

軸索の化学走性のための推進力を生み出す  
分子機構の解明

馬場 健太郎  
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 29 年 1 月 23 日提出

## 目次

<序論> .....	4
<材料と方法> .....	9
1. 細胞培養 .....	9
2. プラスミド作製 .....	10
3. 遺伝子導入 .....	11
4. コーティング用の L1-Fc の作製 .....	12
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 .....	12
6. 免疫共沈降 .....	12
7. タンパク質精製およびタンパク質濃度測定 .....	14
8. <i>In vitro</i> binding assay と <i>in vitro</i> kinase reaction.....	15
9. SDS-PAGE と CBB 染色 .....	15
10. ウェスタンブロッティング法 .....	16
11. 免疫細胞染色 .....	17
12. 軸索の長さおよび蛍光輝度の測定 .....	19
13. 蛍光スペックルの観察.....	19
14. Traction force microscopy .....	19
15. PDMS を用いた Guidance assay 用デバイスの作製と Guidance assay.....	20
16. 有意差検定 .....	20
<結果> .....	21
Shootin1-WT は L1 と相互作用する .....	21
Shootin1 は L1 と直接結合する .....	21
成長円錐先端導端の膜近傍領域において Shootin1 は L1 と共局在する .....	22
<i>In vitro</i> および培養細胞において Shootin1-DD は強く L1 に結合する .....	22
<i>In vitro</i> および培養細胞において Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1 の結合は促進される .....	23
神経細胞において Netrin-1 刺激による Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1 の結合は促進される .....	24
Shootin1 の N 末端側 1-125 アミノ酸領域は Shootin1 と L1 の相互作用を阻害する .....	25
Shootin1 と L1 の相互作用は Shootin1 のリン酸化によるアクチン線維と細胞接着 分子の連結の促進に関与する .....	26
Shootin1 と L1 の相互作用は Netrin-1 による軸索伸長のための推進力の促進に関 与する .....	27
Shootin1 と L1 の相互作用は Netrin-1 による軸索伸長の促進に関与する .....	28
Netrin-1 刺激を受容した成長円錐内領域で非対称に Shootin1 がリン酸化される 29	

Shootin1 と L1 の相互作用は Netrin-1 による軸索ガイダンスに関与する .....	30
<考察> .....	32
クラッチメカニズムは化学的なシグナル伝達を機械的な力の発生に効率良く変換する .....	32
Cortactin、Shootin1、L1 から成る三者複合体の構造学的研究の展望 .....	33
Netrin-1 以外の軸索の化学走性因子による Shootin1 と L1 の相互作用の制御 .....	34
Shootin1 以外の分子による Shootin1 と L1 との相互作用の制御 .....	34
Netrin-1 による軸索の化学走性におけるリン酸化 Shootin1 の重要性の検討 .....	37
総括 .....	39
<謝辞> .....	40
<参考文献> .....	41
<図表> .....	47

## < 序論 >

我々の脳内では、膨大な数の神経細胞が複雑かつ精巧な神経回路を形成している。神経細胞は軸索と呼ばれる長い突起を標的細胞に正しく伸長させることで神経回路を形成する。そのため、軸索を標的細胞の方向に正しく伸長させるための軸索ガイダンス（軸索の化学走性）は神経回路形成にとって重要であると考えられる。

軸索ガイダンス（軸索の化学走性）の際に重要な役割を果たすのは、軸索先端に存在する成長円錐である。成長円錐は今から約 125 年前にスペインの神経科学者 Cajal（カハール）により発見された（Cajal, 1890）。Cajal は成長円錐が周囲の化学走性因子の誘引シグナルを感知し、その方向に前進するための推進力を生み出すことで標的細胞に軸索が伸長することを予想した（Cajal, 1892）。このように Cajal は、成長円錐に軸索の化学走性のための推進力を生み出す機構があることを予想したが、長年の間、軸索を誘引する化学走性因子のシグナルが、どのようにして軸索の化学走性のための推進力に変換されるのかは不明であった。

成長円錐は末端領域（Peripheral domain）と中央領域（Central domain）に分けられる（Dent and Gertler, 2003）（図 1）。末端領域は糸状仮足（Filopodia）と葉状仮足（Lamellipodia）から成り、アクチン線維を豊富に含んでいる（図 1 の白の破線）。中央領域は主に微小管から成る（Dent and Gertler, 2003）。軸索が伸長する際には、成長円錐が推進力を生み出し糸状仮足と葉状仮足をダイナミックに動かしながら前方に進み、その結果として軸索が伸長する（Suter and Forscher, 2001 ; Lowery and Van Vactor, 2009）。また、成長円錐には軸索の化学走性因子の受容体が存在する（Dickson, 2002）。そのため、成長円錐は軸索の誘引および反発因子の化学的なシグナルを受容することで、軸索の伸長方向を決定し伸長方向に向かうための推進力を生み出すと考えられている（Dickson, 2002）。成長円錐が軸索伸長のための推進力を生み出すための要因の一つとして考えられているのが、成長円錐の末端領域で重合・脱重合を繰り返す（トレッドミリングする）アクチン線維である。アクチン線維の重合は成長円錐の先端側で起こり、脱重合は中央領域側で起こる（図 2）。この際に、アクチン線維は先端の末端領域側から中央領域側へ逆行性に移動する（Mallavarapu and Mitchison, 1999 ; Katoh et al., 1999）。このトレッドミリングするアクチン線維が軸索伸長のための推進力を生み出すモデルとしてクラッチモデルが提唱された（Mitchison and Kirschner, 1988）（図 2）。

## 細胞移動の力を生み出すクラッチモデル

1988年、Mitchison と Kirschner がクラッチモデルを提唱する以前に Forscher と Smith らが、成長円錐の前進にはアクチン線維が重要な役割を果たすことを報告した (Forscher and Smith, 1988)。Forscher と Smith らのアメフラシの培養神経細胞を用いた研究により、アクチン線維が豊富に存在する成長円錐の末端領域側から中央領域側へ波打ちながら細胞膜が後方へ移動する様子が観察された。そこで、Forscher と Smith らは微分干渉顕微鏡を用いて成長円錐の末端領域におけるアクチン線維を観察した。観察している際にアクチン線維の重合を阻害する薬剤 (サイトカラシン B) を添加すると、アクチン線維が消失しそれに伴って成長円錐の先端の突出 (前進) が抑えられる (成長円錐が退縮する) ことが解った。また、この薬剤を培養液中から除去すると時間経過とともに、成長円錐の末端領域側においてアクチン線維は重合していき、それに伴って成長円錐の先端が突出していく様子や、さらに、中央領域側へ向かってアクチン線維が後方に移動していく (後方に形成されていく) 様子が観察された (Forscher and Smith, 1988)。このことから、重合・脱重合を繰り返すアクチン線維 (トレッドミリングするアクチン線維) の後方移動が成長円錐前進のための動力源だと考えられた (Forscher and Smith, 1988)。この報告をもとに、Mitchison と Kirschner はトレッドミリングするアクチン線維による力を生み出す分子機構のモデルとしてクラッチモデルを提唱した (Mitchison and Kirschner, 1988) (図 2)。これは、トレッドミリングするアクチン線維と、細胞外の基質と結合する細胞接着分子 (Cell Adhesion Molecule: CAM) を連結するクラッチ分子によりアクチン線維の移動の力が細胞外基質に伝わり (図 2、クラッチ分子による連結)、軸索伸長のための推進力が生じて成長円錐が前進するというモデルである。しかしながら、当時は、軸索伸長を引き起こすクラッチ分子の実態は不明であった。クラッチモデルを証明することは、軸索伸長だけでなく、細胞移動のための力を生み出す基本原理を理解する上で重要である。そのため、クラッチ分子を同定しクラッチ分子による細胞移動のための力を生み出す分子機構を明らかにする研究は世界的に注目されている。

## 軸索伸長促進分子 Shootin1

本研究室において、神経細胞の軸索先端の成長円錐に濃縮し軸索伸長を促進させる分子として Shootin1 が同定された (Toriyama et al., 2006)。しかしながら、Shootin1 がどのようにして軸索伸長を引き起こすのかは

不明であった。そこで、Shootin1 がクラッチ分子として機能するのではないかと考え本研究室において以下の研究が行われた。蛍光スペックルの観察から、mCherry-actin と同様に、アクチン線維の逆行性移動に沿って EGFP-shootin1 のスペックルが移動することが観察された (Shimada et al., 2008)。また、細胞接着分子 L1 (L1-CAM) でコーティングしたビーズを成長円錐の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て動くことが観察された。Shootin1 の遺伝子発現を抑制すると、逆行性に動くビーズの移動速度が遅くなることが解った。これらのことから、Shootin1 がトレッドミリングするアクチン線維と細胞接着分子 L1 を連結することにより軸索伸長に必要な推進力を生み出すクラッチ分子として機能することが示唆された (Shimada et al., 2008)。

クラッチ分子 Shootin1 に関してその後の *in vitro* の実験で、リン酸化酵素 Pak1 (p21 activated kinase 1) により Shootin1 は直接リン酸化され、Pak1 により Shootin1 の 101 番目および 249 番目のセリン (S) がリン酸化されることが示された (Toriyama et al., 2013)。また、軸索の化学走性因子 Netrin-1 の刺激により Pak1 を介して Shootin1 のリン酸化が促進されることが示された (Toriyama et al., 2013)。ドミナントネガティブ型の Pak1 (Pak1-DN) を発現させた神経細胞では、Pak1-DN により内在性の Pak1 のリン酸化の働きが阻害され、成長円錐で発生する軸索伸長のための推進力は減少する (Toriyama et al., 2013)。Pak1-DN と共に擬似リン酸化型の Shootin1 (101 番目と 249 番目のセリン(S)をアスパラギン酸(D)に置換した Shootin1) を発現させた神経細胞では、Pak1-DN を発現させた神経細胞に比べて、軸索伸長のための推進力が上昇することが示された。これらのことから、Netrin-1 刺激による Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により軸索伸長のための推進力が促進されることが示された (Toriyama et al., 2013)。さらには、アクチン結合分子である Cortactin の蛍光スペックルの観察から、EGFP-cortactin がアクチン線維の逆行性移動に沿って動くことが観察され、*in vitro* の実験で Cortactin が Shootin1 と直接結合することが示された (Kubo et al., 2015)。Cortactin 遺伝子の発現抑制および Shootin1 と Cortactin の相互作用の阻害により、軸索伸長のための推進力が減少することが示された (Kubo et al., 2015)。これらのことから、新規クラッチ分子として Cortactin が同定され、Shootin1 と Cortactin の結合がトレッドミリングするアクチン線維の駆動力を細胞接着分子 L1 に伝えて軸索伸長のための推進力を生み出すことが示唆された (Kubo et al., 2015)。以上のように、クラッチメカニズムによる軸索伸長のための推進力を生み出す分子機構は解明されつつあるが、クラッ

チメカニズムによる力の発生の最後の決め手となる Shootin1 と L1 の相互作用については不明な点がある (図 3)。Shootin1 と L1 が直接結合するのかあるいは他の未知の分子を介して間接的に結合するのかということ (図 3、不明な点 1)、Shootin1 と L1 の相互作用がどのように制御されるか (図 3、不明な点 2)、両者の相互作用が軸索伸長のための推進力の発生に関与するか (図 3、不明な点 3) という点は不明である。また、本研究室において、軸索の化学走性因子 Netrin-1 の刺激による Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化は軸索伸長のための推進力を促進することが示された (Toriyama et al., 2013)。しかしながら、Netrin-1 の刺激の方向へ成長円錐をターニングさせるための軸索ガイダンスに Shootin1 と L1 の相互作用およびクラッチメカニズムが関与するかは不明である (図 3、不明な点 4)。

一方、Shootin1 と相互作用する細胞接着分子 L1 では、これまでに L1 の遺伝子に変異のある患者が神経系の疾患になることから、L1 は神経回路形成において重要な役割があると考えられている。

### 細胞接着分子 L1 (L1 Cell Adhesion Molecule, L1-CAM)

細胞接着分子 L1 (L1-CAM、以下 L1 と記す) は一回膜貫通タンパク質であり、分子量は約 200-220kDa である。免疫グロブリンスーパーファミリーに属しており、L1 のホモログとしては CHL1、Neurofascin、NrCAM (Neuron-glia-related CAM) がある (Herron et al., 2009)。L1 の細胞外領域は別の L1 の細胞外領域とホモフィリックに結合する (Kamiguchi et al., 1998)。また、L1 は細胞接着や細胞移動に関与する Integrin などの細胞外領域とヘテロフィリックに結合し、細胞外基質の一つであるラミニンとも結合する (Haspel and Grumet, 2003)。L1 の細胞内領域はアクチン線維と相互作用する分子と結合し、それら分子に Ezrin (Tunrunen et al., 1994) と Ankyrin B (Cunha and Mohler, 2009) がある (これら分子の機能とこれら分子と L1 との相互作用については考察に記述した)。L1 はこれらの分子と相互作用することでアクチン線維の挙動を細胞接着分子の細胞外領域や細胞外基質といった足場に伝えて細胞運動するための力を生み出すと考えられている (Herron et al., 2009)。L1 の遺伝子を欠失したマウスでは、皮質髄質経路における軸索ガイダンスが異常になること (Cohen et al., 1997) や、L1 を欠失したマウスの神経細胞の軸索の長さが短くなること (Fransen et al., 1998) が報告されている。他には、L1 の遺伝子を欠失したマウスでは、脳室の拡大や、大脳皮質の形成不全 (Rolf et al., 2001)、探索行動の異常が見られ (Fransen et al., 1998)、L1 の遺伝子を

発現抑制すると大脳皮質における神経細胞の移動が遅れることが報告されている (Tonosaki et al., 2014)。ヒトでの L1 遺伝子の変異は、脳の左右を繋ぐ軸索の形成不全を引き起こすことが報告されており、他には水頭症、精神遅滞といった神経疾患を引き起こすことが報告されている (Fransen et al., 1997 ; Weller and Gartner, 2001)。L1 の遺伝子欠失や遺伝子変異により軸索伸長や軸索ガイダンスが異常になることから、L1 が軸索の化学走性のための力の発生に関与する可能性が考えられる。しかしながら、これまで L1 による軸索の化学走性のための推進力を生み出す分子機構はよく解っていない。

本研究では、軸索伸長の推進力を生み出すクラッチメカニズムの決め手となる Shootin1 と L1 の相互作用の不明な点に注目し、両者の相互作用が化学的なシグナルを機械的な力に変換するかを調べる。これにより、脳内の神経回路形成に重要となる成長円錐のターニングおよび軸索ガイダンス（軸索の化学走性）にクラッチメカニズムが関与するかを明らかにし、Cajal により予想されていたがこれまで不明なままであった軸索の化学走性のための推進力を生み出す分子機構を理解することを目指した。



## <材料と方法>

### 1. 細胞培養

#### 1-1. HEK293T 細胞（ヒト胎児由来腎臓細胞）の培養

直径 10 cm のディッシュ（Greiner）上で、終濃度 10% のウシ胎仔血清（Fetal bovine serum：FBS（ジャパン・バイオシーラム））および Penicillin / Streptomycin（P/S）（終濃度：100 units / mL Penicillin, 100  $\mu$ g / mL Streptomycin（ナカライ））を含む Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM（Sigma））で、HEK293T 細胞を培養した（37°C, 5% CO<sub>2</sub>）。培養中にディッシュが約 80 % の細胞密度になったら継代培養を行った。

#### 1-2. XTC 細胞（アフリカツメガエル由来線維芽細胞）の培養

25 cm<sup>2</sup> のフラスコ（Greiner）上で終濃度 10% FBS および Penicillin / Streptomycin（終濃度：100 units / mL Penicillin, 100  $\mu$ g / mL Streptomycin）を含む 70% Leibovitz's L-15 medium（L-15（GIBCO））で、XTC 細胞を培養した（23°C, 5% CO<sub>2</sub>）。培養中にディッシュが約 80 % の細胞密度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 あるいは日本クレア）の脳を取り出し、氷上の Solution G 溶液（終濃度：0.4% Glucose（ナカライ））を含む PBS（pH 7.4, GIBCO）中に置いた。その後、クリーンベンチ内で海馬のみを取り出し、組織から細胞を分散させるために海馬を氷上の Solution A+ 溶液（終濃度：0.18% Glucose（ナカライ）、0.1% BSA（Sigma）、0.0012% DNase（Sigma）、0.05% Papain（ナカライ））を含む PBS pH 7.4 の溶液）中に入れて回収した。その後、37°C で 20 分インキュベートし、上清を除いてから Solution A- 溶液（終濃度：0.18% Glucose, 0.1% BSA, 0.0012% DNase I を含む PBS pH 7.4 の溶液）を 2 ml を加えて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- 溶液を 6 ml 加え 37°C で 20 分インキュベートした。パスツールピペットを用いて DNA の塊や組織の破砕片を吸い取り除去した後、細胞を含んだ溶液を遠心（1000 rpm, 4°C, 15 分）し、上清を除去し PBS を 5 mL 加えて懸濁し、再び、遠心（1000 rpm, 4°C, 15 分）した後、上清を除去して、10% FBS を含む Neurobasal medium（GIBCO）1 - 5 ml に再懸濁した。血球計算盤を用いて細胞数をカウントした後、poly-D-Lysine（Sigma）あるいは L1-Fc（下記に記述）でコーティングしたガラスカバースリップ（MATSUNAMI）や、

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 (ナカライ)、Penicillin / Streptomycin (P/S) (終濃度 : 100 units / mL Penicillin, 100  $\mu$ g / mL Streptomycin (ナカライ)) を含む Neurobasal medium で培養した (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。

## 2. プラスミド作製

### 2-1. 遺伝子発現ベクターの構築 (Shootin1 切断変異型の作製)

Shootin1 の切断型変異体は、pBluescript-shootin1 (human) を template として、制限酵素サイトを付加したプライマー (下記表 1 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た後、動物細胞の遺伝子導入のための発現ベクターおよびタンパク質精製の発現ベクターに目的の DNA を組み込んだ。蛍光スペクトルを観察するために遺伝子導入したベクターは pEGFP-C1、pAcGFP である。目的の遺伝子をより強く過剰発現させるために、pCAGGS-myc、pCAGGS-EGFP ベクターを用いた。また、大腸菌にタンパク質を発現させる用のベクターとして pGEX-6P-1 ベクターを用いた。下記の表 1 に遺伝子名とプライマーの種類、組み込んだ発現ベクターを示す。

表 1. 遺伝子名、プライマー、発現ベクター

遺伝子名	プライマー (5'→3') Fw: Forward, Rv: Reverse, 制限酵素配列 (グレー色)	発現ベクター
Shootin1 (1-125 a.a.)	Fw: (BamH I 配列) AAGGATCCATGAACAGCTCGGACG	pCAGGS-myc pCAGGS-EGFP
	Rv: (Sal I 配列) GTCGACCTAAGTCGAATCTTCATCCATCAA	pAcGFP-C1 pEGFP-C1 pGEX-6P-1
	Fw: (BamH I 配列) TTGGATCCACAGACACAGACGGTGCCGC	pCAGGS-myc
	Rv: (Sal I 配列) AAGTCGACCTACTGATCAGGGATGGAGCT	pGEX-6P-1
Shootin1 (217-456 a.a.)	Fw: (BamH I 配列) CTGGATCCATGCAAGTAAACCTGGAGCTG Rv: (BamH I 配列) CTGGATCCCTACTGGGAGGCCAGTATTCC	pCAGGS-myc pGEX-6P-1

Shootin1 (261-377 a.a.)	Fw: (BamH I 配列)	
	CTGGATCCAGCTTTTGAAGCTTTAGAC	pCAGGS-myc
	Rv: (BamH I 配列)	pGEX-6P-1
	CTGGATCCCTAGATCATGGACATGAGGGA	

### 3. 遺伝子導入

#### 3-1. HEK293T 細胞への遺伝子導入

HEK293T 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 medium 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 2.5 M CaCl<sub>2</sub> (ナカライ) 溶液に等量の 2×BES 溶液 (終濃度: 50 mM BES (C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>S\_Sigma), 280 mM NaCl (ナカライ), 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (ナカライ), pH 7.2) を加える。加える際には、プラスミド DNA を含む 2.5 M CaCl<sub>2</sub> 溶液をオートピペッターで泡立てながら 2×BES 溶液を滴下する。滴下後 25 分間静置した。静置したプラスミド DNA を含むリン酸カルシウム溶液を medium に滴下しながら加え、インキュベータ内で 24 時間培養した。24 時間後新しい medium に交換し、さらに 24 時間培養した後、遺伝子導入した細胞を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) に播種し、細胞を約 70% コンフルエントになるまで約 5 日間培養した。100 μl の L-15 medium に X-tream Gene Transfection Reagent (μL, (Roche)) とプラスミド DNA (μg) を 3:1 になるように混合し室温で 15 分間静置した。その後、medium へ混合液を滴下し培養した。24 時間後目的の実験に使用した。

#### 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では、Rat Neuron Nucleofector Kit (Lonza) を用いた電圧ポレーション法を行った。上述した材料と方法 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 (1000 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 (1000 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 25 μl の Supplement (1 反応あたり) の混合液で再懸濁した。Total 3~5 μg のプラスミド DNA を加えて、電圧ポレーション専用のキュベットに入れ、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すぐに 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、目的の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

直径 10 cm ディッシュに HEK293T 細胞を 80%コンフルエントになるまで培養し、1 ディッシュあたり 40 µg の pCAGGS-L1-Fc (L1 細胞外ドメイン融合 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。遺伝子導入されたベクターは L1-Fc (L1 細胞外ドメイン融合 Fc) タンパク質として細胞外 (medium) に分泌される。遺伝子導入した 24 時間後に 10%FBS 含有 DMEM で洗浄し、48 時間 DMEM (FBS-free) に変えて培養した。その後、L1-Fc タンパク質を含む培養上清を回収し遠心 (3500 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 0.1 mg/ml の PDL (Sigma) をのせ、37°C で 3 時間以上インキュベートした。

##### 5-2. L1-Fc (L1 細胞外ドメイン融合 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 α-Fc 抗体 (Jackson) をのせ、37°C で 3 時間インキュベートし、α-Fc 抗体でコーティングした。PBS で洗浄後、作製した L1-Fc をのせ 37°C で一晩インキュベートし L1-Fc コーティングした。

#### 6. 免疫共沈降

##### 6-1. 培養細胞における免疫共沈降

上記に示した方法で遺伝子導入し、目的のタンパク質を発現させた HEK293T 細胞を免疫共沈降実験に用いた。遺伝子導入した HEK293T 細胞のディッシュから medium を取り除き PBS で細胞を洗浄した後、氷上でディッシュに NP-40 lysis buffer (終濃度 : 0.5% NP-40 (ナカライ), 20

mM HEPES (ナカライ) pH 7.5, 3 mM MgCl<sub>2</sub> (ナカライ), 100 mM NaCl, 1 mM Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA, ナカライ), 1 mM Dithiothreitol (DTT, ナカライ), 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, ナカライ), 0.01 mM Leupeptin (ナカライ), 1×PhosStop(Roche)) を 500 μl を加え、セルスクレイパーを用いて細胞を掻き取った。細胞破碎液を 1.5mL チューブに移し氷上で 15 分間静置し、細胞の不溶性画分を取りぞくために遠心 (15000 rpm, 4°C, 15 分) した。その後、細胞破碎液の上清を回収した。上清に 1 μg の抗体を加え 4°C で 12 時間以上回転混和した。その後、抗体を含む上清を遠心 (15000 rpm, 4°C, 15 分) し上清を回収した。予め NP-40 buffer で平衡化した Protein G-Sepharose 4B (GE healthcare) 30 μl (bed volume) を加え 4°C で 2 時間回転混和した。反応後、反応液を遠心 (3000 rpm, 4°C, 30 sec) し、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 IP wash buffer (終濃度: 0.1% Tween 20 (ナカライ), 20 mM HEPES pH 7.5, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT) を加え 5 回転倒混和した後、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 μl の 2×SDS sample buffer を加え、ウェスタンブロットティングに用いるサンプルとした。

