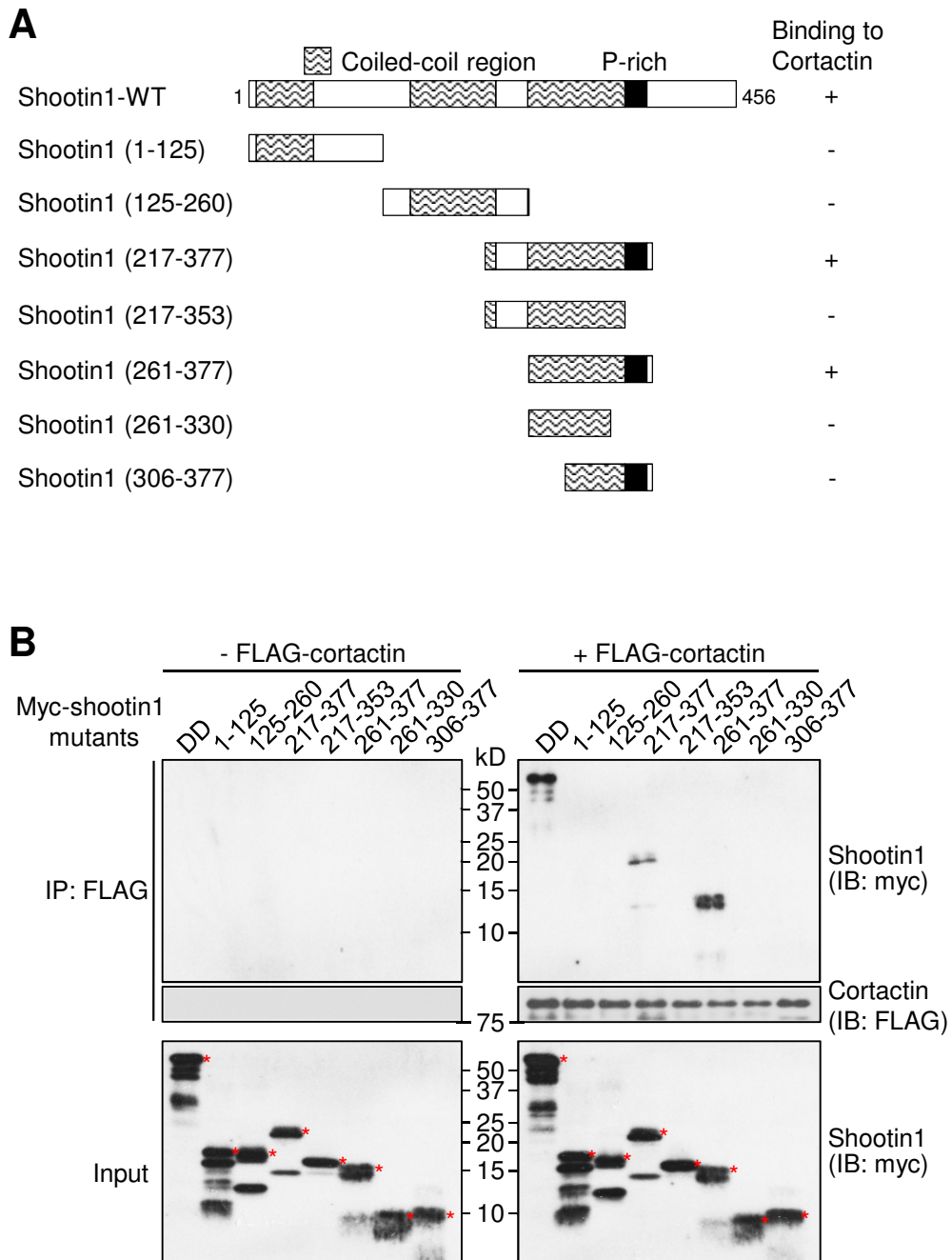