## 6-2. 皮質神経細胞を用いた免疫共沈降

上記に示した同様の方法で脳の皮質組織から神経細胞を分散し、PDL コーティングした直径 10 cm のディッシュ (Greiner) に細胞を播種する。培養 24 時間後、非神経細胞の増殖を抑えるため Ara-C (Cytosine β-D-arabinoside, 終濃度: 10 μM (Sigma)) を加える。培養 48h 後、Netrin-1 (終濃度: 300 ng / mL (Sigma)) または 0.1% BSA (Sigma) を添加して、1h 後、ディッシュから medium を取り除き PBS で細胞を洗浄した後、氷上でディッシュに NP-40 / Triton lysis buffer (終濃度: 0.5% NP-40, 1% Triton (ナカライ), 20 mM HEPES pH 7.5, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.01 mM Leupeptin, 1×PhosStop) 500 μl を加え、スクレイパーを用いて細胞を掻き取った。細胞破碎液を 1.5mL チューブに移し氷上で 15 分間静置し、細胞の不溶性画分を取りぞくために遠心 (15000 rpm, 4°C, 15 分) した後、細胞破碎液の上清を回収した。上清に 5 μg の抗体を加え 4°C で 12 時間以上回転混和した。その後、抗体を含む上清を遠心 (15000 rpm, 4°C, 15 分) し上清を回収した。予め NP-40 buffer で平衡化した Protein G-Sepharose 4B (GE healthcare) 50 μl (bed volume) を加え 4°C で 2 時間回転混和した。反応後、溶液を遠心 (3000

rpm, 4°C, 30 sec) 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 IP wash buffer (終濃度: 0.1% Tween 20, 20 mM HEPES pH 7.5, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT) を加え 5 回転倒混和した後、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 µl の 2×SDS sample buffer を加え、ウェスタンブロッティングに用いるサンプルとした。

## 7. タンパク質精製およびタンパク質濃度測定

### 7-1. タンパク質精製

pGEX-6P-1 vector を大腸菌 BL21 (codon plus) に形質転換し抗生物質 Ampicillin (終濃度: 50 µg/mL) を含む LB plate で培養した。シングルコロニーを Ampicillin (終濃度: 50 µg/mL) を含む LB 液体培地で一晩振盪培養を行った (前培養、小スケール)。その後、この培地を新たに用意した Ampicillin 含有 LB 培地に加えて培養 (200 rpm, 37°C) し、OD:600 が 0.6~0.7 になるまで培養を行った (本培養、大スケール)。目標値に達した後、培地を 15°C に冷却し、タンパク質の発現を誘導させるために Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, ナカライ) を終濃度 0.1 mM になるように加え、20-24 時間振盪培養 (150 rpm) を行った。培養終了後、遠心 (4000 rpm, 15 min, 4°C) により上清を除去した後菌体を回収し、氷冷した PBS に菌体を再懸濁し、再び遠心 (4000 rpm, 15 min, 4°C) により上清を除去した後菌体を回収した (菌体-80°C 保存)。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, 1 mM PMSF, 0.01 mM Leupeptin,) 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 (36,000 rpm, 4°C, 60 分) し、上清を回収した。回収した上清を 0.45 µm のフィルターを用いて濾過した後、pH を 8.0 に調節した。そこに、TED buffer で平衡化した Glutathione sepharose 4B (GE healthcare) を加え、4°C で 2 時間回転混和した。遠心 (3000 rpm, 4°C, 30 sec) 後、Wash buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) で Glutathione sepharose 4B を洗浄し、15 mM 還元型 Glutathione (ナカライ) を含む TED buffer (pH 8.0) 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 を Glutathione sepharose 4B で取り除き、GST が切断された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 3L の TED buffer で 20 h 以上透析した (コールドルームで透析)。その後、2 回透析を繰り返した。透析後、

タンパク質溶液を回収した。

## 7-2. タンパク質濃度測定 (Bradford 法)

氷上で濃度既知の BSA 濃度の希釈系列を作る (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/mL)。次に、氷上で濃度未知のタンパク質溶液に対して希釈系列を作る (×1, ×2, ×5, ×10, ×20, ×50)。各希釈系列の BSA 溶液およびタンパク質溶液に Protein assay CBB 溶液 (ナカライ) を加えた後、室温で 5 分静置する。その後、各溶液の波長 595 nm の吸光度を測定する。濃度既知の BSA の吸光度から検量線を作成し、BSA の検量線から濃度未知のタンパク質溶液の濃度を算出した。Bradford 法を用いてタンパク質精製した溶液のタンパク質濃度および、細胞破砕液のタンパク質濃度を測定した。

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

### 8-1. *In vitro* binding assay

精製した GST-L1-ICD (GST 融合 L1 intracellular domain\_100 nM) と精製した Shootin1 (100 nM) を Reaction buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 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、遠心 (15000 rpm, 4°C, 15 分) し上清を回収し、予め Reaction buffer で平衡化した Glutathione sepharose 4B を 50 $\mu$ l (bed volume) 加え、4°C で 2 時間回転混和した。その後、遠心 (3000 rpm, 4°C, 30 sec) し上清を除去し、終濃度 300 mM NaCl を含んだ Reaction buffer 1mL を加えて 5 回転倒混和した。これを 3 回繰り返して Glutathione sepharose 4B を洗浄した。その後、上清に 25  $\mu$ l の 2×SDS sample buffer を加え、SDS-PAGE およびウエスタンブロットティングに用いるサンプルとした。

### 8-2. *In vitro* kinase reaction ( *in vitro* での Pak1 による Shootin1 のリン酸化反応)

250 ng 精製 GST-Pak1 (Invitrogen) と 2.1  $\mu$ g の精製 Shootin1 を 20  $\mu$ l の kinase reaction 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 Adenosine triphosphate (ATP, Sigma)) に加え、30°C で 120 分間反応させた。

## **9. SDS-PAGE と CBB 染色**

### 9-1. SDS-PAGE

ポリアクリルアミドゲル (Stacking gel 縦 1cm×横 9cm、Separation gel 縦 5.5cm×横 9cm) を作成する。ゲルを専用の電気泳動装置にセットし電

電気泳動 Buffer（終濃度：25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1 % SDS）に浸す。ポリアクリルアミドゲルのウェルを電気泳動 Buffer で洗浄した後、サンプルをウェルにローディングした。ゲルの下の気泡を取った後、500 V、25 mA（ゲル 1 枚あたり）で電気泳動した。サンプルの色素がゲルの一番下端まできたら電流を止める。SDS-PAGE 後のゲルを用いて引き続きウェスタンブロッティング（下記に示す）を行った。あるいは、ゲルを CBB 染色した（下記に示す）。

## 9-2. CBB 染色

SDS-PAGE 後のポリアクリルアミドゲルを容器に移し、milliQ でゲルを洗う。その後、CBB 染色液（終濃度：0.05 % Coomassie Brilliant Blue (CBB, ナカライ), 10 % AcOH, 40 % MtOH）にゲルを浸し 30 min 振盪し、ゲルのタンパク質を CBB 染色する。その後、染色したゲルを Destaining 液（終濃度：10 % AcOH, 20 % MtOH）に浸してゲルのバックグラウンドの CBB を脱色する。CBB 色素を吸着させるためのキムワイプもゲルと共に浸す。色素が大分抜けてきたら、Option 液（5 % AcOH）に置換しゆっくりとバックグラウンドの CBB 色素を抜いた。最後に milliQ でゲルを洗い減圧乾燥を行った。

## 10. ウェスタンブロッティング法

SDS-PAGE 後のポリアクリルアミドゲル内のタンパク質を PVDF 膜（Millipore）へ転写する際には、Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell（Bio-Rad）を使用し、室温 90min で 2 mA/cm<sup>2</sup> の電流を流した。転写後の PVDF 膜を 3% スキムミルクを含む TBS（20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl）溶液に浸し、室温で 60 分間ブロッキングする。また、転写後のゲルはタンパク質の確認のため CBB 染色した。ブロッキングした PVDF 膜を 3% スキムミルクおよび一次抗体を含む TBS 溶液に浸し 4°C で一晩静置した。一次抗体反応後の PVDF 膜を 0.05% Tween 20 を含む TBS（TBST）溶液に浸し 8 分振盪した。これを 3 回繰り返し一次抗体反応後の PVDF 膜を洗浄した。その後、PVDF 膜を、二次抗体を含む TBST 溶液に浸し室温で 1 時間静置した。その後、PVDF 膜を TBST に浸し 8 分振盪を 3 回繰り返し洗浄した。その後、洗浄した PVDF 膜を ECL 試薬（GE healthcare）を溶液に浸して、二次抗体に結合する HRP（Horseradish peroxidase）を発光させる、発光を X 線フィルム（Fuji film）に感光させて検出した。あるいは、冷却 CCD カメラを搭載した ImageQuant LAS 4000（GE healthcare）により HRP による化学発光を検出し画像としても取り込んだ。タンパク



質転写の確認のため使用後の PVDF 膜は CBB 染色した。

ウエスタンブロッティングに用いた抗体の抗体名、免疫動物、メーカー、希釈倍率を以下の表 2 と表 3 に示す。

表 2. 一次抗体

抗体名	免疫動物と種類	メーカー	希釈倍率
anti-shootin1	rabbit, polyclonal	当研究室にて作製	×500
anti-phosphorylated shootin1(S101)	rabbit, polyclonal	当研究室にて作製	×1000
anti-phosphorylated shootin1(S249)	rabbit, polyclonal	当研究室にて作製	×1000
anti-Flag-tag	rabbit, polyclonal	MBL	×2000
anti-Flag-tag	mouse, monoclonal	MBL	×5000
anti-myc-tag	rabbit, polyclonal	MBL	×2000
anti-myc-tag	mouse, monoclonal	MBL	×2000
anti-L1	goat, polyclonal	Santacruz	×1000

表 3. 二次抗体

抗体名	メーカー	希釈倍率
Goat anti-mouse IgG HRP	Millipore	×5000
Donkey anti-rabbit IgG HRP	GE healthcare	×5000
Donkey anti-goat IgG HRP	Millipore	×5000

## 11. 免疫細胞染色

神経細胞が培養されているディッシュ（Iwaki あるいは MATSUNAMI）に 7.4% ホルマリン（ナカライ）を含む PBS を medium と等量加え（ホルマリンの終濃度 3.7%）、氷上で 20 分間固定した。そこに氷冷した PBS を 2 ml 加え、ゆっくり吸い取り、新たな氷冷 PBS を 2 ml を加えた。この操作をもう一度繰り返し、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。PBS を完全に吸い取り、そこに氷冷 0.05% Triton X-100 を含む PBS を加え、氷上で 15 分間静置し透過処理をした。透過処理終了後、0.05% Triton X-100 を含む PBS を完全に吸い取り、10% FBS を含む PBS を 500  $\mu$ 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、10% FBS を含む PBS で希釈した一次抗体を含む溶液を加え、4°C で一晩反応させた。一次抗体反応終了後、一次抗体反応の溶液を吸い取り、氷冷した PBS を加え、再び吸い取り氷冷 PBS を加えて氷上で 1 時間静置した（一次抗体の洗浄）。その後、吸い取り PBS で希釈

した二次抗体を含む溶液を加え、遮光して室温で 1 時間静置した。二次抗体反応終了後、二次抗体反応の溶液を吸い取り、室温 PBS を加え、再度、吸い取り室温 PBS を加えて、室温で 30 分静置した（二次抗体の洗浄）。アクチン線維の染色を行う際には、二次抗体反応後に 50 倍希釈した Alexa Fluor 350 Phalloidin を加え反応を行い、二次抗体の洗浄方法と同様に Alexa Fluor 350 Phalloidin を洗浄した。洗浄後、カバースリップでの免疫細胞染色の場合、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）を上へのせ、終濃度 50% グリセロール（ナカライ）を含む PBS で封入し、マニキュアで密閉した。ガラスボトムディッシュ（MATSUNAMI）の免疫細胞染色の場合、終濃度 50% グリセロールを含む PBS を加えて封入した。免疫細胞染色の試料は、蛍光顕微鏡（Axio plan 2, Carl Zeiss）あるいは全反射顕微鏡（Olympus）で観察した。

免疫細胞染色に用いた抗体の抗体名、免疫動物、メーカー、希釈条件を以下の表 4 と表 5 に示す。

表 4. 一次抗体

抗体名	免疫動物と種類	メーカー	希釈倍率
anti-shootin1	rabbit, polyclonal	研究室にて作製	×5000
anti-phosphorylated shootin1(S101,S249)	rabbit, polyclonal	研究室にて作製	×1000
anti-myc-tag	mouse, monoclonal	MBL	×1000
anti-myc-tag	rabbit, polyclonal	MBL	×1000
anti-L1	goat, polyclonal	Santacruz	×500

表 5. 二次抗体

抗体名	メーカー	希釈倍率
Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG	Invitrogen	×1000
Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG	Invitrogen	×1000
Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG	Invitrogen	×1000
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG	Invitrogen	×1000
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG	Invitrogen	×1000
Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG	Invitrogen	×1000
Alexa Fluor 350 phalloidin	Invitrogen	×50

## 12. 軸索の長さおよび蛍光輝度の測定

定量ソフト ImageJ (NIH) で解析を行い、軸索の長さ、細胞内での蛍光輝度、タンパク質の化学発光 (バンド) の輝度を測定し、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。以下の結果 4 に示す Saturation binding curve や見かけ上の解離定数 (Kd 値) は統計ソフトウェア Graph pad prism 6 を用いて算出した。

## 13. 蛍光スペックルの観察

蛍光スペックルの観察は、蛍光タンパク質 (EGFP、mRFP) を融合したタンパク質の遺伝子を導入し発現させた細胞を用いた。XTC 細胞の場合、蛍光スペックルの観察を行う前に細胞をガラスボトムディッシュに移し 70% L-15 medium (Gibco) で 37°C で培養した。神経細胞の場合、予めガラスボトムディッシュに培養しておき、蛍光スペックルの観察を開始する 1 時間以上前に medium を 2% B-27 supplement および 1 mM Glutamine を含む 70% L-15 medium (Gibco) に置換し 37°C で培養した。両方の細胞とも、37°C インキュベータ付き蛍光顕微鏡 (Axio Observer Z1 (Carl Zeiss)) 上に置き蛍光スペックルをタイムラプス観察した。蛍光イメージは露出 1-1.5 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算出した。

## 14. 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上を L1-Fc コーティングした後、ゲル上で神経細胞を培養した。観察を始める 1 時間以上前に medium を 2% B-27 supplement および 1 mM 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) を用いてタイムラプスの蛍光イメージを取得した (3 秒間隔で画像を取得した)。観察する際は成長円錐直下の蛍光ナノビーズをタイムラプス観察した。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、成長円錐直下で引っ張られたビーズの移動度と方向が分かり、予め調べたゲルの固さから MATLAB (MathWorks) の計算アルゴリズムを用いて成長円錐で発生する力と力の方向を算出した。

## 15. PDMS を用いた Guidance assay 用デバイスの作製と Guidance assay

### 15-1. PDMS を用いた Guidance assay 用デバイスの作製（東京大学大学院工学系研究科の渡辺力也先生にご協力頂いた）

マイクロパターンニングされたプレートへ液体の PDMS（Polydimethylsiloxane, SILPOT 東レ・ダウコーニング）を流し込み、120 分 90°C で PDMS を固めた。固まった PDMS の表面にマイクロパターンニングされた型を作成することができる。その後、溶液を流すための流路として用いるチューブが通過するための穴を PDMS にあける。この PDMS と細胞を培養するためのガラスを液体の PDMS により 120 分 90°C で接着させ、ガラスを L1-Fc コーティングした。デバイスには両サイドから別々の溶液を流すための流路（チューブ）があり、両サイドから別々の種類の溶液を流すことができるため、濃度勾配を形成することができる。流路（チューブ）に溶液を流すために、流路にシリンジを取りつけシリンジを専用のシリンジポンプ（マイクロシリンジポンプエコノミー MSPE-3（アズワン））にセットし一定の速さで溶液を流した。

### 15-2. Guidance assay（Netrin-1 の濃度勾配による軸索の化学走性の評価）

上記に示した方法で作成したデバイスに神経細胞を培養した。培養を始めてから約 36-48 時間間に guidance assay を行った。観察を行う 1 時間以上前に medium を 2% B-27 supplement および 1 mM Glutamine を含む L-15 medium に置換し 37°C で培養した。Guidance assay では、片側の流路から、Netrin-1（300 ng / mL）と蛍光色素（Fluorescein / rhodamine 6 G）を含む L-15 medium（終濃度：2% B-27 supplement, 1 mM Glutamine）を流し、同時に、もう片側の流路から L-15 medium（終濃度：2% B-27 supplement, 1 mM Glutamine）のみを流す。これにより Netrin-1 の濃度勾配が形成される。7h の間 Netrin-1 の濃度勾配下で神経細胞の軸索の伸長をタイムラプス観察した。

## 16. 有意差検定

Unpaired Student *t* tests を用いて有意差の検定を行った。多群比較では 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 >

クラッチメカニズムにおける Shootin1 と L1 の相互作用についての不明な点 (図 3、不明な点 1、2、3、4) について調べた。以下に不明な点を挙げる。

不明な点 1 :

Shootin1 と L1 が直接結合するのがあるいは他の未知の分子を介して間接的に結合するのか？

不明な点 2 :

Shootin1 と L1 の相互作用がどのように制御されるか？

不明な点 3 :

Shootin1 と L1 の相互作用が軸索伸長のための推進力の発生に関与するか？

不明な点 4 :

Netrin-1 の刺激方向へ成長円錐をターニングさせるための軸索ガイダンスに Shootin1 と L1 の相互作用およびクラッチメカニズムが関与するか？

### **Shootin1-WT (野生型 Shootin1) は L1-ICD (L1 intracellular domain (L1 細胞内領域)) と相互作用する**

本研究室において、ラット脳のライセート (破碎液) を用いた免疫共沈降実験により内在性の Shootin1 と L1 が相互作用することが示された (Shimada et al., 2008)。しかし、培養細胞に発現した Shootin1 と L1-ICD の相互作用は検出できていなかった。そこで、通常の 5 倍量 (10cm ディッシュ 5 枚分) の培養細胞 (HEK293T 細胞) を用意して免疫共沈降実験を行った。Flag-L1-ICD と Myc-shootin1-WT を共発現させた HEK293T 細胞のセルライセートを用いて  $\alpha$ -flag 抗体を用いて Flag-L1-ICD を沈降させ、Myc-shootin1-WT を検出するためにウエスタンブロッティングを行った。ネガティブコントロールとして、Myc-shootin1-WT のみを発現させた HEK293T 細胞のセルライセートを用いて免疫共沈降を行った。その結果、Flag-L1-ICD と共に沈降した Myc-shootin1-WT が検出された。(図 4)。この結果から、HEK293T 細胞に発現させた Shootin1-WT と L1-ICD が相互作用することが示唆された。

### **Shootin1-WT は L1-ICD と直接結合する**

Shootin1 が L1 と直接結合するか、あるいは他の未知の分子を介して間

接的に相互作用するかという点は不明である（図 3、不明な点 1）。そこで、これを調べるために、精製した Shootin1-WT および精製した GST-L1-ICD（GST 融合 L1-ICD）のタンパク質をそれぞれ準備し、精製タンパク質同士による *in vitro* binding assay を行った。Glutathione sepharose 4B（GST に特異的に結合するビーズ）により GST-L1-ICD を沈降させ、Shootin1-WT を検出するためにウエスタンブロッティングを行った。ネガティブコントロールとして、GST タンパク質と Shootin1-WT との *in vitro* binding assay を行った。その結果、GST-L1-ICD と共に沈降した Shootin1-WT がウエスタンブロッティングにより検出された（図 5A）。また、100 nM の Shootin1 と 100 nM の GST-L1-ICD を Total 10 mL になるように Reaction buffer へ加えて混和し、一晩反応させた後、Glutathione sepharose 4B を加えて GST-L1-ICD を沈降させた。遠心後、上清を除去し、15 mM 還元型 Glutathione を含む TED buffer（pH 8.0）を 10mL 加えて GST 融合タンパク質を溶出した。遠心式濃縮カラム（Amicon-ultra4）を用いて溶出液を 20-25  $\mu$ L まで濃縮し、SDS-PAGE を行い目的のバンドを検出するために CBB 染色を行った。その結果、GST-L1-ICD と共に沈降した Shootin1-WT が CBB 染色により検出された（図 5B）これらの結果から、Shootin1-WT は L1-ICD と直接結合することが示唆された。

#### 成長円錐先端の膜近傍領域において Shootin1 は L1 と共局在する

神経細胞の成長円錐における内在性の Shootin1 と L1 との局在を観察するために、胎生期 18 日（E18）のラット海馬神経細胞を培養し、 $\alpha$ -Shootin1 抗体と  $\alpha$ -L1 抗体を用いて免疫染色を行い、全反射顕微鏡（Olympus）を用いて成長円錐を観察した。全反射顕微鏡を用いることにより、ガラス表面から 100 nm 程度の限定された領域に励起光をあてることのできるため、ガラス面に接着する細胞膜近傍領域のみの分子の局在を観察することができる。観察した結果、成長円錐先端の膜近傍領域において Shootin1 は局在し L1 と共局在することが解った（図 6 および写真下の白枠拡大図の矢頭）。

ここまでの結果から、神経細胞の成長円錐において Shootin1 は L1 と直接結合することが考えられる。

#### *In vitro* および培養細胞において、Shootin1-WT に比べて擬似リン酸化型 Shootin1（Shootin1-DD）は強く L1-ICD に結合する

本研究室において、リン酸化酵素 Pak1 を介して Shootin1 の 101 番目

および 249 番目のセリン (S) がリン酸化されることや、Shootin1 のリン酸化により軸索伸長のための推進力が促進されることが示された (Toriyama et al., 2013)。そこで、Shootin1 と L1 の相互作用がどのように制御されるか(図 3、不明な点 2)を調べるために、Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1 の結合が制御される可能性を考えた。これを検証するために、101 番目および 249 番目のセリン (S) をアスパラギン酸 (D) に置換した Shootin1 (擬似リン酸化型 Shootin1(Shootin1-DD)) と L1-ICD との精製タンパク質同士の結合を調べた。Shootin1 の濃度を 10, 25, 50, 100, 200 nM と用意し、各濃度で、Shootin1-WT (野生型の Shootin1) または Shootin1DD と GST-L1-ICD との *in vitro* binding assay を行った (図 7A)。各濃度において L1-ICD と結合した Shootin1 のバンドの輝度を、L1-ICD に結合した Shootin1 の量として算出した。各濃度 (x 軸) に対して結合した Shootin1 の量 (y 軸) をプロットし Saturation binding curve を描き、見かけ上の解離定数 (Kd 値) を算出した (図 7B)。その結果、Shootin1-DD の Kd 値は  $46.4 \pm 4.4$  nM、Shootin1-WT の Kd 値は  $133.5 \pm 13.6$  nM であり、Shootin1-WT の Kd 値に比べて Shootin1-DD の Kd 値の方が約 2.9 倍低いことが解った (図 7B、 $p < 0.02$ 、 $n = 6$ )。この結果から、L1-ICD に対する結合の親和性は Shootin1-WT に比べて Shootin1-DD が高いと考えられる。

また、Myc-shootin1-WT または Myc-shootin1-DD と Flag-L1-ICD を共発現させた HEK293T 細胞を用いて免疫共沈降実験を行った (図 8)。さらに、Pak1 によりリン酸化されない Myc-shootin1-AA (S101 および S249 をアラニン(A)に置換した変異体) と L1-ICD との免疫共沈降実験も行った (図 8)。その結果、L1-ICD と共沈降してきた量は、Shootin1-WT に比べて Shootin1-DD では増加し、Shootin1-AA はほとんど検出されないことが解った (図 8A の赤枠および図 8B の定量結果、 $p < 0.05$ )。これらの結果から、Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1-ICD の結合が促進されることが示唆された。

Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1-ICD の結合が促進されるのかをさらに検証するために、以下の結果に示す実験を行った。