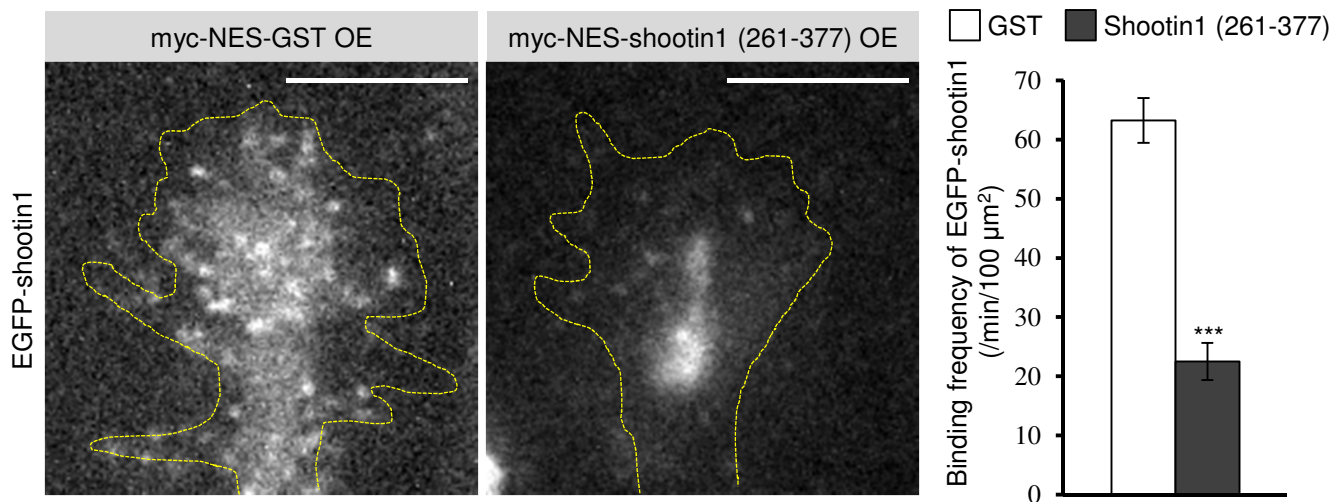