### ***In vitro* および培養細胞において、Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1-ICD の結合は促進される**

*in vitro* kinase reaction を行い、Pak1 により精製 Shootin1-WT をリン酸

化させた。その後、精製 GST-L1-ICD との *in vitro* binding assay を行った。Shootin1 のリン酸化の有無は Shootin1 のリン酸化抗体を用いて調べた (図 9A の P-shootin1)。その結果、リン酸化されていない場合 (図 9 の -Pak1) に比べて、リン酸化された場合 (図 9A の +Pak1) では、L1-ICD に結合する Shootin1 の量が増加することが解った (図 9A の赤枠および図 9B の定量結果、 $p < 0.05$ )。また、Myc-shootin1 と Flag-L1-ICD に加えて、恒常活性型の Pak1 (Pak1-CA) または、ドミナントネガティブ型の Pak1 (Pak1-DN) を共発現させた HEK293T 細胞を用いて免疫共沈降実験を行った (図 10)。また、Shootin1 のリン酸化抗体を用いて Shootin1 のリン酸化を調べた (図 10A の P-shootin1 で示される)。その結果、恒常活性型の Pak1 (Pak1-CA) を発現させた場合では、Pak1 を発現させてない場合に比べてリン酸化された Shootin1 の量は増え (図 10A の P-shootin1 の Pak1 mutant-CA のレーン)、また、L1-ICD に共沈降してきた Shootin1 の量が増加することが解った (図 10A の赤枠の Pak1 mutant-CA のレーン、図 10B の定量結果、 $p < 0.05$ )。ドミナントネガティブ型の Pak1 (Pak1-DN) を発現させた場合では、恒常活性型の Pak1 (Pak1-CA) を発現させた場合に比べてリン酸化された Shootin1 の量は減り (図 10 の P-shootin1 の Pak1 mutant-DN のレーン)、また、L1-ICD に共沈降してきた Shootin1 の量が減少することが解った (図 10A の赤枠の Pak1 mutant-DN のレーン)。

これらの結果から、Pak1 による Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1-ICD の結合が促進されることが示唆された。

### 神経細胞において、Netrin-1 刺激による Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1 の結合は促進される

神経細胞において Netrin-1 の刺激により Rac1 および Cdc42 が活性化し Pak1 が活性化されることが報告されている (Shekarabi et al., 2005)。また、これまでの結果に示された、*in vitro* binding assay と HEK293T 細胞を用いた免疫共沈降実験の結果から Pak1 による Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1 の結合が促進されることが示唆された。そこで、神経細胞において、Netrin-1 刺激による Shootin1 のリン酸化により内在性の Shootin1 と L1 の結合が促進されるかを調べた。Netrin-1 (300 ng/mL, 1h) 刺激後の神経細胞を用いて Shootin1 のリン酸化を調べ (図 11A と図 11C の定量結果)、同時に免疫共沈降実験を行った (図 11B と図 11D)。Netrin-1 のコントロールとして BSA を用いた。その結果、BSA 刺激した場合に比べて Netrin-1 刺激した場合は、リン酸化された Shootin1 の量は増加した (図 11A と図 11C の定量結果、 $p < 0.05$ )。それに伴い、BSA



刺激の場合に比べて Netrin-1 刺激の場合では、Shootin1 に沈降してきた L1 の量も増加することが解った (図 11B の赤枠、図 11D の定量結果、 $p < 0.05$ )。また、内在性のリン酸化 Shootin1 と L1 の局在を観察するために免疫細胞染色を行い、全反射顕微鏡を用いて成長円錐を観察した (図 12)。結果の図 6 と同様に、成長円錐先端の膜近傍領域において、リン酸化 Shootin1 と L1 が共局在することが解った (図 12 および写真下の白枠拡大図の矢頭)。

ここまでの結果から、神経細胞において Netrin-1 による Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1 の結合が促進されることが示唆された。

### Shootin1 の N 末端側 1-125 アミノ酸領域は Shootin1 と L1-ICD の相互作用を阻害する

以下の結果では、Shootin1 と L1 の相互作用が軸索伸長のための推進力の発生や、軸索の化学走性に関与するか (図 3、不明な点 3 と 4) を調べるために、Shootin1 と L1 の相互作用を阻害した際の実験の結果を示す。まず、Shootin1 と L1 の相互作用を阻害する Shootin1 の変異体を作製するために、L1-ICD が結合する Shootin1 の領域を調べた。Myc タグの付いた Shootin1 の欠失変異体である Myc-shootin1 (1-125 a.a.)、Myc-shootin1 (125-260 a.a.)、Myc-shootin1 (217-456 a.a.)、Myc-shootin1 (261-377 a.a.) の精製タンパク質を作製し、それぞれの精製タンパク質と GST-L1-ICD との *in vitro* binding assay を行った。ポジティブコントロールとして Myc-shootin1-DD と GST-L1-ICD との *in vitro* binding assay を行った (図 13)。その結果、Shootin1 (1-125 a.a.) が L1-ICD に結合することが解った (図 13A の赤枠)。また、先行研究において、Cortactin が結合する Shootin1 領域は 261-377 アミノ酸領域であることが示された (Kubo et al., 2015) (図 13B の Cortactin の結合レーン)。すなわち、Shootin1 の N 末端側 1-125 アミノ酸領域は L1 に結合するが Cortactin とは結合しないことが示唆された (図 13B)。

次に、Shootin1 (1-125 a.a.) がトレッドミリングするアクチン線維と相互作用するかを調べた (補足図 1)。mRFP-actin と EGFP-shootin1 (1-125 a.a.) を共発現させた XTC 細胞を用いて蛍光スペckルを観察した (補足図 1B)。ポジティブコントロールとして、mRFP-actin と EGFP-shootin1 を共発現させた XTC 細胞を用いた (補足図 1A)。その結果、mRFP-actin および EGFP-shootin1 のスペckルは共にアクチン線維の逆行性移動に

沿って動くことが解った(補足図 1A 右図のキモグラフの写真)。しかし、EGFP- shootin1 (1-125 a.a.) のスペックルは観察されなかった(補足図 1B 右図のキモグラフの写真)。この結果から、Shootin1 (1-125 a.a.) はトレッドミリングするアクチン線維と相互作用しない可能性が示唆された。

次に、Shootin1 (1-125 a.a.) が Shootin1 と L1 の相互作用を阻害するかを調べた。そこで、Myc-shootin1-DD と Flag-L1-ICD の発現に加えて、Myc-shootin1 (1-125 a.a.) を過剰発現(過剰発現ベクター-pCAGGS)させた HEK293T 細胞を用いて免疫共沈降実験を行った(図 14)。その結果、Myc-shootin1 (1-125 a.a.) を過剰発現させてない場合に比べて、Myc-shootin1 (1-125 a.a.) を過剰発現させた場合では、Flag-L1-ICD と共沈降する Myc-shootin1-DD の量が減少した(図 14A の赤枠、図 14B の定量結果、 $p < 0.05$ )。それに伴って、L1-ICD と相互作用する Myc-shootin1 (1-125 a.a.) が検出された(図 14A の青枠)。また、Myc-shootin1 (1-125 a.a.) を遺伝子導入した神経細胞を免疫染色し、成長円錐における Myc-shootin1 (1-125 a.a.) と L1 との局在を全反射顕微鏡を用いて観察した(図 15)。その結果、成長円錐先端の膜近傍領域において Myc-shootin1 (1-125 a.a.) と L1 が共局在することが分かった(図 15 および写真下の白枠拡大図の矢頭)。これらの結果より、成長円錐において Shootin1 (1-125 a.a.) は Shootin1 と L1-ICD の相互作用を阻害すると考えられる。そこで、Shootin1 (1-125 a.a.) を用いて以下の実験を行った。

### **Shootin1 と L1 の相互作用は Shootin1 のリン酸化によるアクチン線維と細胞接着分子の連結の促進に関与する**

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が連結されると、成長円錐先端においてトレッドミリングする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(Lowery and Van Vactor, 2009)。そこで、Shootin1 (1-125 a.a.) により Shootin1 と L1 の相互作用を阻害すると、アクチン線維と細胞接着分子 L1 の連結が切れて、トレッドミリングするアクチン線維の移動速度が速くなると考えた。これを検証するために、Myc-shootin1 (1-125 a.a.) (過剰発現ベクター-pCAGGS) と mRFP-actin を共発現させた神経細胞を L1-Fc コーティングしたガラスボトムディッシュ上で培養し培養 2 日目に成長円錐における蛍光スペックルを観察した(図 16A)。コントロールとして myc-GST (過剰発現ベクター-pCAGGS) と mRFP-actin を共発現させた神経細胞を用いて蛍光スペックルを観察した。その結果、コントロールの細胞では、 $4.5 \pm 0.08 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n=30$ )、一方、Shootin1 (1-125 a.a.) を過剰発現させた細胞では、5.7

±0.20  $\mu\text{m}/\text{min}$  (n=30) となり、コントロールの細胞に比べてアクチン線維の移動速度が速くなった ( $p < 0.01$ , 図 16B)。また、Netrin-1 刺激 (300 ng/mL, 1h) すると、コントロールの細胞では、 $3.23 \pm 0.20 \mu\text{m}/\text{min}$  (n=30) となり、Netrin-1 刺激前のコントロールの細胞に比べてアクチン線維の移動速度が遅くなった ( $p < 0.05$ , 図 16B)。Netrin-1 刺激後にアクチン線維の移動速度が遅くなるのは、Netrin-1 による Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1 の相互作用 (連結) が増強されたからだと考えられる。また、この結果は先行研究の結果と一致する (Toriyama et al., 2013; Kubo et al., 2015)。一方、Netrin-1 刺激すると Shootin1 (1-125 a.a.) を過剰発現させた細胞では、 $7.3 \pm 0.29 \mu\text{m}/\text{min}$  (n=30) となり、コントロールの細胞に比べてアクチン線維の移動速度が速くなった ( $p < 0.01$ , 図 16B)。Shootin1 (1-125 a.a.) の過剰発現によりアクチン線維の移動速度が速くなったのは、Shootin1 (1-125 a.a.) により Netrin-1 誘導性のアクチン線維と細胞接着分子の連結の促進が阻害されたからだと考えられる。すなわち、Shootin1 と L1 の相互作用は Shootin1 のリン酸化によるアクチン線維と L1 との連結の促進に関与することが示唆された。

### Shootin1 と L1 の相互作用は Netrin-1 による軸索伸長のための推進力の促進に関与する

軸索が伸長するためには成長円錐が力 (推進力) を生み出す必要がある。そこで成長円錐で発生する力を調べるために Traction force microscopy (Chan and Odde, 2008) を行った。この実験系では、蛍光ナノビーズ (直径 200 nm) を埋め込んだ弾性のあるゲル上で神経細胞を培養し、成長円錐で発生する力によりゲルが歪む。それにより動くビーズを顕微鏡下でモニターし、ゲルの弾性とビーズの移動度から成長円錐直下で発生する力の強さを算出する (Toriyama et al., 2013; Kubo et al., 2015)。Shootin1 と L1 の相互作用が軸索伸長のための推進力の発生に関与するか (図 3、不明な点 3) を調べるために、上記に示した Traction force microscopy を行った。L1-Fc コーティングしたゲル上に、myc-shootin1 (1-125) を過剰発現させた神経細胞を培養し、培養 2 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 17A)。ビーズの初期位置 (図 17A 緑の丸) と移動したビーズの位置 (図 17A 赤の丸) からビーズの移動度を測定し、ゲルの弾性力とビーズの移動度から力の強さを算出した (図 17B)。また、Netrin-1 刺激 (300 ng/mL, 1h) した際の力の強さを算出した。コントロールとして myc-GST を過剰発現させ、Live-imaging のために myc-GST (または myc-shootin1 (1-125)) と共に EGFP を共発現させた

神経細胞を用いた(図 17A の青色)。コントロールの細胞において、Netrin-1 刺激前の力の強さは  $2.07 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$  ( $n = 5$  growth cones) となり、Netrin-1 刺激後の力の強さは  $5.26 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$  ( $n = 5$  growth cones) となり、Netrin-1 刺激前に比べて力の強さが上昇した(図 17B)。Netrin-1 刺激後に力の強さが上昇するのは Netrin-1 による Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1 の連結が増強されたからだと考えられる。また、この結果は先行研究の結果と一致する(Toriyama et al., 2013 ; Kubo et al., 2015)。一方、Shootin1 (1-125) を過剰発現させた細胞において、Netrin-1 刺激前の力の強さは  $1.08 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$  ( $n = 7$  growth cones) となり、Netrin-1 刺激前のコントロールの細胞に比べて力の強さが減少した(図 17B)。Netrin-1 刺激後の力の強さは  $1.45 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$  ( $n = 7$  growth cones) となり、Shootin1 (1-125) を過剰発現させた細胞では、Netrin-1 刺激前後の力の強さにほとんど変化がなかった。Shootin1 (1-125) の過剰発現による Shootin1 と L1 の相互作用の阻害により、Netrin-1 による軸索伸長のための推進力の促進が阻害された(図 17B)。これらの結果から、Shootin1 と L1 の相互作用は Netrin-1 による軸索伸長のための推進力の促進に関与することが示唆された。

### Shootin1 と L1 の相互作用は Netrin-1 による軸索伸長の促進に関与する

次に、Netrin-1 刺激した際の myc-shootin1 (1-125) を過剰発現させた神経細胞の軸索の長さを計測した(図 18A)。コントロールとして myc-GST を過剰発現させた神経細胞を用いた。L1-Fc コーティングしたカバースリップに神経細胞を播種し、3h 後に Netrin-1 (300 ng/mL) を加えて(コントロールとして BSA を加えて)、培養 2 日目に軸索の長さを計測した(図 18B)。Netrin-1 のコントロールとして BSA を加えて軸索の長さを計測した。その結果、BSA を加えて培養した神経細胞の軸索の長さは、コントロールの細胞において、 $132.9 \pm 3.5 \mu\text{m}$  ( $n = 217$  cells) であり、Shootin1 (1-125) を過剰発現させた細胞において、 $70.4 \pm 0.4 \mu\text{m}$  ( $n = 262$  cells) となった。コントロールの細胞に比べて、Shootin1 (1-125) を過剰発現させた細胞の軸索の長さが短くなった ( $p < 0.01$ , 図 18B)。また、Netrin-1 を加えて培養した神経細胞の軸索の長さは、コントロールの細胞において、 $188.6 \pm 4.3 \mu\text{m}$  ( $n = 181$  cells) であり、Shootin1 (1-125) を過剰発現させた細胞において、 $74.4 \pm 2.7 \mu\text{m}$  ( $n = 249$  cells) となった。コントロールの細胞に比べて、Shootin1 (1-125) を過剰発現させた細胞の軸索の長さが短くなった ( $p < 0.01$ , 図 18B)。また、Netrin-1 による軸索伸長の促進を解析するために、コントロールの細胞および Shootin1(1-125)

を過剰発現させた細胞において、Netrin-1 を加えて培養した細胞の軸索の長さから、BSA を加えて培養した細胞の軸索の長さを差し引いた。その結果、コントロールの細胞において Netrin-1 刺激による軸索伸長は  $55.7 \pm 1.41 \mu\text{m}$  であり、Shootin1(1-125)を過剰発現させた細胞において Netrin-1 刺激による軸索伸長は  $4.0 \pm 3.00 \mu\text{m}$  となった。Shootin1 (1-125) の過剰発現による Shootin1 と L1 の相互作用の阻害により Netrin-1 による軸索伸長の促進が阻害された ( $p < 0.01$ , 図 18C)。以上の結果より、Shootin1 と L1 の相互作用は Netrin-1 による軸索伸長の促進に関与することが示唆された。

ここまでの結果から、Netrin-1 による Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1 の相互作用が促進され、軸索伸長のための推進力が上昇し、軸索伸長が促進されることが示唆された。

### **Netrin-1 刺激を受容した成長円錐内領域で非対称に Shootin1 がリン酸化される**

先行研究において、神経細胞の成長円錐は軸索の化学走性因子 Netrin-1 を感知しその方向に向かって前進することが報告されている。(Hong et al., 1999)。また、これまでの本研究結果により、Netrin-1 による Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1 の相互作用が促進され、軸索伸長のための推進力が促進されることが示唆された。しかしながら、Shootin1 と L1 の相互作用が Netrin-1 による軸索の化学走性(軸索ガイダンス)に関与するかは不明である(図 3、不明な点 4)。これを検証するために、Netrin-1 の濃度勾配下における軸索伸長方向の解析を計画した。

はじめに、Netrin-1 の濃度勾配を形成するために PDMS (Polydimethylsiloxane) を用いてマイクロ流体デバイス (Bhattachajee, N et al., 2010) (図 19A) を作製した。マイクロ流体デバイスにおいて、片側の流路から、Netrin-1 (300 ng / mL) と蛍光色素トレーサー (Fluorescein (緑) あるいは rhodamine 6G (赤)) を含む medium を流し、同時に、もう片側の流路から medium のみを流した。これにより中央の Cell culture area (図 19A) で Netrin-1 と蛍光色素トレーサーを含む medium の濃度勾配が形成された(図 19B および C)。

次に、Netrin-1 の濃度勾配に応答した Shootin1 のリン酸化を調べた(図 20)。デバイス内に神経細胞を培養し、生細胞の細胞質全体を染めるポリュームマーカ―として CMAC を使用し、Netrin-1 の濃度勾配下にある成

長円錐をタイムラプス観察した（図 20 のタイムラプス観察の写真）。その後、Shootin1 のリン酸化抗体を用いて免疫細胞染色を行った（図 20 の免疫染色写真）。その結果、Netrin-1 の濃度勾配の高い側に位置する成長円錐の領域（図 20B の成長円錐の右側の領域、High side）でリン酸化された Shootin1 が観察された（図 20B）。Netrin-1 濃度が高い側の成長円錐の領域（図 20B の High side）と Netrin-1 濃度が低い側の成長円錐の領域（図 20B の Low side）の P-shootin1/CMAC の蛍光輝度の割合を算出した。その結果、Netrin-1 濃度が高い側の成長円錐の領域（High side）でリン酸化 Shootin1 の量が多いことが解った（ $p < 0.05$ 、図 20C）。この結果から、Netrin-1 の濃度勾配を受容した成長円錐内の領域で非対称に Shootin1 がリン酸化を受けることが解った。

### Shootin1 と L1 の相互作用は Netrin-1 による軸索ガイダンスに関与する

そして、Shootin1 と L1 の相互作用が Netrin-1 による軸索ガイダンスに関与するか（図 3、不明な点 4）を調べた。EGFP-shootin1 (1-125) を過剰発現させた神経細胞をデバイス内に培養し 7 時間 (420 分) の間 Netrin-1 の濃度勾配下で神経細胞の軸索の伸長をタイムラプス観察した（図 21A）。その後、Netrin-1 の濃度勾配に対して傾いた軸索の角度（Turning angle）を算出した（角度の算出の方法は図 21B の説明参照）。コントロールとして EGFP を過剰発現させた神経細胞を用いた（図 21A）。その結果、コントロールの細胞において、Netrin-1 の濃度勾配に対して傾いた軸索の角度（turning angle）は  $28.8^\circ \pm 3.82$  ( $n=17$  cells) となった。一方、EGFP-shootin1 (1-125) を過剰発現させた細胞において、Netrin-1 の濃度勾配に対して傾いた軸索の角度 (turning angle) は  $0.6^\circ \pm 1.07$  ( $n=16$  cells) となり、コントロールの細胞に比べて Netrin-1 の濃度勾配に対して傾いた軸索の角度に有意な差が認められた（ $p < 0.01$ 、図 21C）。また、Netrin-1 の濃度勾配が形成し初めてから（0 分から）7 時間の間に Netrin-1 の濃度勾配に沿って曲がる軸索伸長の方向を調べた（図 22A と B）。コントロールの細胞（EGFP 過剰発現細胞）と EGFP-shootin1 (1-125) を過剰発現させた細胞の軸索伸長の軌道を x 軸、y 軸座標に描いた（図 22A と B）。その結果、コントロールの細胞の方では、時間経過とともに Netrin-1 の濃度勾配に沿って Netrin-1 濃度の高い側に軸索を伸ばしていく様子が解った（図 22A）。一方、EGFP-shootin1 (1-125) を過剰発現させた細胞では、Netrin-1 の濃度勾配に沿って軸索は伸びずに、ランダムに軸索が伸びる様子が解った（図 22B）。さらには、Netrin-1 濃度勾配下における軸索伸長の速度を調べた（図 22C）。その結果、コントロールの細胞の方では、

軸索伸長の速度が  $32.4 \pm 6.6 \mu\text{m/h}$  ( $n=17$  cells) となった。EGFP-shootin1 (1-125) を過剰発現させた細胞の方では  $13.8 \pm 3.4 \mu\text{m/h}$  ( $n=16$  cells) となり、コントロールの細胞に比べて軸索伸長の速度が減少した(図 22C、 $p<0.05$ )。これまでの結果(図 18C)と同様に、Shootin1 (1-125) を過剰発現させた細胞では Netrin-1 依存的な軸索伸長が抑えられることが解った。以上のことから、Shootin1 と L1 の相互作用の阻害により Netrin-1 による軸索伸長の誘引(Netrin-1 による軸索の化学走性)および Netrin-1 による軸索伸長の促進が阻害されることが解った。以上の結果より、Shootin1 と L1 の相互作用が Netrin-1 による軸索の化学走性に関与することが示唆された。

マイクロ流体デバイスを用いた Guidance assay の結果をまとめると、Netrin-1 の刺激を受容した成長円錐内領域で非対称に Shootin1 がリン酸化されること(図 20)や、Shootin1 と L1 の相互作用の阻害により、Netrin-1 による軸索伸長の誘引が阻害されることが解った(図 21、図 22)。また、本研究結果から、Netrin-1 による Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1-ICD の相互作用が促進され、軸索伸長のための推進力が促進されることが示唆された。これらのことを踏まえると、Shootin1 と L1 の結合は Netrin-1 による軸索誘引(軸索の化学走性)のための非対称な推進力の促進に重要であることが示唆された。

## < 考察 >

本研究において、Shootin1 と L1 の相互作用についての不明な点(図 3、不明な点 1、2、3、4) に注目し、両者の相互作用が化学的なシグナル伝達を機械的な力に変換するかを調べたところ、Shootin1 と L1-ICD は直接結合し、Netrin-1 による Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1-ICD の結合が増強され、それにより軸索伸長のための推進力が上昇し、軸索が伸長することが示唆された。また、Shootin1 と L1-ICD の結合は Netrin-1 の刺激による軸索誘引(軸索化学走性)のための非対称な推進力の促進に重要であることが示唆された。これらのことから考えられるモデルを図 23 にまとめた。このモデルでは、Netrin-1 の刺激による非対称な Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1-ICD の結合が増強し、非対称に推進力が促進され、その結果として、Netrin-1 の刺激方向に成長円錐がターニングし軸索が誘引されるということを考えている(図 23)。すなわち、Shootin1 と L1-ICD の結合は Netrin-1 による Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化シグナルを軸索の化学走性のための推進力に変換するインターフェイスとして機能する可能性が考えられる。クラッチメカニズムが Netrin-1 による成長円錐のターニングおよび軸索の化学走性に関与する可能性が見出された。

### クラッチメカニズムは化学的なシグナル伝達を機械的な力の発生に効率良く変換する

これまで、神経細胞の軸索伸長にクラッチメカニズムが関与することが報告されていたが(Chan and Odde, 2008)、細胞外の環境から受容した化学的な走性因子のシグナルをどのように機械的な力の発生に変換するのか、その分子機構は不明であった。本研究において、軸索の化学走性因子 Netrin-1 によりリン酸化酵素 Pak1 が活性化され、活性化された Pak1 が Shootin1 をリン酸化することが示された(Toriyama et al., 2013)。また、この Shootin1 のリン酸化によりアクチン線維と細胞接着分子の連結が強化され、成長円錐で発生する推進力が上昇し軸索伸長が促進されることが示された(Toriyama et al., 2013)。しかしながら、Netrin-1 の化学的なシグナルがどのように軸索伸長の推進力を促進するのかは不明である。そこで、本研究において、Shootin1 と L1 の相互作用が Netrin-1 による化学的なシグナル伝達を軸索伸長のための推進力(機械的な力)に変換するかを調べるところ、Shootin1 と L1 の結合は Netrin-1 による Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化シグナルを軸索の化学走性のための推進力



に変換するインターフェイスとして機能する可能性が示唆された。さらに、本研究室における先行研究により、Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と Cortactin の結合が増強され、軸索伸長のための推進力が促進されることが示唆された (Kubo et al., 2015)。これらのことから、Netrin-1 による Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により、Shootin1 と L1 の結合および Shootin1 と Cortactin の結合が 2 ヶ所同時に促進されることが解った (図 24)。この Shootin1 のリン酸化による Shootin1 と L1 および Shootin1 と Cortactin の 2 ヶ所同時の結合の促進により、アクチン線維の移動の力が細胞接着分子 L1 に効率良く伝わり、軸索伸長のための推進力が促進されることが考えられる。すなわち、Cortactin、Shootin1、L1 の三者複合体から構成されるクラッチメカニズムは細胞外からの化学的なシグナル伝達を機械的な力の発生に効率良く変換する可能性が考えられる (図 24)。

### **Cortactin、Shootin1、L1 から成る三者複合体の構造学的研究の展望**

本研究結果および本研究室の先行研究結果から、Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により、Shootin1 と L1-ICD の結合および Shootin1 と Cortactin の結合が 2 ヶ所同時に促進されることが示唆された。このことから、Cortactin、Shootin1、L1 から成る三者複合体が軸索伸長のための推進力を促進する可能性が考えられる。今後は、Cortactin、Shootin1、L1-ICD から成る三者複合体の結合様式や、Shootin1 のリン酸化による構造変化、さらには、それに伴う三者複合体を構成する分子数の変化を構造学的に解析し、化学的なシグナル伝達を機械的な力の発生に変換する仕組みを原子レベルで理解する。最近、我々は、非変性状態でタンパク質複合体の質量を測定する質量分析法 (Native mass 測定) により、Shootin1-WT と L1-ICD から成る複合体に比べて Shootin1-DD と L1-ICD から成る複合体の方が、質量が大きいという結果を得ることができた (未発表データ)。この結果から Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1-ICD の複合体の分子数に変化があるということが示唆された。今後も Cortactin、Shootin1、L1-ICD から成る三者複合体の構造学的な解析を行っていく。Cortactin、Shootin1、L1-ICD から成る三者複合体の構造解析の推進により、将来その成果が三者複合体の形成を促進するような分子標的薬の設計に繋がり、脊髄損傷や脳卒中後などの損傷した神経軸索を再生する治療法の確立に貢献できる可能性がある。

## **Netrin-1 以外の軸索の化学走性因子による Shootin1 と L1 の相互作用の制御**

脳内において神経細胞の軸索ガイダンスは軸索の誘引および反発の作用のある複数の化学走性因子により制御されている。本研究において使用した軸索の化学的な走性因子である Netrin-1 は軸索を誘引する因子である (Serafini et al., 1994)。本研究の結果から、Netrin-1 の刺激により Pak1 を介して Shootin1 がリン酸化されることにより、Shootin1 と L1-ICD の結合が増強され、軸索伸長の推進力が促進されることが示唆された。他にも、軸索を誘引するための化学的な走性因子として、BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor\_脳由来神経栄養因子)、Shh (Sonic hedgehog) などがあり、Netrin-1 刺激と同様に、これら走性因子の刺激は軸索伸長を促進し軸索伸長の方向を誘引する (Ming et al., 2002 ; Charron et al., 2003)。そのため、これら走性因子の刺激により Shootin1 のリン酸化が促進され、Shootin1 と L1-ICD の結合が強まる可能性が考えられる。一方、軸索を反発するための化学的な走性因子としては Semaphorin、Slit、Draxin などがあり、これら走性因子の刺激により成長円錐の崩壊が引き起こされ、軸索伸長が抑制される (Luo et al., 1993 ; Brose and Tessier-Lavigne, 2000 ; Islam et al., 2009)。そのため、軸索を反発する走性因子の刺激により、脱リン酸化酵素を介して Shootin1 のリン酸化が抑えられ、Shootin1 と L1 の結合が弱まる可能性が考えられる。しかしながら、Netrin-1 以外の化学走性因子による Shootin1 と L1 の相互作用の制御機構や、リン酸化された Shootin1 を脱リン酸化する酵素は不明である。今後は、Netrin-1 以外の化学走性因子の刺激により、Shootin1 のリン酸化が制御されるか、または Shootin1 と L1 の相互作用が制御されるかという点を検証し、Shootin1 に対する脱リン酸化酵素を同定する。これにより、Netrin-1 以外の軸索の化学走性因子による Shootin1 と L1 の相互作用の制御機構を明らかにし、クラッチメカニズムが Netrin-1 以外の軸索の化学走性に関与するのかを調べる。また、神経回路の形成は複数の化学走性因子により制御されている。そのため、一つだけでなく複数の化学走性因子によるクラッチメカニズムの制御機構も明らかにしていく必要がある。これにより、脳における神経回路形成の仕組みの理解が進むことが期待される。

## **Shootin1 以外の分子による Shootin1 と L1 との相互作用の制御**

本研究において、Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1-ICD の相互作用が促進されるということが示された。また、本研究室において、Shootin1 はアクチン結合分子 Cortactin を介してアクチン線維と相互作用

することが示された (Kubo et al., 2015)。一方で、Shootin1 以外にも、L1-ICD と相互作用する分子の中にアクチン線維と相互作用する分子がある。それらの分子は、Ezrin と (Dickson et al., 2002)、Ankyrin B である (Graver et al., 1997)。Ezrin と Ankyrin B は L1-ICD のそれぞれ異なる領域に結合する。以下に、Ezrin と Ankyrin B のこれまで報告されている機能と L1-ICD との相互作用について記述する。

### **Ezrin**

Ezrin は Netrin-1 誘導性の軸索伸長の促進に関与するが (Antoine-Bertrand et al., 2011)、Ezrin の遺伝子発現を抑制してもコントロールの細胞に比べて軸索の長さが、ほとんど変化がないことも報告されている (Matsumoto et al., 2014)。Ezrin の N 末端側の領域で L1-ICD と相互作用し、C 末端側の領域でアクチン線維と結合する (Tunrunen et al., 1994)。また、L1-ICD の 1151 番目と 1176 番目のチロシン (Y) が Src キナーゼによりリン酸化され、その Y をアスパラギン酸 (D) に置換した L1-ICD では、Ezrin の N 末端側の領域と L1-ICD との相互作用が弱まるということが報告されている (Sakurai et al., 2008)。

### **Ankyrin B**

Ankyrin B は神経突起の伸長に抑制的に働くこと (Gil et al., 2003) や、Ankyrin B を欠失した神経細胞では野生型に比べて神経突起の長さが、ほとんど変化が認められないことが報告されている (Nishimura et al., 2003)。Ankyrin B は Ankyrin repeat と呼ばれる領域を介して L1-ICD と結合し、別のアミノ酸領域でアクチン結合分子 Spectrin を介してアクチン線維と相互作用する (Cunha and Mohler, 2009)。Ankyrin B が結合する L1-ICD のアミノ酸領域に FIGQY 配列がある。この配列は L1 と同じ免疫グロブリンスーパーファミリーに属する Neurofascin にも保存されており、Neurofascin の FIGQY のチロシン (Y) がリン酸化されると、Neurofascin の細胞内ドメインと Ankyrin B との結合が弱まる (Graver et al., 1997; Tuvia et al., 1997)。

以上のように、Shootin1 以外にも L1-ICD と相互作用しアクチン線維と相互作用する分子に Ezrin、Ankyrin B があり、Shootin1 と同様に Ezrin と Ankyrin B はクラッチ分子として働く可能性が考えられる。また、Ezrin および Ankyrin B と L1-ICD との相互作用は L1-ICD のリン酸化により制御される可能性がある。上記に示したように、Shootin1 と Ezrin は軸索伸長の促進に関与し、Ankyrin B は神経突起伸長の抑制に関与する。そのため、軸索伸長が促進される際には、Shootin1 と Ezrin が同時に L1-ICD に結合し Ankyrin B と L1-ICD との相互作用を阻害する可能性があり、軸索

伸長が抑制される際には、Ankyrin B が L1-ICD に結合し Shootin1 および Ezrin と L1-ICD との相互作用を阻害する可能性が考えられる。しかしながら、Ezrin および Ankyrin B と L1-ICD との結合や L1-ICD のリン酸化が、どのように Shootin1 と L1 の相互作用を制御し軸索伸長を促進するのか、あるいは軸索伸長を抑制するのかは不明である。今後は、Shootin1、Ezrin、Ankyrin B が L1-ICD と同じ領域に結合するのか、Shootin1 と L1-ICD の結合が L1-ICD のリン酸化により制御されるか、Shootin1 と L1-ICD の結合が Ezrin と Ankyrin B の結合により阻害されるかという点を検証していくことで、Shootin1、Ezrin、Ankyrin B と L1 の相互作用による軸索伸長制御の分子機構を明らかにすることができる。また、その研究成果が、これまでヒトやマウスで報告されている L1 の遺伝子欠失や遺伝子変異による軸索伸長および軸索ガイダンスの異常の原因を理解することに繋がる可能性がある。

## Netrin-1による軸索の化学走性におけるリン酸化 Shootin1の重要性の検討

本研究により、非対称な Netrin-1 の刺激により、Netrin-1 濃度が高い側の成長円錐内で非対称に Shootin1 がリン酸化されると Shootin1 と L1 の結合が増強され非対称に推進力が上昇する。その結果として成長円錐がターニングし、Netrin-1 の濃度勾配に沿って軸索が誘引されるというモデルが考えられる (図 23)。このことから、非対称な Shootin1 のリン酸化は Netrin-1 の刺激の方向に軸索が誘引されるための推進力を生み出すために重要であると考えられる。非対称な Shootin1 のリン酸化が Netrin-1 による軸索の化学走性において重要であるかどうかを検討する必要がある。そこで、Shootin1 遺伝子を欠失した神経細胞に擬似リン酸化型の Shootin1 変異体 (Pak1 によりリン酸化されるセリン(S)をアスパラギン酸(D)に置換した変異体) を遺伝子導入し、この神経細胞を用いて Guidance assay を行う。非対称に Netrin-1 刺激をしても成長円錐内ではすでに擬似リン酸化型の Shootin1 変異体があるため、軸索伸長のための推進力は促進されるが非対称な推進力は阻害され、その結果として、Netrin-1 による軸索誘引は阻害されると考えられる。このように予想する結果を得ることができれば、Netrin-1 による軸索の化学走性において非対称な Shootin1 のリン酸化が重要であることを証明できると考えられる。予想に反して、さきほどの Shootin1 変異体を発現させた神経細胞の軸索が Netrin-1 の方向に誘引されるという結果になった場合は、Netrin-1 による軸索の化学走性において非対称な Shootin1 のリン酸化はあまり重要でないことが考えられる。今後、軸索の化学走性において非対称な Shootin1 のリン酸化の重要性を検討する実験を行う必要がある。

本研究により、Netrin-1 による軸索の化学走性の分子機構の一端が明らかになった。Netrin-1 による軸索の化学走性において Shootin1 のリン酸化以外にも重要な因子や分子機構があると考えられる。先行研究において、Netrin-1 の刺激により Rac1 および Cdc42 が活性化し、アクチン重合が促進されることが報告されている (Pollard and Borisy, 2003 ; Lowery and Van Vactor, 2009)。この報告により、非対称な Netrin-1 の刺激により Netrin-1 濃度が高い側の成長円錐内では、非対称にアクチン重合が促進されトレッドミリングするアクチン線維の駆動力が上昇する。その結果として、非対称に上昇したアクチン線維の駆動力により非対称に推進力が生み出されるため、Netrin-1 刺激の方向に軸索が伸長すると考えられる。すなわち、Netrin-1 による軸索の化学走性において非対称に上昇したアクチン線維の駆動力は重要であると考えられる。また、Shootin1 以外

にもアクチン線維と相互作用する分子や細胞接着分子と相互作用する分子があるため、**Netrin-1** の刺激により上昇したアクチン線維の駆動力を利用して軸索伸長のための推進力を生み出す分子機構が他にもあると考えられる。そこで今後は、軸索の化学走性の分子機構の全容の理解を進めるために、**Shootin1** 以外で、アクチン線維と相互作用する分子や細胞接着分子と相互作用する分子が軸索の化学走性の分子機構に、どのように関与するかを明らかにする研究を行う必要がある。

## 総括

約 120 年以上前にスペインの神経科学者 Cajal (カハール) により、神経細胞の軸索先端にある成長円錐が発見され、Cajal は成長円錐が周囲の化学的な誘引因子を感知し、その方向に前進するための力を生み出すことで標的細胞へと軸索が伸長することを予想した。しかしながら、長年の間、軸索を誘引する化学的な因子が、どのようにして軸索伸長のための推進力を生み出すのかは不明であった。そして、約 30 年前に軸索伸長のための推進力を生み出すメカニズムとしてクラッチモデルが提唱された (Mitchison and Kirschner, 1988)。当時、クラッチ分子の実態は不明であった。本研究室において、Shootin1 がクラッチ分子として機能し軸索伸長のための力を生み出すのに重要であることが示された (Shimada et al., 2008)。その後、軸索の化学走性因子 Netrin-1 シグナルによる Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化が軸索伸長のための推進力を促進することが示された (Toriyama et al., 2013)。さらには、新規クラッチ分子としてアクチン結合タンパク質 Cortactin が同定され、Shootin1 と Cortactin の直接結合がトレッドミリングするアクチン線維の駆動力を細胞接着分子 L1 に伝えて軸索伸長のための推進力を生み出すことが示された (Kubo et al., 2015)。しかしながら、軸索伸長のための推進力を生み出すクラッチメカニズムの最後の決め手となる Shootin1 と L1 の結合や両者の結合を制御する分子機構は不明であった。そのため、クラッチメカニズムが化学走性に関与するかはよく解っていなかった。

本研究において、Shootin1 と L1 が直接結合することが示唆され、Shootin1 と L1 の結合は Netrin-1 による Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化シグナルを軸索の化学走性のための推進力に変換するインターフェイスとして機能する可能性が示唆された。これにより、クラッチメカニズムの最後の決め手となる部分を明らかにすることができ、クラッチメカニズムが軸索の化学走性に関与する可能性を見出すことができた。本研究の成果は、一世紀以上も前に Cajal により予想されていたが、これまで不明なままであった軸索の化学走性の分子基盤の全容を理解するためのブレイクスルーとなる極めて重要な知見になることが期待される。本研究では、クラッチメカニズムが化学走性に関与する可能性を見い出したが、今後は、化学走性だけでなく接触走性や力学的走性にクラッチメカニズムが関与する可能性を調べていけば、クラッチメカニズムの研究結果が神経回路形成機構の解明や神経疾患の発症原因の理解、神経軸索を再生する治療法の開発、そして、細胞が生み出す力の発生の基本的な仕組みの理解に貢献する可能性がある。

## < 謝辞 >

奈良先端科学技術大学院大学での 5 年間に渡る研究生活に関わってきた全ての人に感謝申し上げます。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、研究に対するモチベーション、研究者としての姿勢をご指導頂き感謝しております。

また、アドバイザー委員として箱嶋敏雄教授、塩崎一裕教授には、本研究に対する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助教、浦崎明宏助教、勝野弘子研究員、久保祐亮研究員(現:国立研究開発法人 日本医療研究開発機構)には、実験の意義や、実験技術、解析方法、プレゼンテーションの方法など数多くのを学ばせて頂いたこと感謝致します。

稲垣研先輩の阿部幸喜さん、稲垣研同期の高野拓郎さんをはじめとする研究室の皆様には、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感謝いたします。

奈良先端科学技術大学院大学、バイオサイエンス研究科、構造生物学研究室(箱嶋研究室)の森智行特任助教には、タンパク質の精製方法に関するご指導とご協力をして頂きました。

東京大学大学院工学系研究科の渡辺力也講師には、PDMS を用いたマイクロ流体デバイスの作製と Guidance assay に関するご指導とご協力をして頂きました。

岡崎統合バイオサイエンスセンター分子科学研究所の石井健太郎研究員には、Native mass 測定に関するご指導とご協力をして頂きました。

脳情報通信総合研究所の小沢哲博士(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、5 年間に渡る学生生活を経済的にも精神的にも支えてくれた両親、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の方々に心より感謝申し上げます。



## < 参考文献 >

- Antoine-Bertrand, J., Ghogha, A., Luangrath, V., Bedford, FK., Lamarche-Vane, N. (2011). The activation of ezrin–radixin–moesin proteins is regulated by netrin-1 through Src kinase and RhoA/Rho kinase activities and mediates netrin-1–induced axon outgrowth. *Molecular Biology of the Cell* 22, 3734-3746
- Bhattachajee, N., Li, N., Keenan, TM., and Folch, A. (2010). A neuron-benign microfluidic gradient generator for studying the response of mammalian neurons towards axon guidance factors. *The Royal Society of Chemistry* 2, 669-679.
- Brose, K. and Tessier-Lavigne, M. (2000). Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Current Opinion in Neurobiology* 10, 95-102
- Cajal, S. Ramón y. (1890) A quelle époque apparaissent les expansions des cellules nerveuses de la moëlle épinière du poulet? *Anat. Anz.* 5 (Nr. 21 and 22): 609-613, 631-639.
- Cajal, S. Ramón y. (1892) La rétine des vertébrés. *La Cellule* 9: 121-133.
- Chan, C. E., and Odde, D. J. (2008). Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science* 322, 1687–91.
- Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, AP., and Tessier-Lavigne, M. (2003). The morphogen sonic hedgehog ss an axonal chemoattractant that collaborates with Netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113, 11-23.
- Cohen, N. R., Taylor, J. S. H., Scott, L. B., Guillery, R. W., Soriano, P., and Furley, A. J. W. (1997). Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Current Biology* 8, 26-33.
- Cunha, SR and Mohler, PJ. (2009). Ankyrin protein networks in membrane formation and stabilization. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13,

4364-4376.

Dent, E. W., and Gertler, F. B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40, 209–27.

Dickson, B. J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298, 1959–64.

Dickson, T. C., DavidMintz, C., Benson, DL., and Salton, S. RJ. (2002). Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. *The Journal of Cell Biology* 157, 1105-1112.

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, 1505-1516

Fransen, E., Van Camp, G., Vits, L., and Willems. (1997). L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular genetic. *Human Molecular Genetics*. 6, 1625-1632.

Fransen, E., D'Hooge, R., Van Camp, G., Verhoye, M., Sijbers, J., Reyniers, E., Soriano, P., Kamiguchi, H., Willemsen, R., Koekkoek, SK., De Zeeuw, CI., De Deyn, PP., Van der Linden, A., Lemmon, V., Kooy, RF., and Willems, PJ. (1998). L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. *Human Molecular Genetics* 7, 999–1009.

Garver, T. D., Ren, Q., Tuvia, S., and Bennett, V. (1997). Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes Ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *The Journal of Cell Biology*. 137, 703-714

Gil, OD., Sakurai, T., Bradley, AE., Fink, MY., Cassella, MR., Kuo, JA., Felsenfeld, DP. (2003). Ankyrin Binding mediates L1CAM interactions with static components of the cytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1CAM on the cell surface. *The Journal of Cell Biology* 162, 719-730.

- Haspel, J., and Grumet, M. (2003) The L1CAM extracellular region: a multi-domain protein with modular and cooperative binding modes. *Front Bioscience* 8, 1210-1225
- Herron, L. R., Hill, M., Dvey, F., and GUNN-MOORE, F. J. (2009). The intracellular interactions of the L1 family of cell adhesion molecules. *Biochemical Journal*. 419, 519-531
- Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M., Tessier-Lavigne, M., and Stein, E. (1999). A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts Netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97, 927-941.
- Islam, SM., Shinmyo, Y., Okafuji, T., Su, Y., Naser, IB., Zhang, S., Chen, S., Ohta, K., Kiyonari, H., Abe, T., Tanaka, S., Nishinakamura, R., Terashima, T., Kitamura, T., and Tanaka, H. (2009). Draxin, a repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures. *Science* 323, 388-393
- Kamiguchi, H., Hlavin, ML., Yamasaki, M., and Lemmon, V. (1998). Adhesion molecules and inherited diseases of the human nervous system. *Annu.Rev. Neuroscience* 21, 97-125
- 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.
- Kubo, Y., Baba, K., Toriyama, M., Minegishi, T., Sugiura, T., Kozawa, S., Ikeda, K., and Inagaki, N. (2015). Shootin1-cortactin interaction mediates signal-force transduction for axon outgrowth. *The Journal of Cell Biology* 210, 663-676.
- 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.

- Luo, Y., Raible, D. and Raper, J. A. (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75, 217-227
- 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.
- Matsumoto, Y., Inden, M., Tamura, A., Hatano, R., Tsukita, S., Asano, Shinji. (2014). Ezrin mediates neuritogenesis via down-regulation of RhoA activity in cultured cortical neurons. *PLoS One* 9, e105435, 1-11.
- 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.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1, 761–72.
- Ming, GL., Wong, ST., Henley, ST., Yuan, X., Song, H., Spitzer, NC., and Poo, M. (2002). Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. *Nature* 417, 411-418.
- Nishimura, K., Yoshihara, F., Tojima, T., Oosashi, N., Mikoshiba, K., Bennett, V., Kamiguchi, H. (2003). L1-dependent neuritogenesis involves Ankyrin B that mediates L1-CAM coupling with retrograde actin flow. *The Journal of Cell Biology* 163, 1077-1088.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465.
- Rolf, B., Kutsche, M., and Bartsch, U. (2001). Severe hydrocephalus in L1-deficient mice. *Brain research* 891, 247-252.
- Sakurai, T., Gil, OD., Whittard, JD., Gazdoiu, M., Joseph, T., Wu, J., Waksman, A., Benson, DL., Salton, SR., and Felsenfeld, DP. (2008). Interactions

between the L1 cell adhesion molecule and Ezrin support traction- force generation and can be regulated by tyrosine phosphorylation. *Journal of Neuroscience Research* 86, 2602-2614.

Serafini, T., Kennedy, T. E., Galko, M. J. Jessell, T.M., and Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78, 409-424

Shekarabi, M., Moore, S.W., Tritsch, N.X., Morris, S.J., Bouchard, J.F., and Kennedy, T.E. (2005). Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. *Journal of Neuroscience*. 25, 3132–3141.

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.

Suter, DM and Forscher, P. (2001). Transmission of growth cone traction force through apCAM-cytoskeletal linkages is regulated by Src family tyrosine kinase activity. *The Journal of Cell Biology* 155, 427-438.

Tonosaki, M., Itoh, K., Umekage, M., Kishimoto, T., Yaoi, T., Lemmon, V., and Fushiki, S. (2014). L1cam is crucial for cell locomotion and terminal translocation of the soma in radial migration during murine corticogenesis. *PLoS One* 9, e86-186.

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.

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.

Turunen, O., Wahlstrom, T., and Vaehri, A. (1994). Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *The Journal of Cell Biology* 126, 1445-1453.

Tuvia, S., Garver, T. D., and Bennett, V. (1997). The phosphorylation state of the FIGQY tyrosine of neurofascin determines Ankyrin binding activity and patterns of cell segregation. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 94, 12957-12962

Weller, S., and Gartner, J. (2001). Genetic and Clinical Aspects of X-linked Hydrocephalus (L1Disease): Mutations in the *LICAM* Gene. *HUMAN MUTATION* 18, 1-12.