図22. Shootin1切断型変異体を用いたCortactinの結合部位の解析

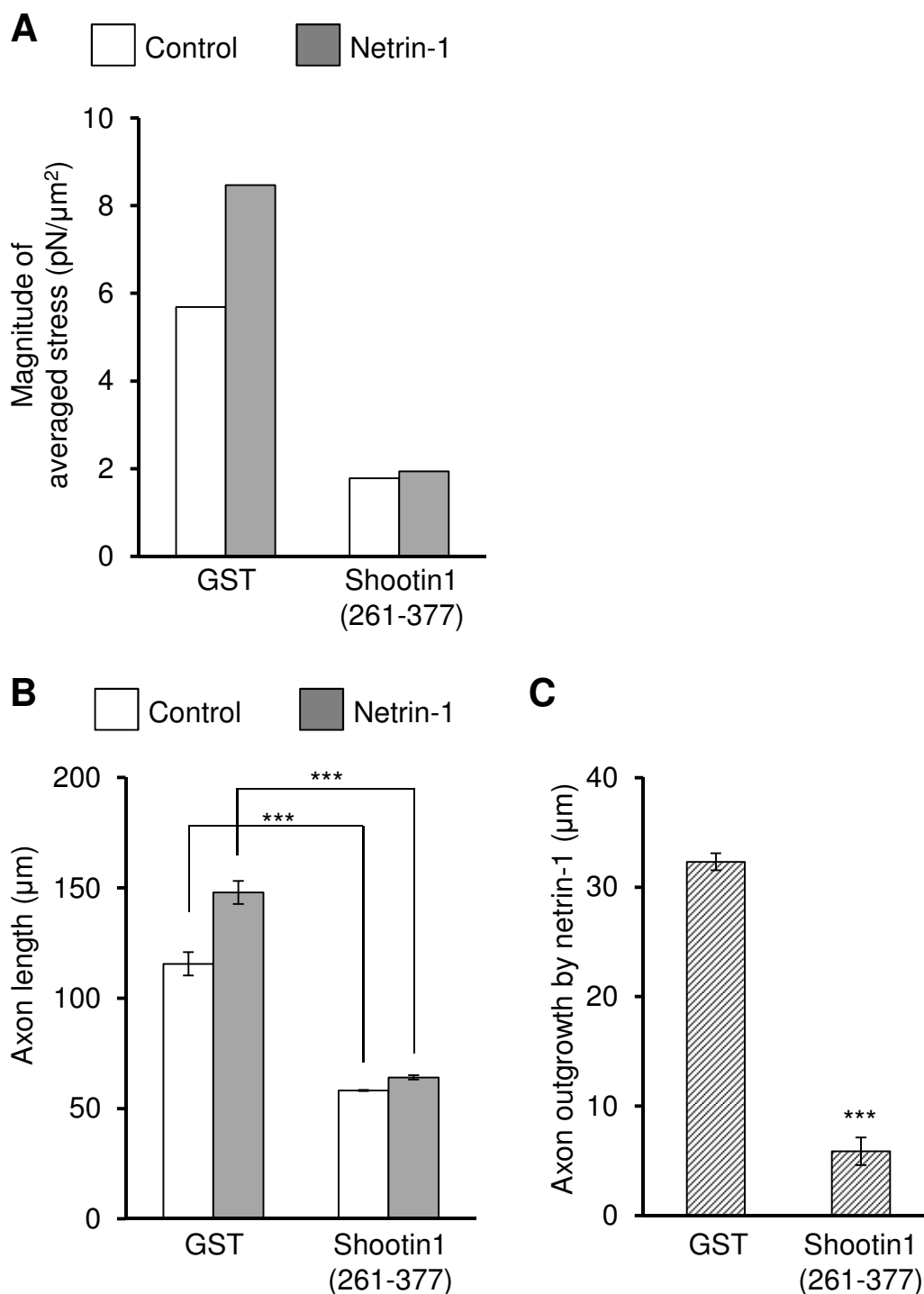
(A) Shootin1の切断型変異体の模式図。

(B) 精製タンパク質を用いた*in vitro* binding assay。精製タンパク質同士を混合し、抗FLAG抗体を用いて免疫沈降し、抗Myc抗体を用いてウエスタンブロッティングした。アスタリスクはShootin1の切断型変異体のバンドの位置を示す。



**図23. Shootin1切断型変異体 (Shootin1 (261-377)) 過剰発現細胞におけるEGFP-shootin1スペックルの出現頻度解析**

コントロール (GST過剰発現) 細胞 (左) またはShootin1 (261-377) 細胞 (中央) の軸索の成長円錐におけるEGFP-shootin1の細胞内一分子計測。タイムラプスイメージは5秒間隔で撮影した。破線は成長円錐の境界を示している。図の右側に1分間および100  $\mu\text{m}^2$ あたりのEGFP-shootin1の出現頻度をグラフに示した。 (\*\*\*,  $p < 0.01$ )  
Bar: 5  $\mu\text{m}$



**図24. Shootin1切断型変異体 (Shootin1 (261-377)) 過剰発現細胞における牽引力および軸索伸長の解析**

(A) コントロール細胞 (GST過剰発現) およびShootin1 (261-377) 過剰発現細胞におけるNetrin-1 (終濃度300 ng/ml, 1時間) 刺激前後の単位時間あたりの平均の牽引力を定量し, グラフに示した。

(B) 300 ng/mlのNetrin-1 (コントロールとしてBSA) を加え40時間培養したコントロール細胞 (GST過剰発現) およびShootin1 (261-377) 過剰発現細胞の軸索の長さを定量し, グラフに示した。 (\*\*\*,  $p < 0.01$ )

(C) Netrin-1で刺激した神経細胞の軸索の長さをBSAで刺激した神経細胞の軸索の長さを差し引いた長さを, Netrin-1刺激による軸索伸長としグラフに示した。 (\*\*\*,  $p < 0.01$ )