< 図表 >

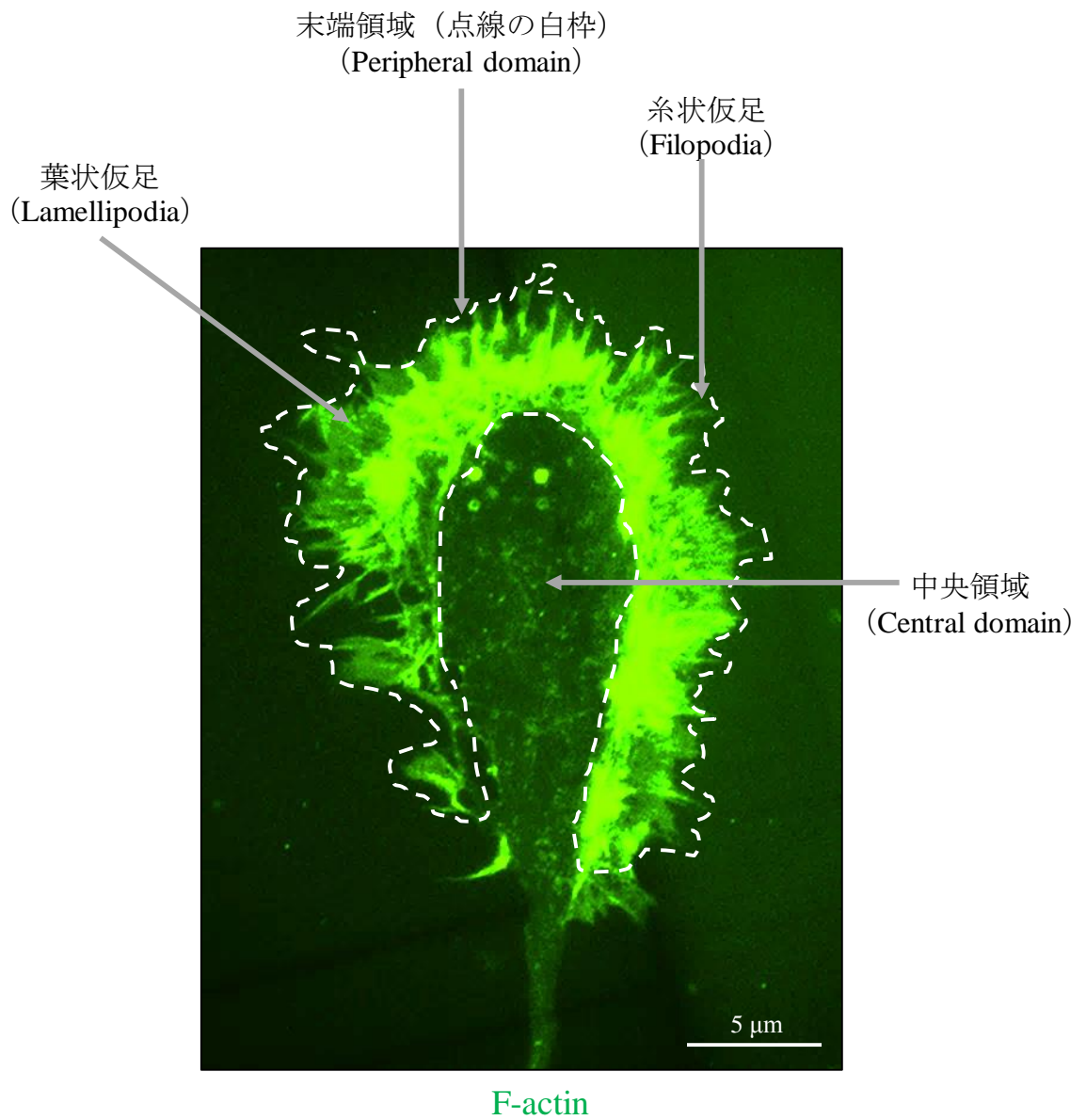


図1. 神経細胞の成長円錐  
成長円錐におけるアクチン線維 (緑) の画像。



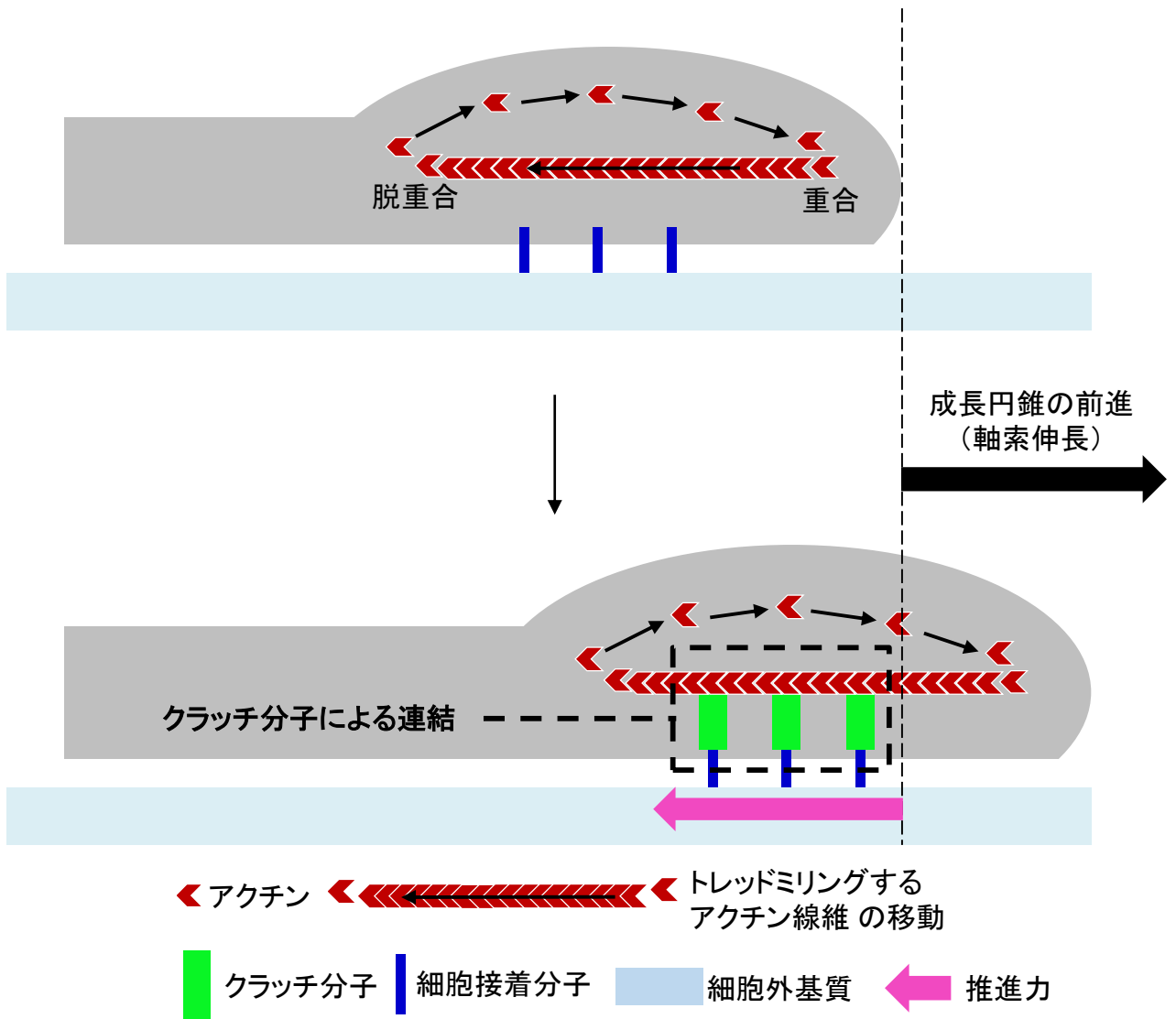


図2. アクチン線維の逆行性移動とクラッチメカニズムによる軸索伸長

成長円錐の先導端を表したものである

アクチン線維は重合と脱重合を繰り返しながら（トレッドミリングしながら）、逆行性に移動する（図の上段）。

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（図の下段、図の点線の黒枠）、アクチン線維の逆行性移動の移動が細胞接着分子に伝わりこの時に推進力（ピンク色の矢印）が生じて軸索が伸長する（黒色矢印）。

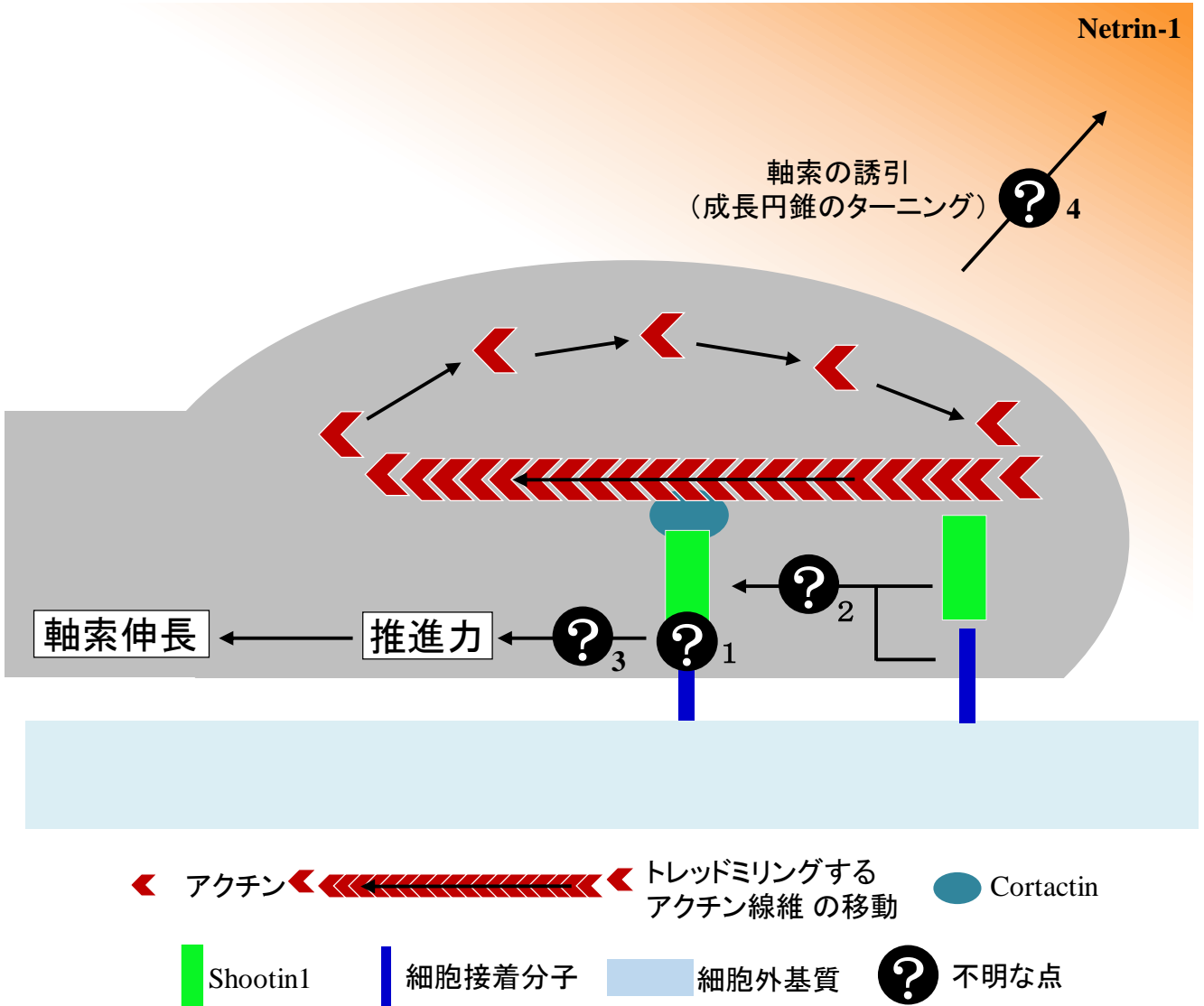
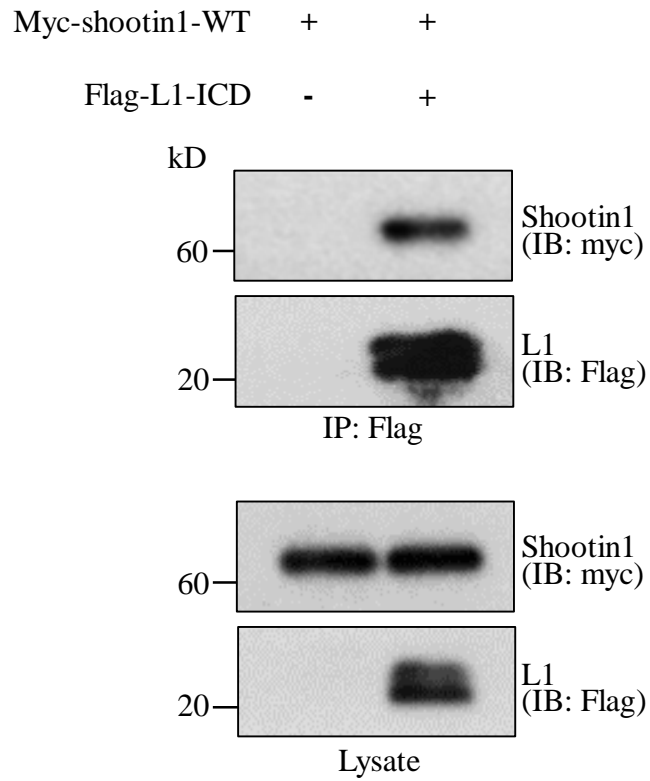


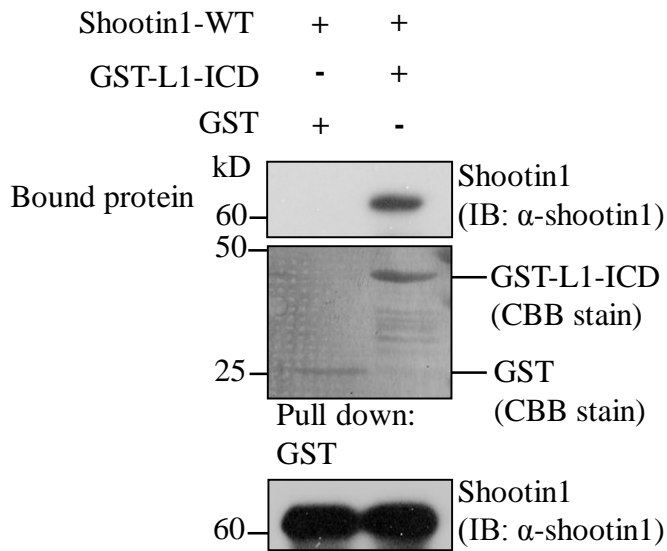
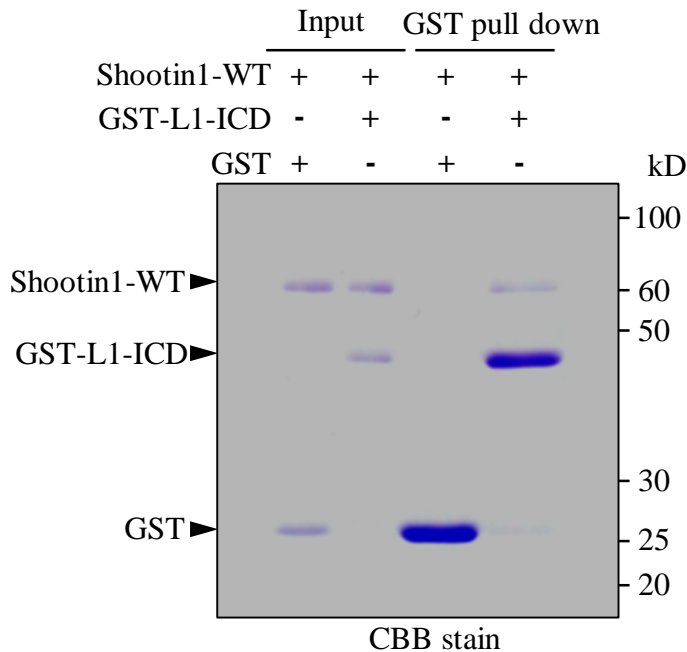
図3. クラッチメカニズムにおけるShootin1とL1の相互作用についての不明な点  
成長円錐の先端端を表したものである。

以下にShootin1とL1の相互作用についての不明な点を挙げる。

- 不明な点1 (?1) : Shootin1とL1は直接結合するか?
- 不明な点2 (?2) : Shootin1とL1の相互作用はどのように制御されるか?
- 不明な点3 (?3) : Shootin1とL1の相互作用は軸索伸長の推進力の発生に関与するか?
- 不明な点4 (?4) : Shootin1とL1の相互作用はNetrin-1による軸索ガイダンスに関与するか?

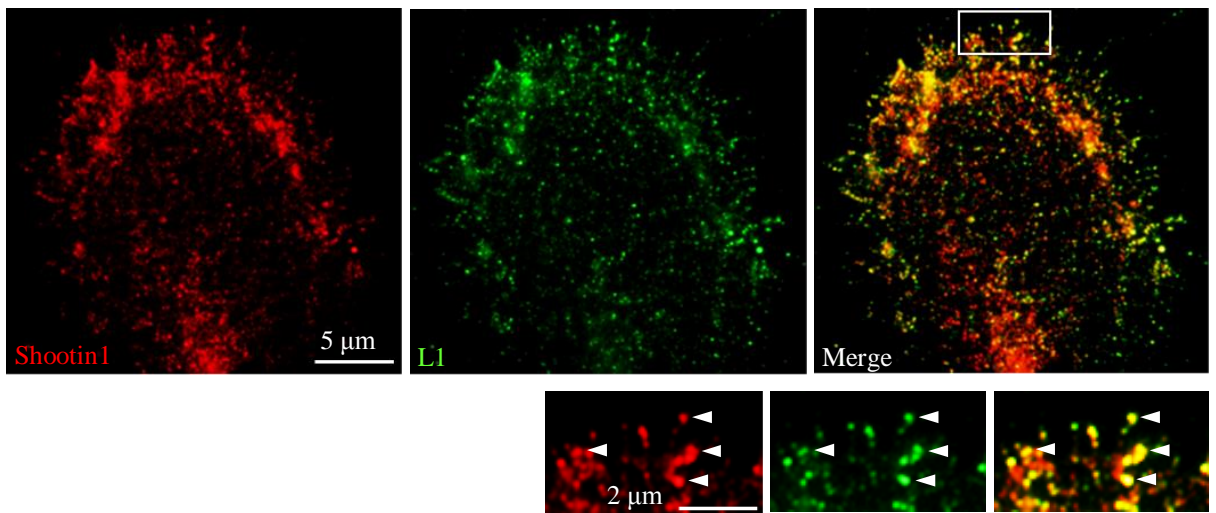


**図4. HEK293T細胞を用いたShootin1-WTとL1-ICD (L1 intracellular domain)との免疫共沈降実験**  
 Flag-L1-ICDを免疫沈降し、Myc-shootin1-WTをウエスタンブロッティングにより検出した。

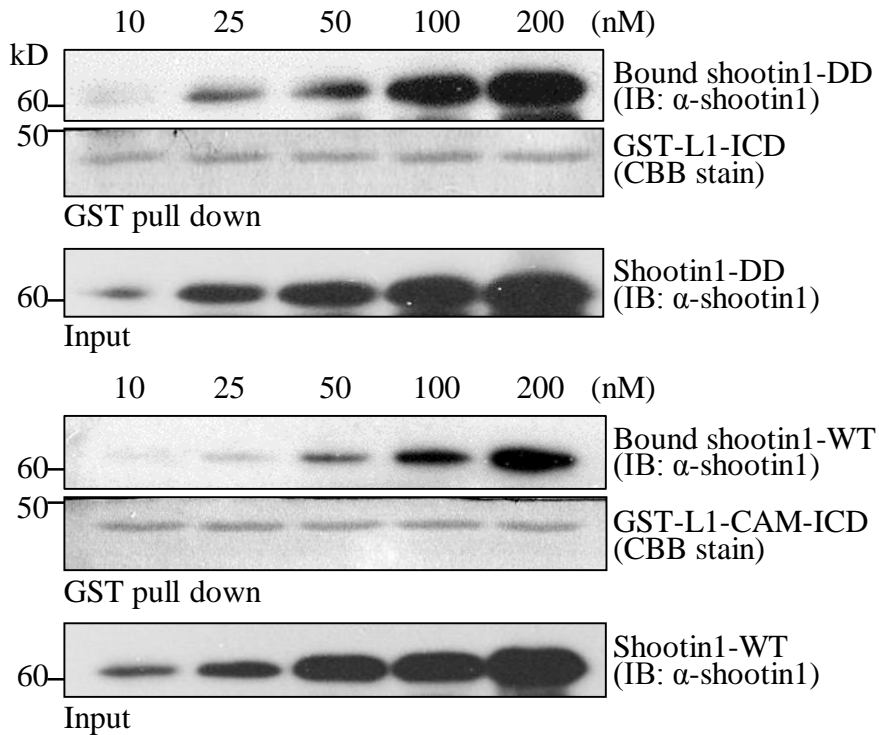
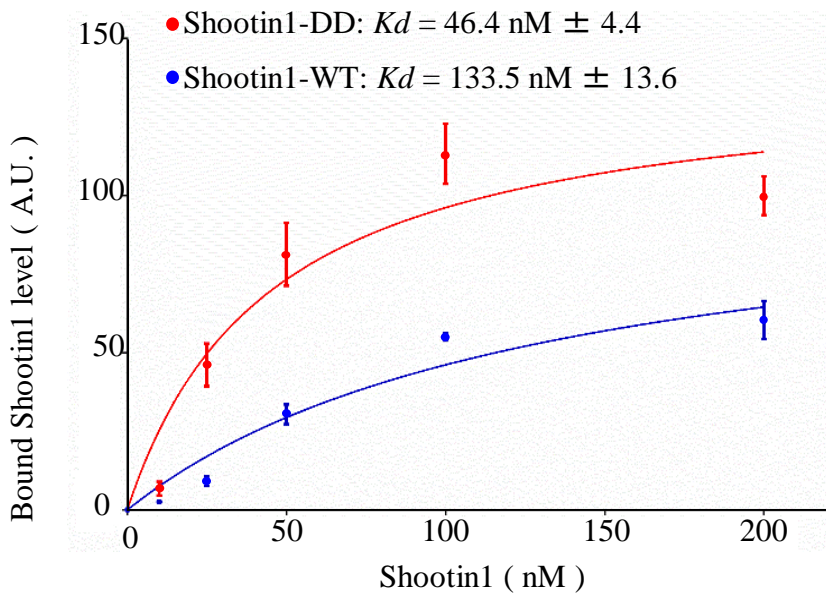
**A****B****図5. Shootin1-WTとL1-ICDの精製タンパク質同士による*in vitro* binding assay**

(A) 精製タンパク質を用いた*in vitro* binding assay。大腸菌に発現させ精製したタンパク質同士を混合し、GST-L1-ICDを沈降しShootin1-WTをウエスタンブロッティングにより検出した。

(B) 精製タンパク質を用いた*in vitro* binding assay。大腸菌に発現させ精製したタンパク質同士を混合し、GST-L1-ICDを沈降し溶出液を濃縮した後、Shootin1-WTをCBB染色により検出した。



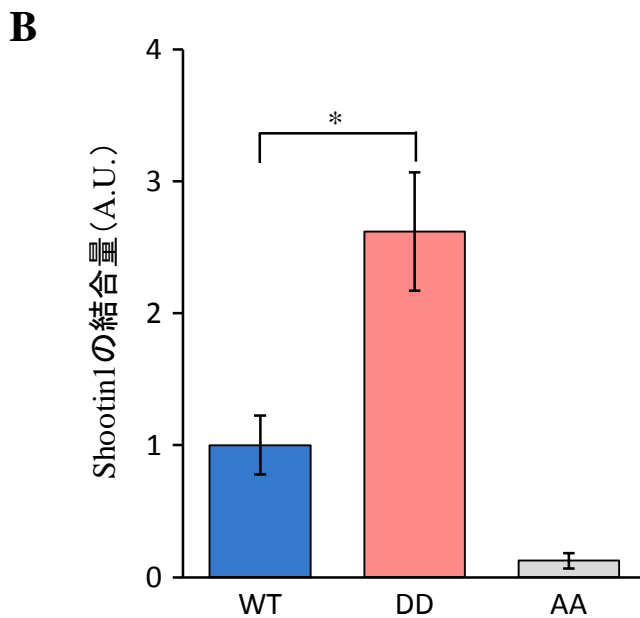
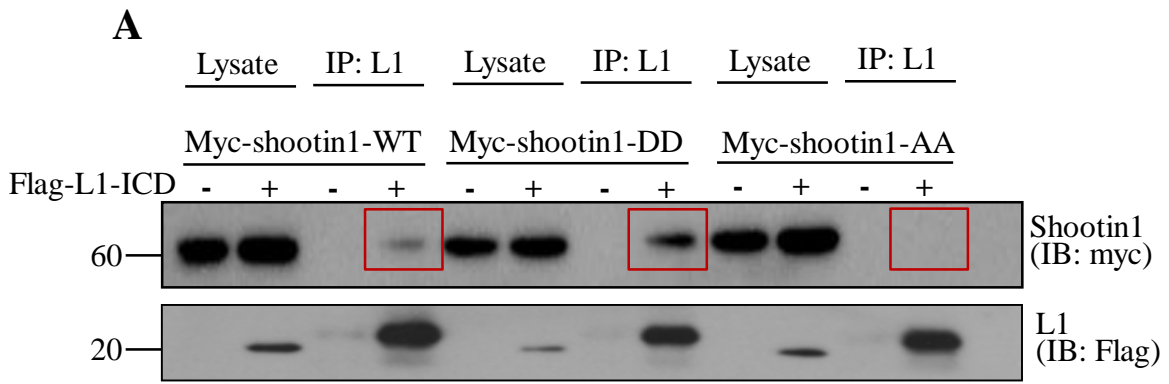
**図6. 全反射顕微鏡を用いて観察した成長円錐におけるShootin1とL1の局在**  
 培養海馬神経細胞を免疫細胞染色した。  
 培養海馬神経細胞の成長円錐におけるShootin1 (写真上左の赤) とL1 (写真中央の緑) の局在を示す。写真右に重ね合わせたものを示した。成長円錐先端端 (白棒) の領域を拡大したものを写真の下側に示した。矢頭はShootin1とL1の共局在を示す。

**A****B**

### 図7. *In vitro*における擬似リン酸化型Shootin1とL1-ICD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*in vitro* binding assayを行い、抗Shootin1抗体を用いてウェスタンブロッティングした。WTは野生型Shootin1、DDは擬似リン酸化型Shootin1を示す。

(B) (A) のL1-ICDと結合してきたShootin1の量をバンドの輝度として定量しグラフに示した。

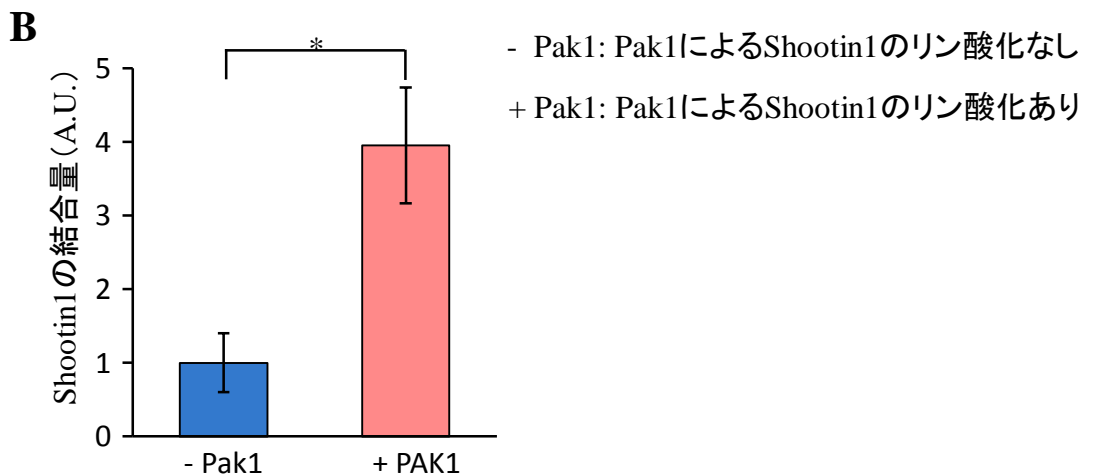
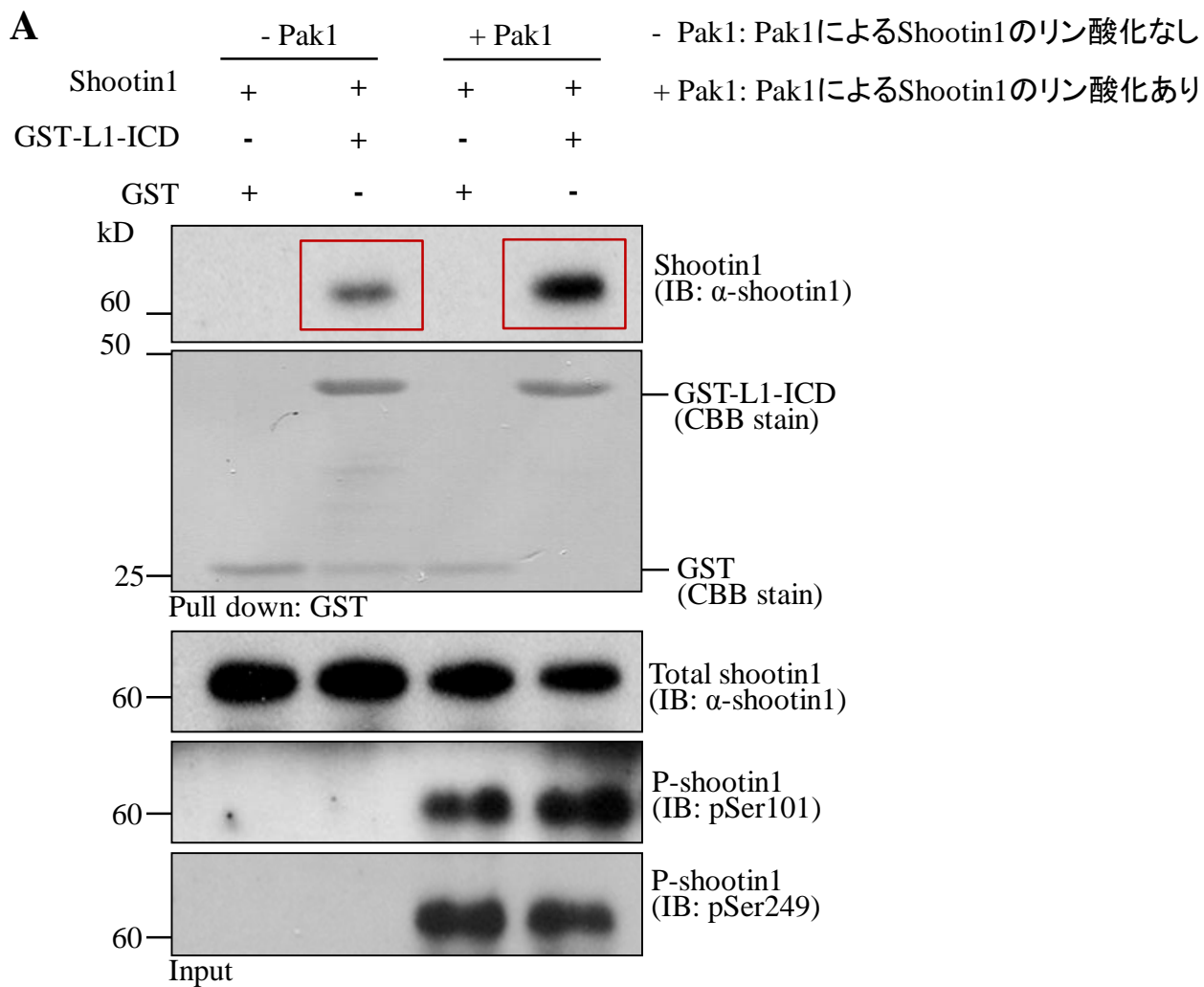


**図8. HEK293T細胞を用いたL1-ICDとShootin1-WT、Shootin1-DD、Shootin1-AAの免疫共沈降実験**

(A) Flag-L1-ICDを免疫沈降し、Myc-shootin1-WT、Myc-shootin1-DD、Myc-shootin1-AAをウエスタンブロッティングにより検出した。WTは野生型Shootin1、DDは擬似リン酸化型Shootin1、AAは非リン酸化型Shootin1を示す。写真の中の赤枠はL1-ICDと共沈降してきたMyc-shootin1 (WT, DD, AA) のバンドを示す。

(B) L1-ICDに沈降してきたShootin1のバンドの輝度をLysateのバンドの輝度で割った値をShootin1の結合量として算出した (N=4)。

WTの結合量を1とした際の値をグラフに示した。(\*,  $p < 0.05$ )



**図9. Pak1によりリン酸化されたShootin1とGST-L1-ICDの精製タンパク質同士による*in vitro* binding assay**

Pak1によりリン酸化した精製Shootin1と精製GST-L1-ICD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 (101番目もしくは249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。Pak1-はPak1によるShootin1のリン酸化なしを示し、Pak1+はPak1によるShootin1のリン酸化ありを示す。写真の中の赤枠はL1-ICDと結合したShootin1のバンドを示す。

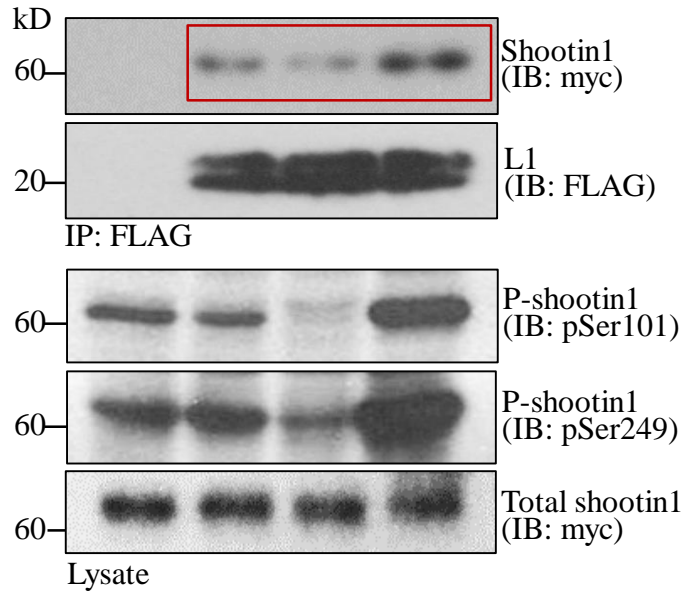
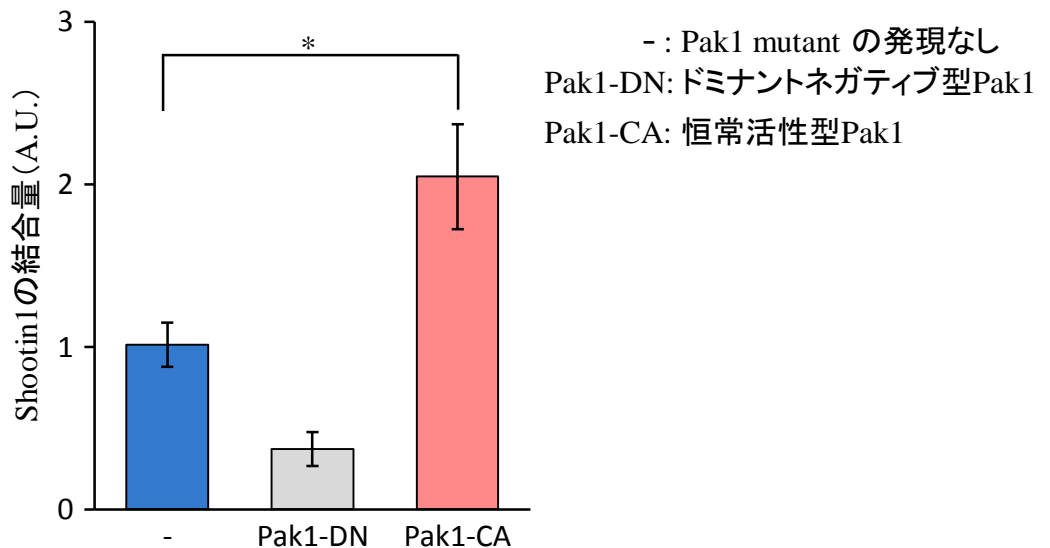
(B) Pak1-とPak1+の際のL1-ICDに結合したShootin1のバンドの輝度をInputのバンドの輝度で割った値をShootin1の結合量として算出した (N=3)。

Pak1-の際のShootin1の結合量を1とした際の値をグラフに示した。(\*,  $p < 0.05$ )



**A**

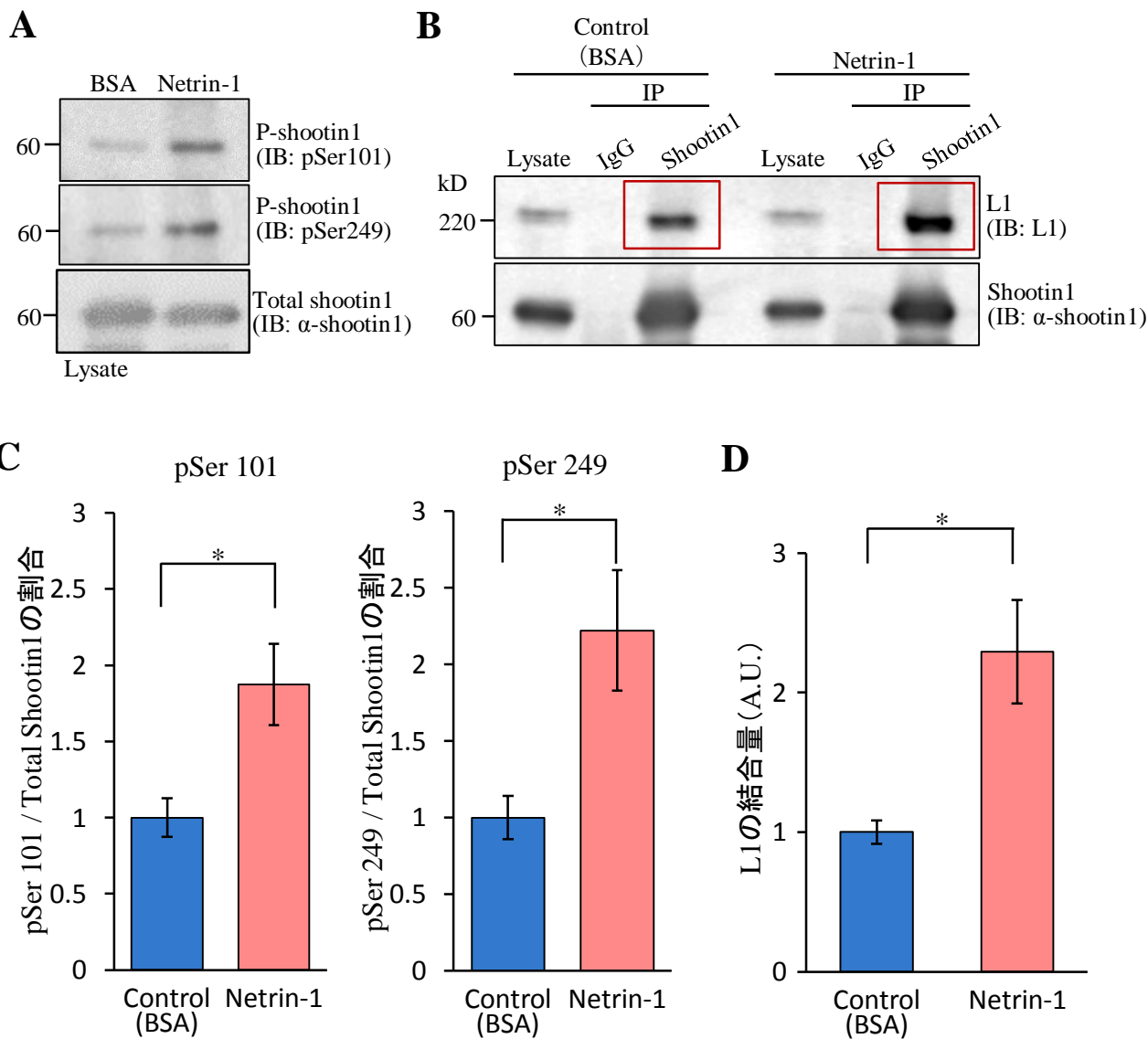
Flag-L1-ICD	-	+	+	+
Myc-shootin1	+	+	+	+
Pak1 mutant	-	-	DN	CA

**B**

**図10. Pak1 mutant (Pak1-CAおよびPak1-DN)を発現させたHEK293T細胞を用いたL1-ICDとShootin1-WTの免疫共沈降実験**

(A) Flag-L1-ICDを免疫沈降しMyc-shootin1-WTをウエスタンブロッティングにより検出した。写真の中の赤枠はL1-ICDと結合したShootin1のバンドを示す。DNはドミナントネガティブ型のPak1、CAは恒常活性型のPak1を示す。リン酸化の確認のために二種類の抗リン酸化shootin1抗体 (101番目もしくは249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 (P-shootin1で示す)。

(B) L1-ICDに結合したShootin1のバンドの輝度をLysateのバンドの輝度で割った値をShootin1の結合量として算出した (N=3)。Pak1 mutantなし (-) の際のShootin1の結合量を1とした際の値をグラフに示した。(\*,  $p < 0.05$ )



### 図11. 神経細胞を用いた免疫共沈降実験

Netrin-1 (300 ng / mL, 1h) 刺激後の神経細胞を用いた免疫共沈降実験

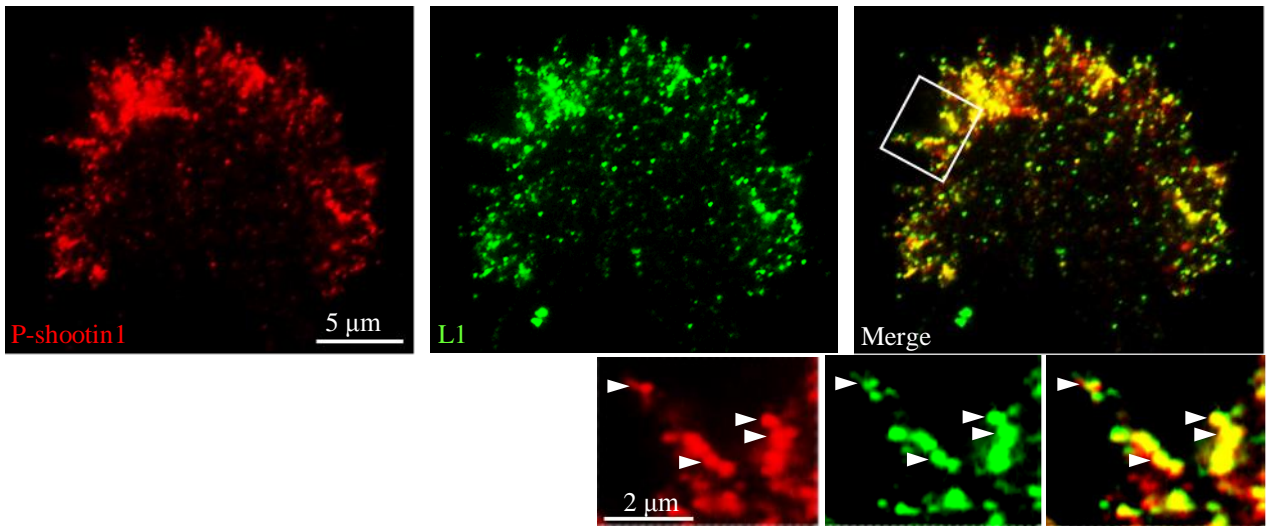
抗Shootin1抗体によりShootin1を免疫沈降し、ウエスタンブロッティングによりL1を検出した。コントロールとして、rabbit normal IgGを使用した。

(A) Shootin1のリン酸化の確認のために二種類の抗リン酸化shootin1抗体 (101番目もしくは249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結果を示す。コントロールとしてBSA刺激を行った。

(B) 内在性のShootin1とL1の免疫共沈降実験の結果を示す。Shootin1に沈降してきたL1のバンドを示す (赤枠)

(C) Netrin-1 (300 ng / mL, 1h) 刺激後の神経細胞におけるリン酸化Shootin1の量を調べた。リン酸化Shootin1のバンドの輝度をTotal Shootin1のバンドの輝度で割った値を算出した。Control (BSA刺激) の時のバンドの輝度を1とした際の値をグラフに示した。(\*,  $p < 0.05$ )

(D)免疫共沈降実験のL1のバンドの輝度 (B) を定量した。Shootin1に結合したL1のバンドの輝度をLysateのバンドの輝度で割った値をL1の結合量として算出した (N=5)。Control (BSA刺激) のL1の結合量を1とした際の値をグラフに示した。(\*,  $p < 0.05$ )



**図12.** 全反射顕微鏡を用いて観察した成長円錐におけるリン酸化Shootin1とL1の局在  
 培養海馬神経細胞を免疫細胞染色した。  
 培養海馬神経細胞の成長円錐におけるリン酸化Shootin1 (P-shootin1、写真左の赤) と  
 L1 (写真中央の緑) の局在を示す。写真右に重ね合わせたものを示した。成長円錐先  
 導端 (白棒) の領域を拡大したものを写真の下側に示した。矢頭はリン酸化  
 Shootin1 (pShootin1) とL1の共局在を示す。