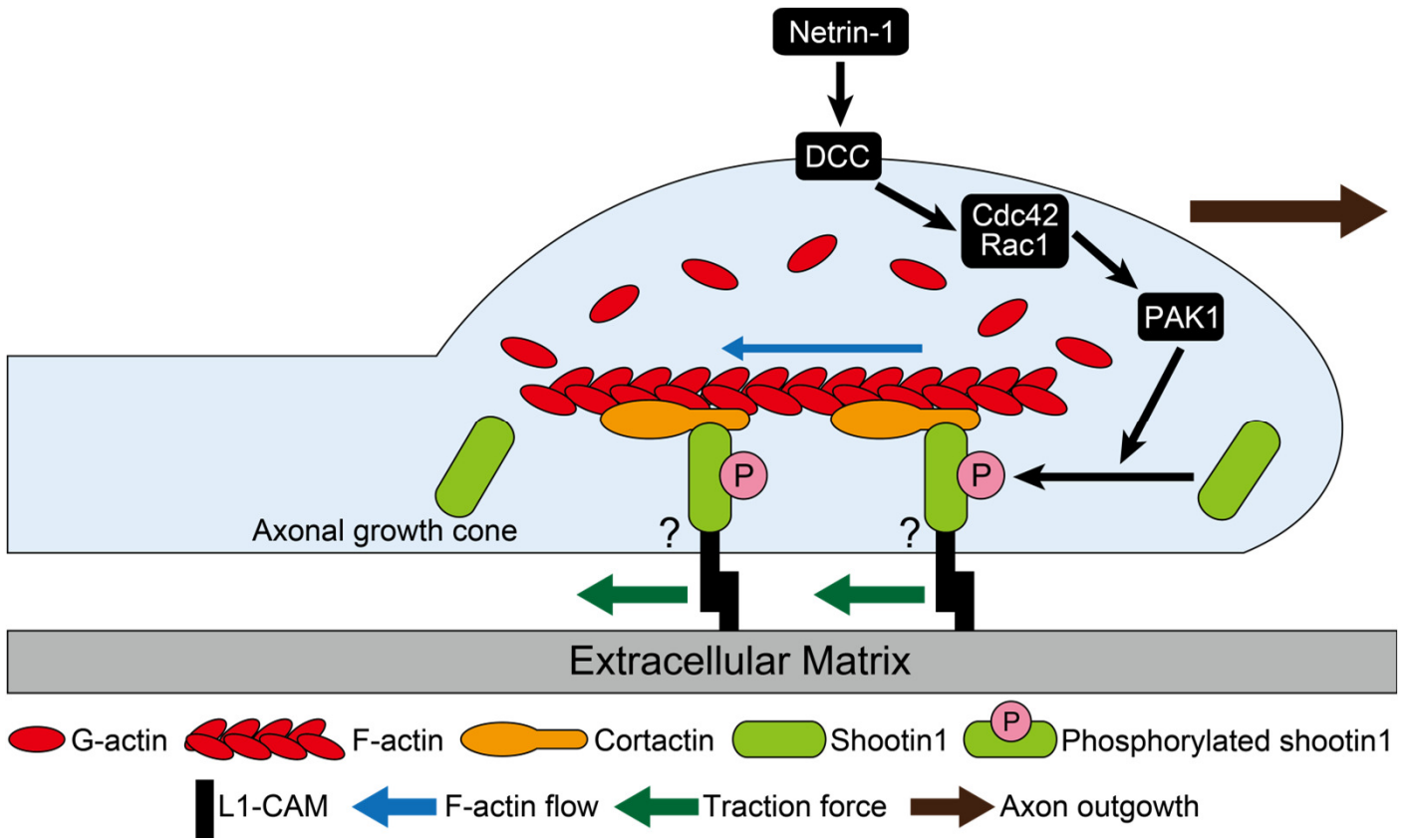
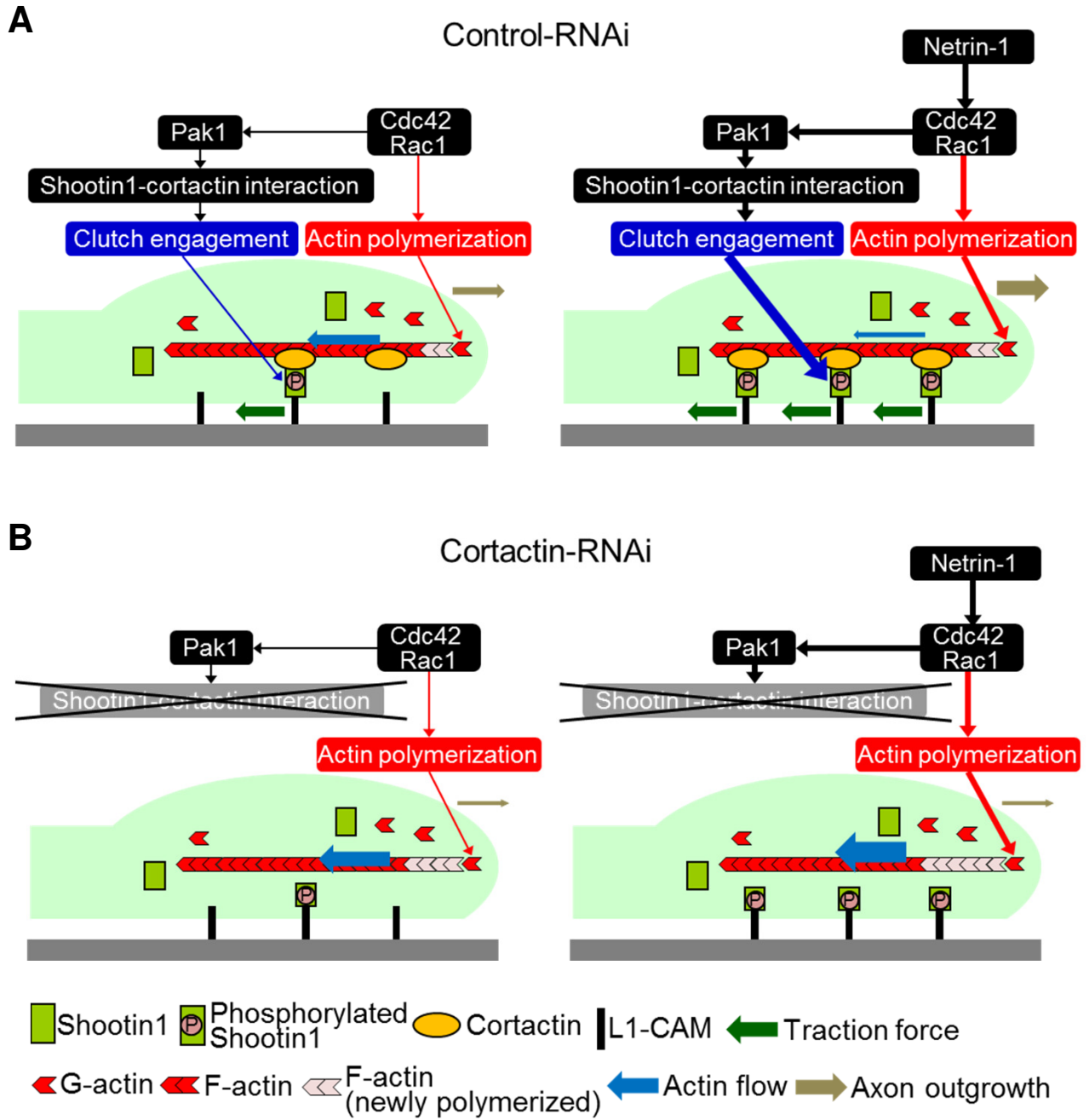


図25. シグナル伝達を軸索伸長のための力発生に変換するためのインターフェースとしてのCortactinとShootin1間の連結





補足図2. Netrin-1刺激時とCortactinの発現抑制時のF-actin逆行性移動，牽引力，軸索伸長に対する効果