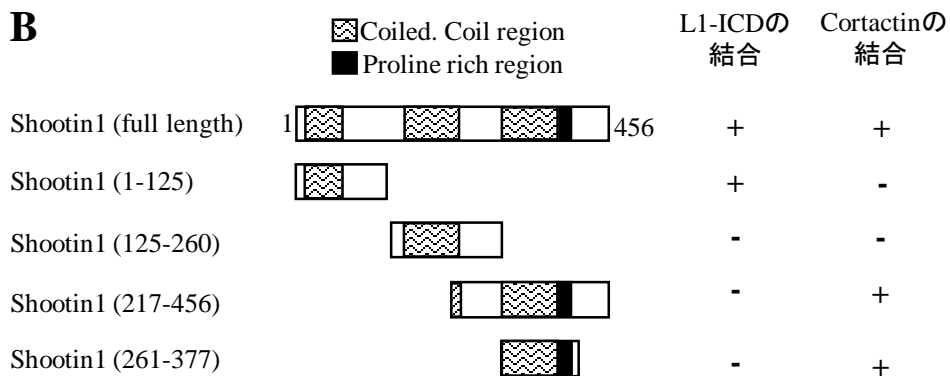
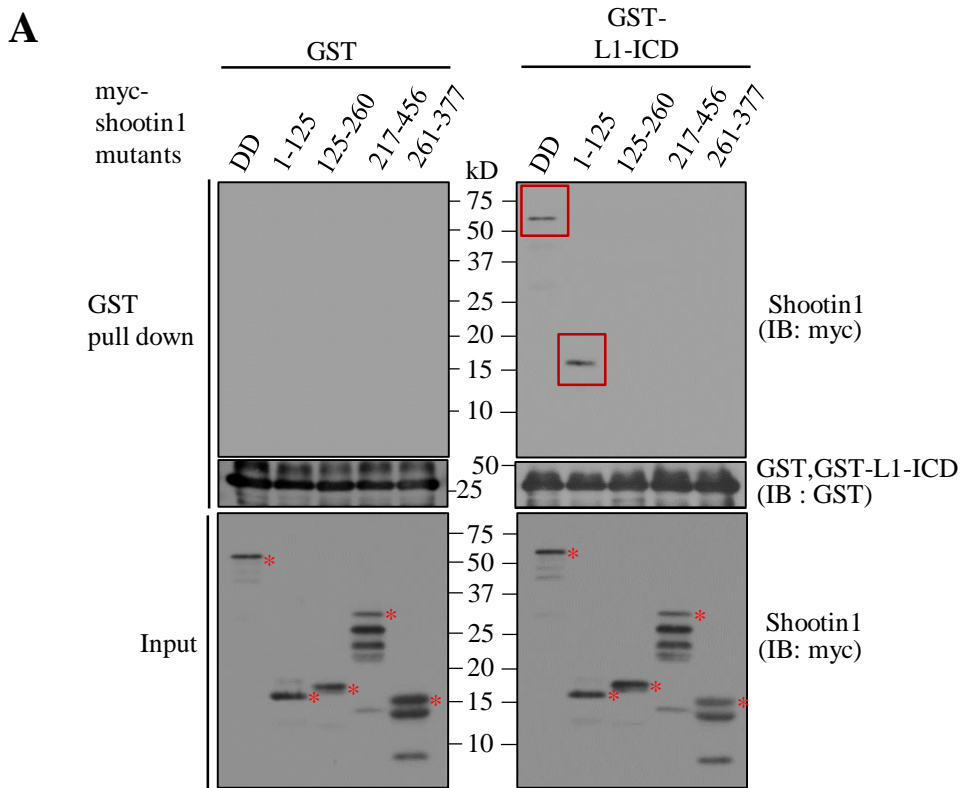
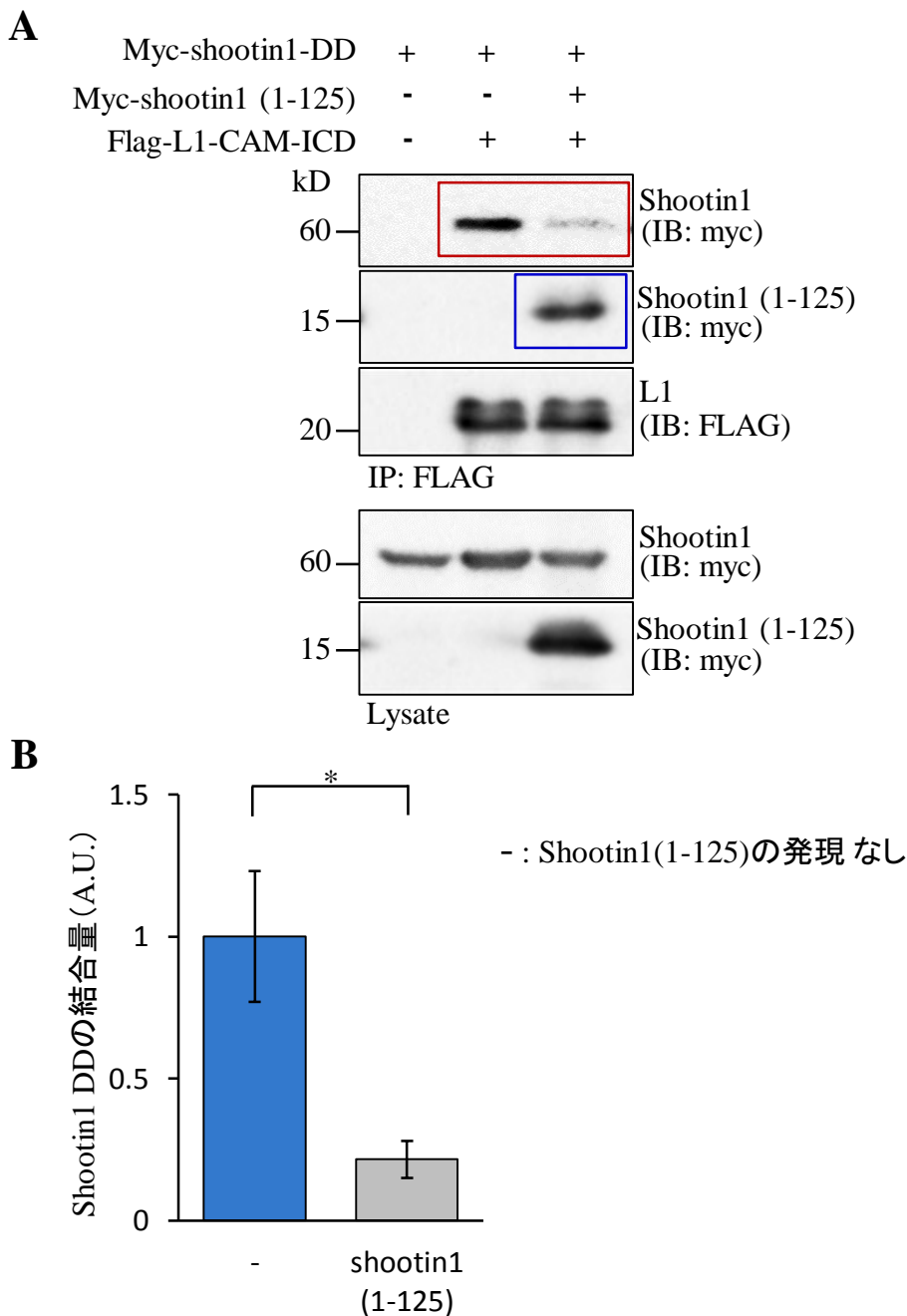


図13. Shootin1切断型変異体を用いた*in vitro* binding assayによるShootin1におけるL1結合部位の解析

(A)Shootin1切断型変異体の精製タンパク質を用いた*in vitro* binding assay。ポジティブコントロールとしてmyc-shootin1-DDの精製タンパク質を用いた。赤枠はL1-ICDに結合したShootin1変異体を示す。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。

(B)Shootin1変異体の模式図とL1およびCortactinとの結合の有無。+は結合が検出されたことを表し、-は結合が検出されなかったことを表す。



**図14. Shootin1 (1-125) を過剰発現させたHEK293T細胞を用いたL1-ICDとShootin1の免疫共沈降実験**

(A) Myc-shootin1 (1-125) を過剰発現させたHEK293T細胞を用いてFlag-L1-ICDを免疫沈降しMyc-shootin1-DDをウエスタブロットティングにより検出した。ポジティブコントロールとしてMyc-shootin1-DDとL1-ICDの免疫共沈降実験を行った。写真の中の赤枠はL1-ICDと共沈降してきたShootin1-DDのバンドを示す。写真の中の青枠はL1-ICDに沈降してきたMyc-shootin1 (1-125) を示す。写真一番下のLysateのレーンでMyc-shootin1 (1-125) が発現することを抗Myc抗体により確認した。

(B) Shootin1(1-125)を発現させてない (-) 時と発現させた時のL1-ICDに結合したShootin1-DDの結合量を算出した。L-ICDに結合したShootin1-DDのバンドの輝度をLysateのバンドの輝度で割った値をShootin1の結合量として算出した (N=3)。Shootin1(1-125)の発現なし (-) のShootin1-DDの結合量を1とした際の値をグラフに示した。(\*,  $p < 0.05$ )

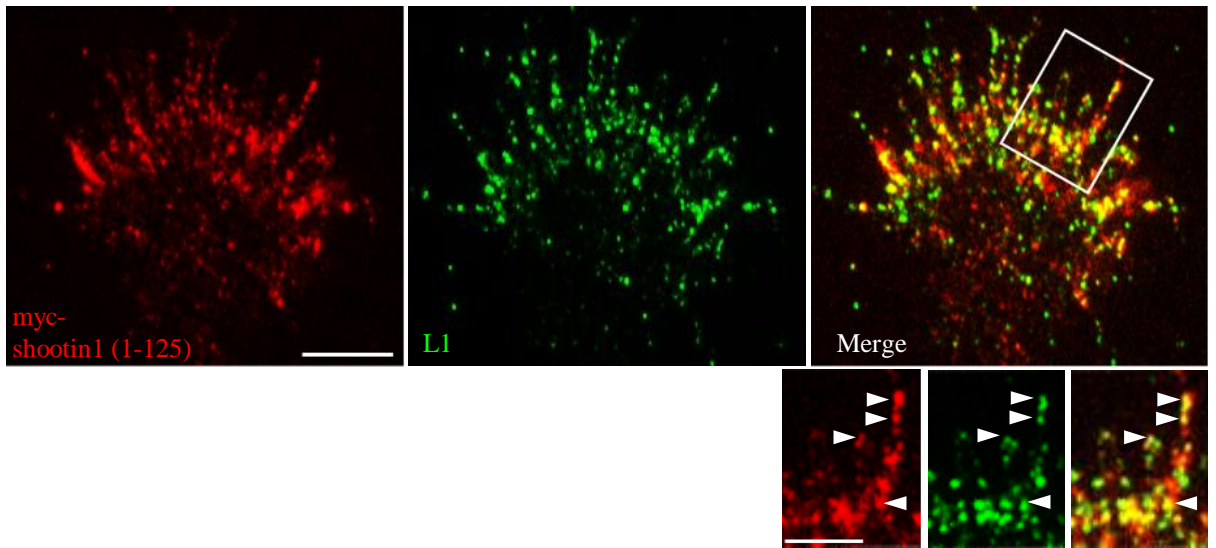
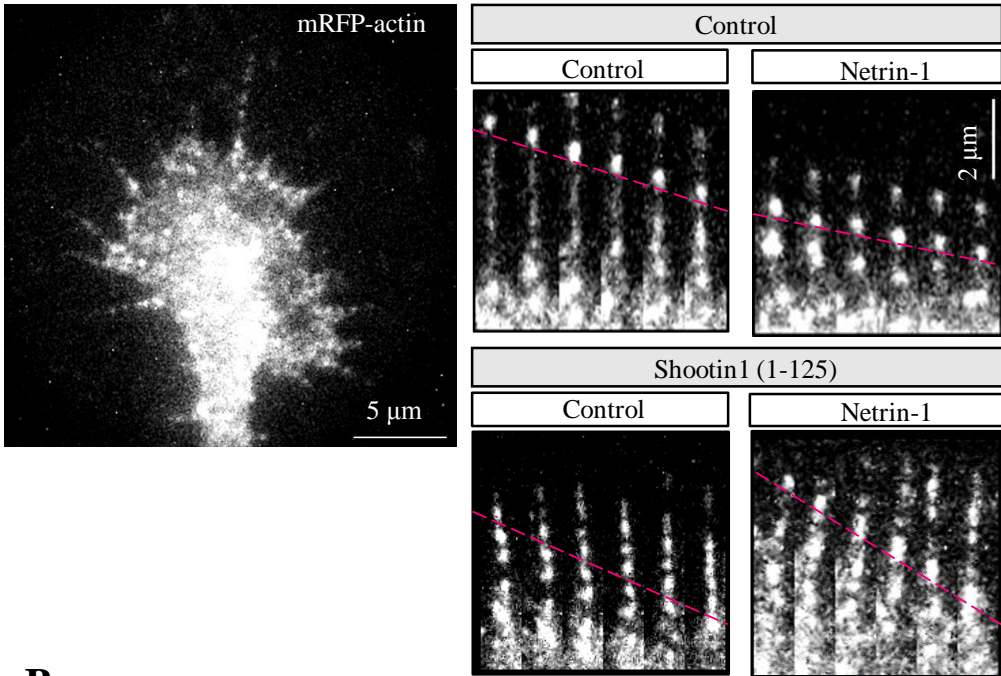


図15. 全反射顕微鏡を用いて観察した成長円錐におけるmyc-shootin1(1-125)とL1の局在

myc-shootin1(1-125)を遺伝子導入した培養海馬神経細胞を免疫細胞染色した培養海馬神経細胞の成長円錐におけるMyc-shootin1 (1-125) (写真左の赤) とL1 (写真中央の緑) 局在。写真右に重ね合わせたものを示した。成長円錐先端端 (白枠) の領域を拡大したものを写真の下側に示した。矢頭はMyc-shootin1 (1-125) とL1の共局在を示す

Scale Bar: 5 $\mu$ m

A



B

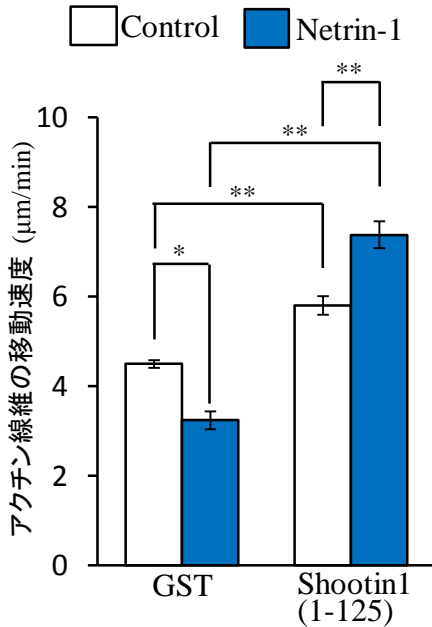
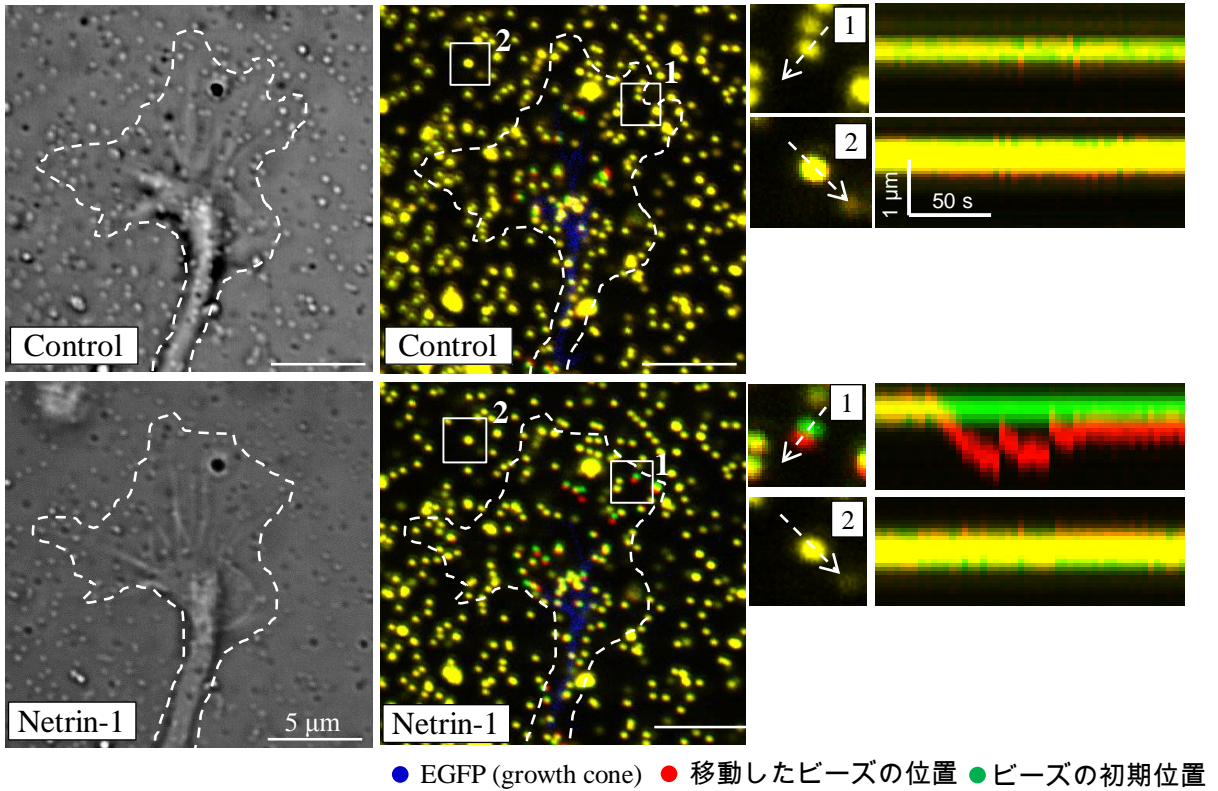


図16. Shootin1 (1-125) を過剰発現させた神経細胞の成長円錐におけるmRFP-actinスペックルの速度解析

(A) コントロール細胞 (myc-GST過剰発現) またはmyc-shootin1(1-125)を過剰発現させた細胞の成長円錐におけるmRFP-actinの蛍光スペックルの観察。図Aの右の写真はFilopodiaでのmRFP-actinのスペック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。Bar: 5 μm、キモグラフ中のScale Bar: 2 μm

(B) (A) で作成したキモグラフから、mRFP-actinのスペックルの速度を定量し、グラフに示した。(\*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ )

A



B

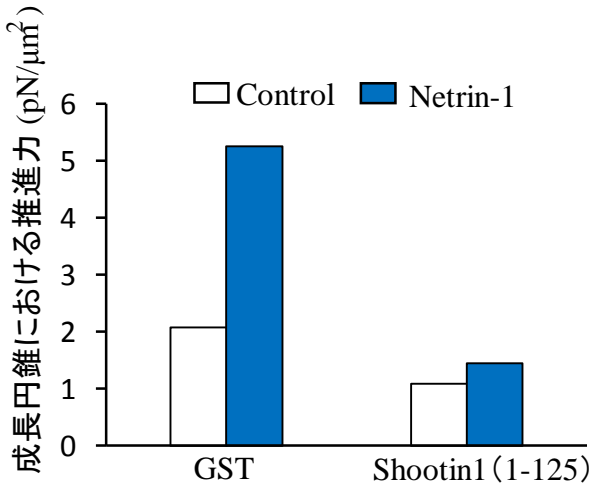


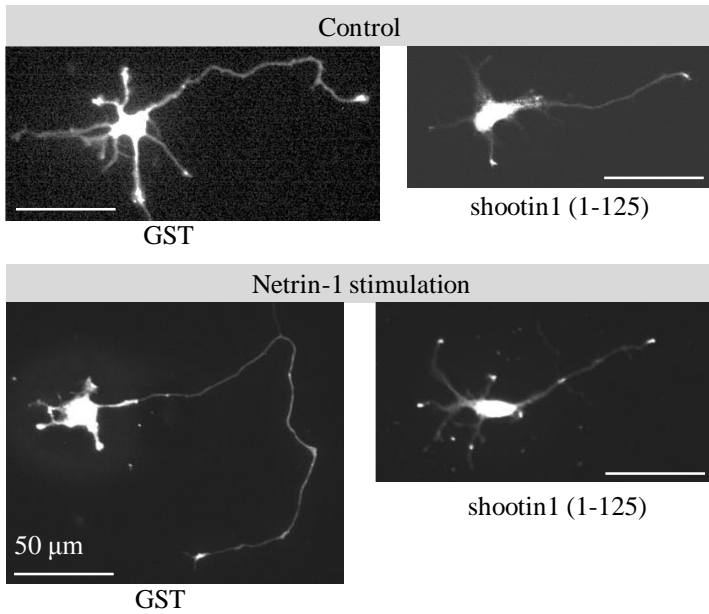
図17. Traction force microscopyによるShootin1 (1-125) を過剰発現させた神経細胞の成長円錐における軸索伸長のための推進力の解析

(A) コントロール細胞 (GST過剰発現およびEGFP発現) の軸索の成長円錐 (上段は Netrin-1刺激 (Control) の写真、下段はNetrin-1刺激後の写真) におけるTraction force microscopy。ビーズの初期位置 (緑) と移動したビーズ (赤) とEGFPを発現する成長円錐 (青) を示した。白枠で示したビーズのキモグラフを作成し右の写真に示した。白破線は成長円錐を示している。Bars: 5 μm

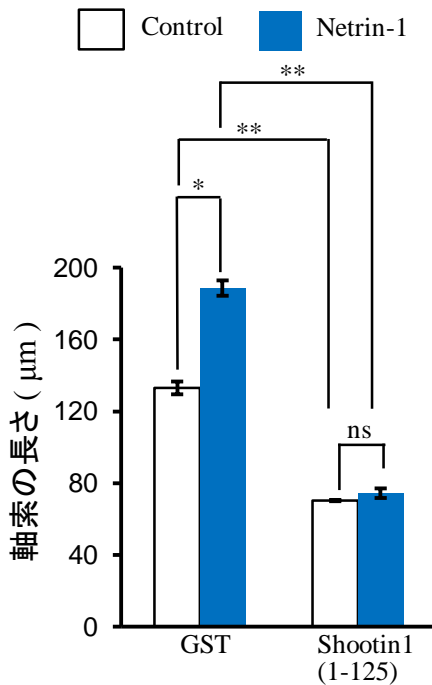
白枠の1は成長円錐の内側の引っ張られているビーズを示す。  
 白枠の2は成長円錐の外側のビーズを示す (ネガティブコントロール)  
 (B) 成長円錐下の単位時間あたりの平均の力を定量しグラフに示した。



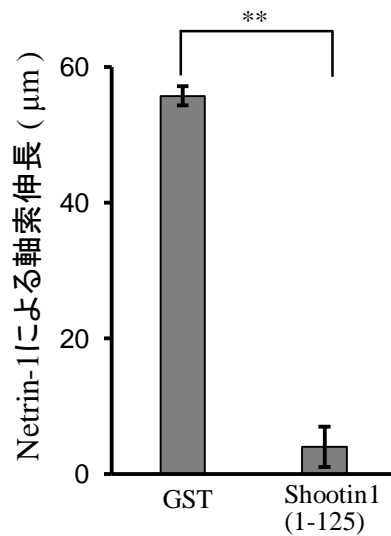
A



B



C



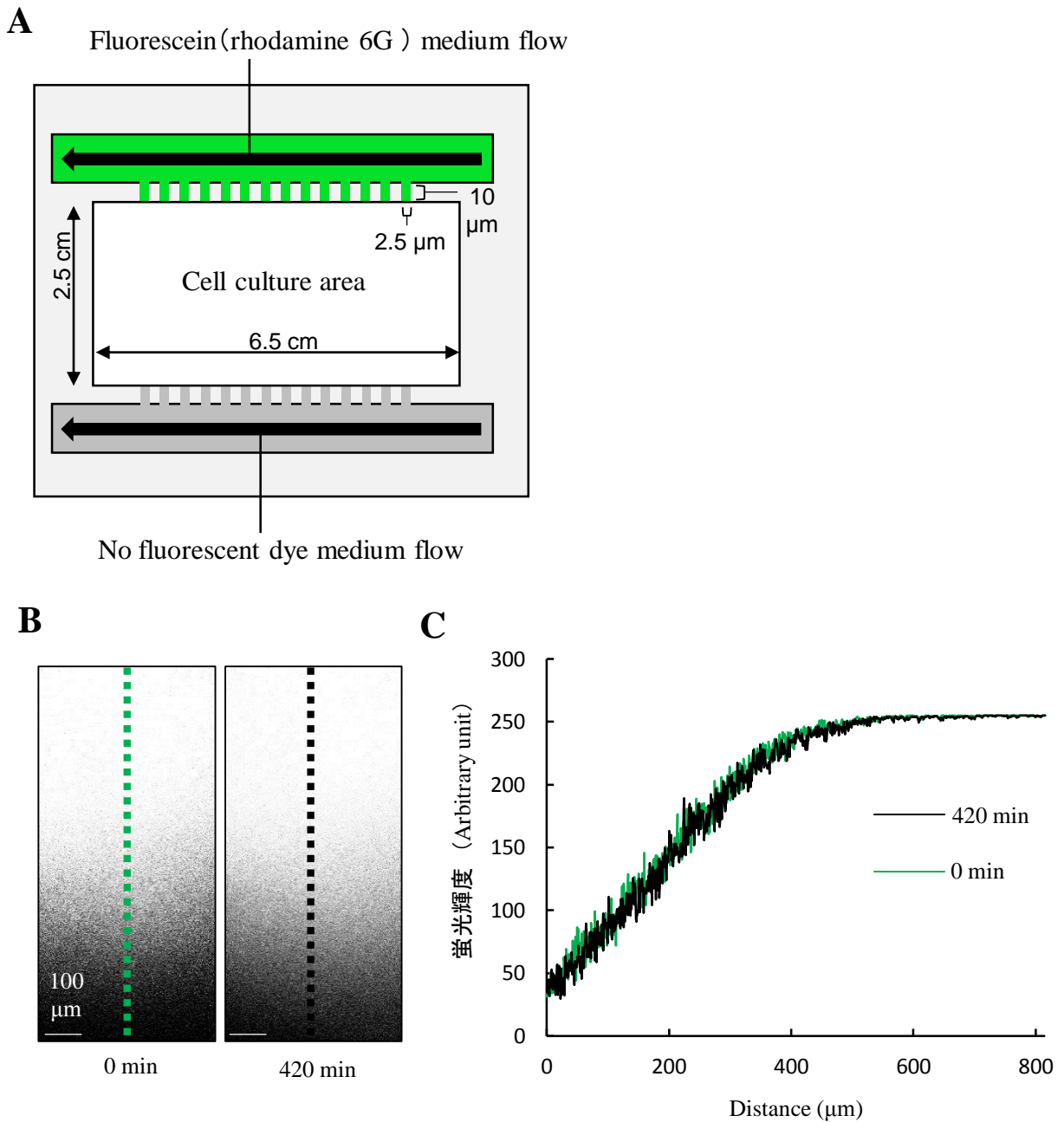
### 図18. Shootin1 (1-125) を過剰発現させた神経細胞における軸索伸長の解析

(A) コントロール細胞 (myc-GST過剰発現)とmyc-shootin1 (1-125) を過剰発現させた神経細胞(培養2日目)の抗Myc抗体による免疫細胞染色の写真。Bar: 50 μm

(B) 300 ng/mlのNetrin-1 (コントロールとしてBSA) を加え培養2日後に、コントロール細胞 (GST過剰発現) およびShootin1 (1-125) を過剰発現させた神経細胞を免疫染色した後、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ものを、Netrin-1刺激による軸索伸長としグラフに示した。

(\*\*\*,  $p < 0.01$ 、\*\*,  $p < 0.02$ 、\*,  $p < 0.05$ 、ns,  $p > 0.05$ )



### 図19. マイク流体デバイス

(A) マイクロ流体デバイスの模式図

(B)および(C) 蛍光色素の濃度勾配が形成し始めてから (0min)、420min後の蛍光色素のIntensity (蛍光輝度) を測定しグラフに表した。緑の線は0minを示し、黒の線は420minを示す。デバイス内で420分の間、蛍光色素 (Fluorescein) の濃度勾配が形成される

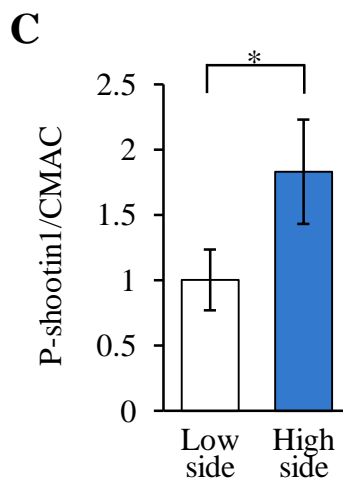
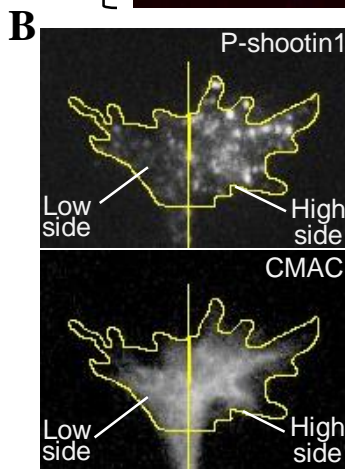
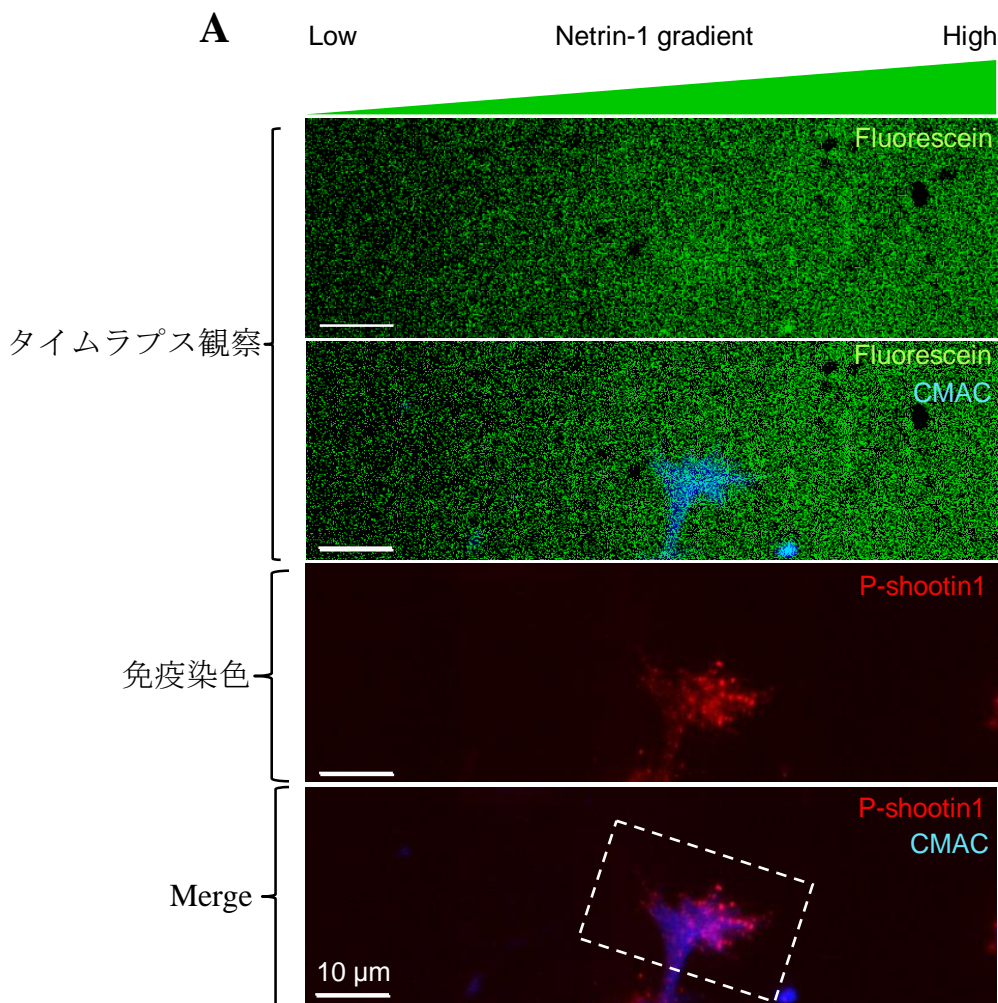
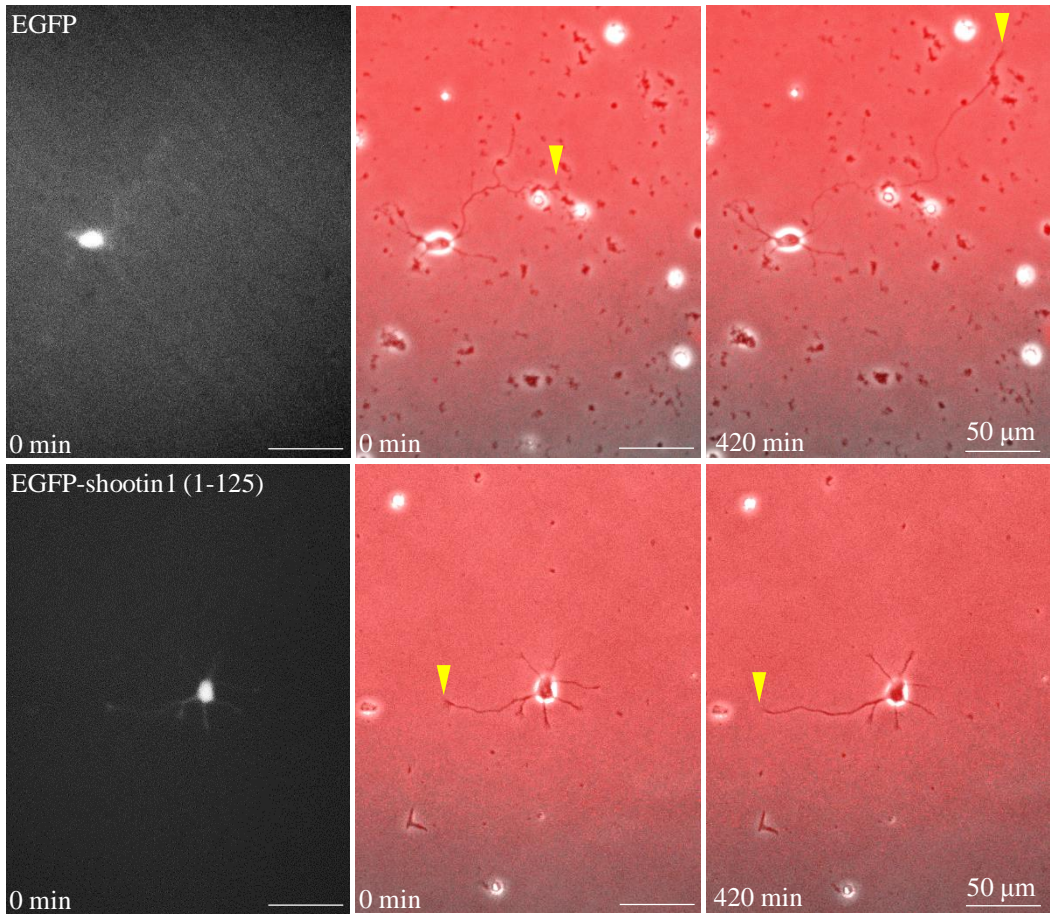
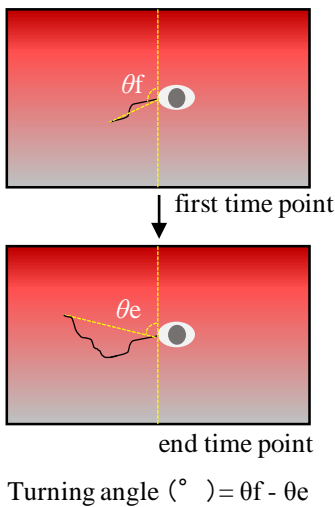
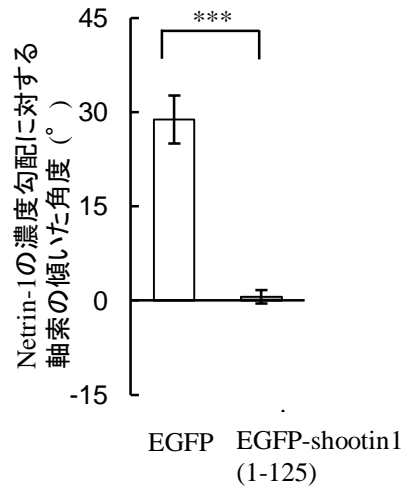


図20. Netrin-1の濃度勾配下にある成長円錐におけるリン酸化Shootin1の解析

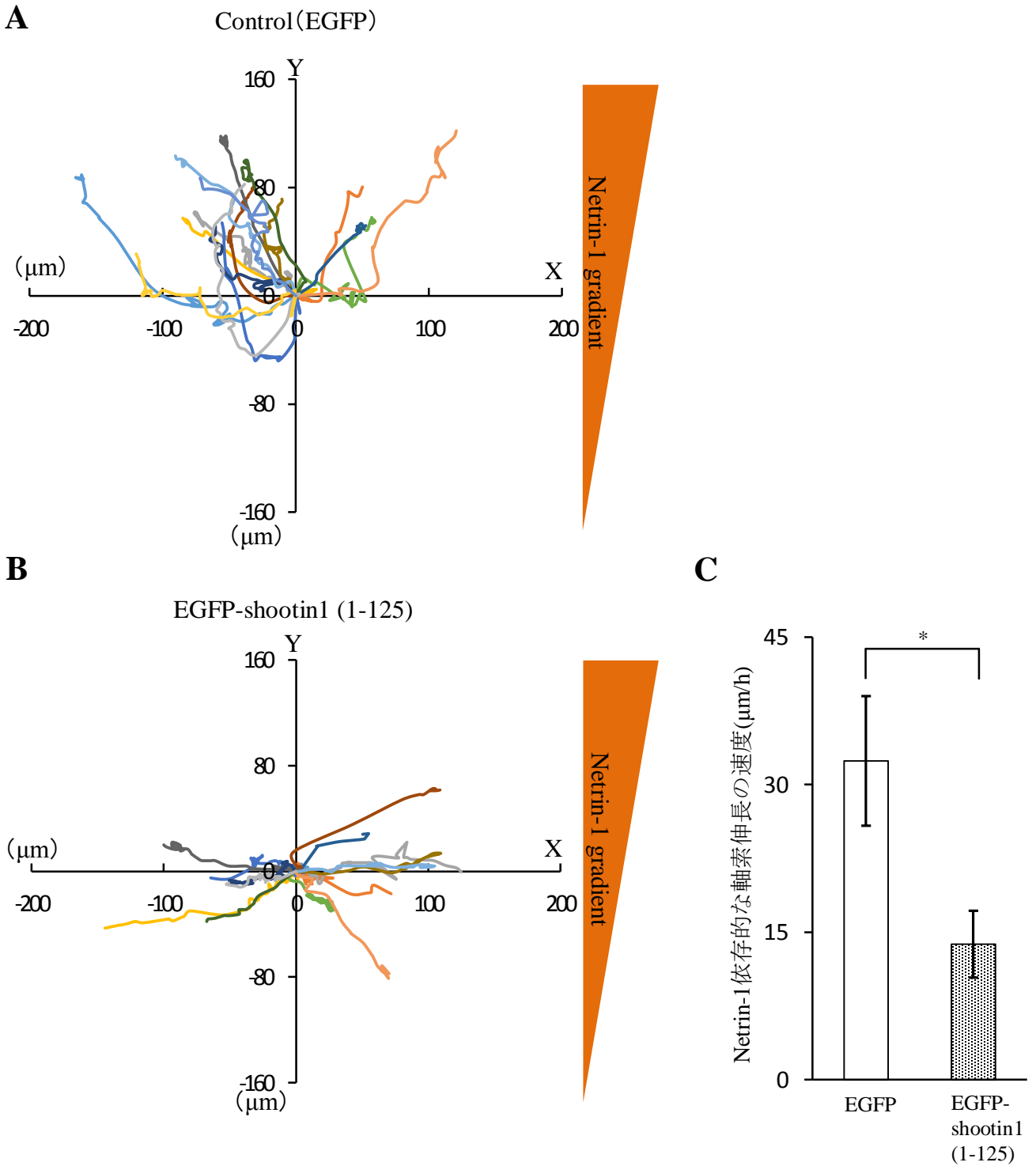
(A) Netrin-1 (300 ng / mL) 濃度勾配下の成長円錐を30分間タイムラプス観察した(写真、上の二段)。CMACは生細胞の細胞質全体を染めるボリュームマーカである。上から三段目の写真はNetrin-1の濃度勾配後に免疫細胞染色した神経細胞の成長円錐である。Shootin1のリン酸化抗体を用いて免疫細胞染色を行った。Merge写真にある白の破線の拡大図を(B)に載せる

(B) 成長円錐においてNetrin-1の濃度が高い側の成長円錐の領域(写真の右側の領域: High side)と、Netrin-1の濃度が低い側の成長円錐の領域(写真の左側の領域: Low side)でリン酸化Shootin1を観察した。

(C) (B)の写真のHigh sideおよびLow sideのP-shootin1とCMACの蛍光輝度を算出し、P-shootin1/CMACの割合を求めた(N=7)。Low sideのP-shootin1/CMACを1とした際の値をグラフに示した。(\*,  $p < 0.05$ )

**A****B****C**

**図21. Shootin1 (1-125) を過剰発現させた神経細胞における軸索の伸長方向の解析**  
 (A) コントロール (EGFP過剰発現) とEGFP-shootin1 (1-125) を過剰発現させた神経細胞をデバイス内で培養し、Netrin-1の濃度勾配下でタイムラプス観察を行った。  
 (B) 軸索の基部から軸索先端までの角度を $\theta_f$ とし、Netrin-1の濃度勾配後の軸索の基部から先端までの角度を $\theta_e$ とする。 $\theta_f - \theta_e$ によりNetrin-1の濃度勾配に対して曲がる軸索の角度がわかる。  
 (C) Netrin-1の濃度勾配に対して曲がる軸索の角度を算出しグラフとして表した。  
 (\*\*\*,  $p < 0.01$ )



**図22. Netrin-1濃度勾配下における軸索の軌道および軸索伸長速度**

(AとB) Netrin-1 (300 ng / mL) 濃度勾配下の軸索伸長の軌道を描いた。0分から420分間の軸索が曲がる方向を示す。(A)のグラフはコントロール細胞 (EGFP過剰発現細胞) の軸索の軌道を示す (17個分)。(B)のグラフはEGFP-shootin1 (1-125) の過剰発現細胞 (16) の軸索の軌道を示す (16個分)。

(C) Netrin-1 (300 ng / mL) 濃度勾配下の軸索伸長の速度を算出した。コントロール細胞 (EGFP過剰発現細胞) とEGFP-shootin1 (1-125) の過剰発現細胞の軸索伸長の速度をグラフに表した。(\*,  $p < 0.05$ )



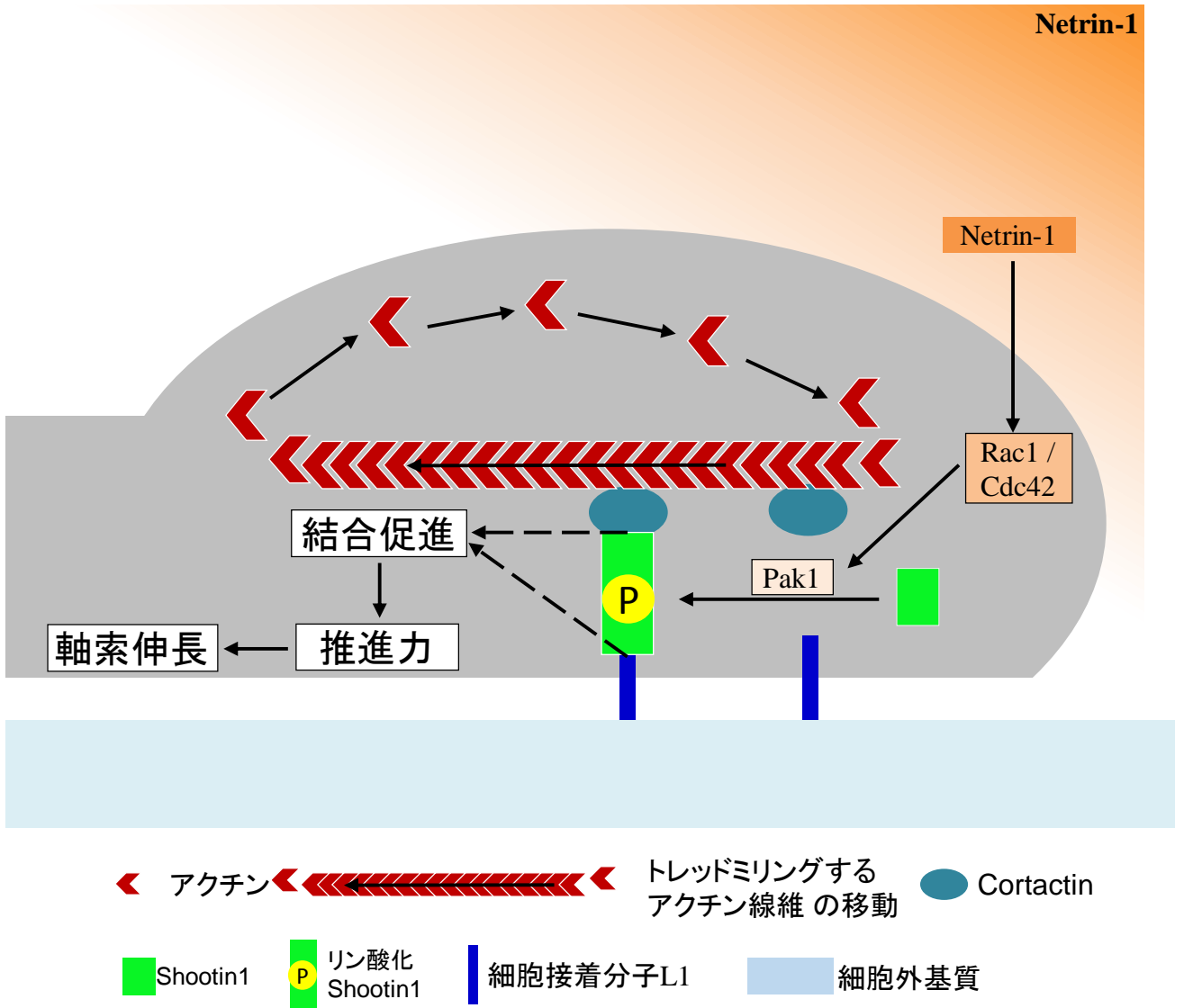
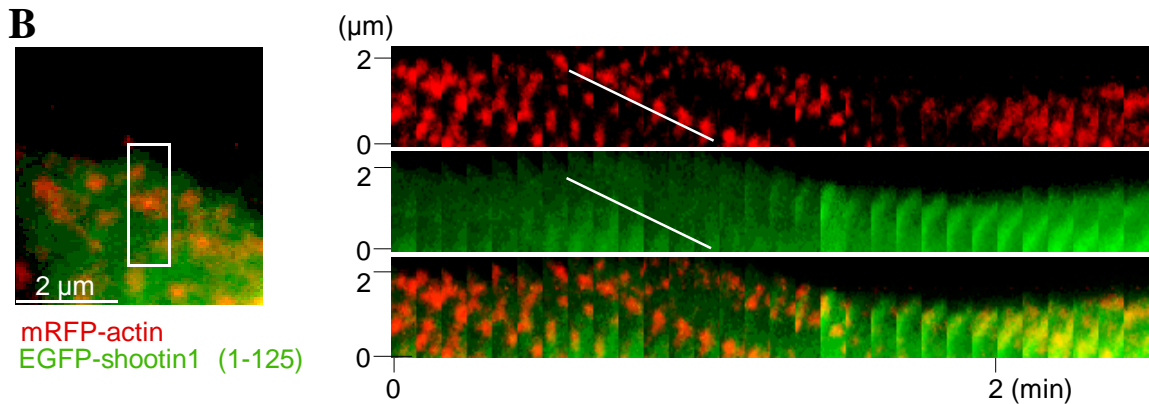
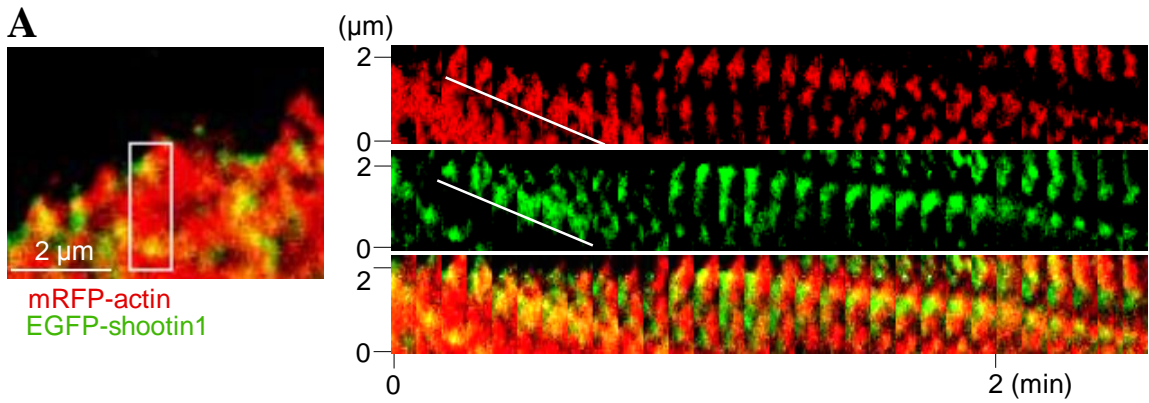


図24. クラッチメカニズムによる効率の良い化学的なシグナル-力の変換機構  
 Netrin-1シグナルにより活性化されたRac1/Cdc42がPak1を活性化する。活性化されたPak1によりShootin1はリン酸化される。Shootin1のリン酸化によりShootin1とL1およびShootin1とCortactinの2ヶ所同時に結合が促進される。この2ヶ所同時の結合促進によりアクチン線維の移動の力が細胞接着分子L1に効率良く伝わる。



**補足図1. XTC細胞におけるEGFP-shootin1(1-125)の蛍光スペckルの観察**

EGFP-shootin1 (1-125) およびmRFP-actin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 (図B)。ポジティブコントロールとしてEGFP-shootin1を用いた (図A)。タイムラプスイメージは5秒間隔で撮影した。白枠で囲った領域におけるキモグラフを図AとBの右側にそれぞれ示した。