

様 式 C - 7 - 1

平成 2 4 年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 基盤研究(B) 4. 補助事業期間 平成 2 3 年度 ~ 平成 2 5 年度
5. 課題番号

2	3	3	7	0	0	8	8
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題 アクチン線維の重合・脱重合による遅い軸索輸送の新しい分子機構

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
2 0 2 2 3 2 1 6	イナガキ ナオユキ 稲垣 直之	バイオサイエンス研究科	准教授

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

本研究は、遅い神経軸索輸送の分子機構の解明を目指す。速い軸索輸送は、微小管上を動くキネシンファミリータンパク質によってなされることが解っているが、遅い軸索輸送（Slow component b）の分子機構は未だ不明である。本研究では、Slow component bがアクチン線維の重合・脱重合とShootin1のクラッチ作用を介して起こることを示唆する応募者らの予備データを基盤として、その分子メカニズムに迫る。

クラッチ機構では、前方方向に重合してゆくアクチン繊維の進行を力学的に支えるために、Shootin1とL1-CAMを介して細胞外基質に対して進行方向と反対向きの力がかかると考えられる。そこでこの力を定量するために、蛍光ナノビーズを包埋したゲル上に神経細胞を培養し、力によって生じたゲルの歪みをビーズの変位として計測した。その結果、アクチン繊維の進行に伴う方向性を持った力を検出することに成功した。

また、分子クラッチが実際にWave1によるアクチンの輸送を担うのであれば、アクチン線維の細胞外基質へのつなぎ止めを弱めた場合は、Wave1によるアクチンの輸送が遅くなり、逆にこのクラッチ効率を促進すればアクチンの輸送が早まるはずである。前年度までの研究により、RNAiでShootin1の発現量を抑制し、アクチン繊維を空回りさせた場合にアクチン輸送が実際に遅ることが確認されている。そこで、にShootin1を過剰発現してクラッチ効率を強めた際のアクチン輸送の速度の変化を調べた。その結果、アクチン輸送の速度が有意に上昇することが明らかとなった。

以上の結果により、Shootin1の分子クラッチがWave1によるアクチンの輸送を担う可能性がさらに高まった。

10. キーワード

- | | | | |
|----------|------------|--------------|------------|
| (1) 脳・神経 | (2) 発生・分化 | (3) 神経科学 | (4) 軸索輸送 |
| (5) 細胞骨格 | (6) 分子クラッチ | (7) Shootin1 | (8) アクチン線維 |

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

現時点で、「神経軸索輸送Slow component bがアクチン線維の重合・脱重合とShootin1のクラッチ作用を介して起こる」という我々のモデルを支持する実験データが順調に揃ってきているため。また、次年度(最終年度)中に研究成果を学術誌に投稿することが可能と考えられるため。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

1) アクチン線維の移動を介したアクチン結合タンパク質の軸索輸送の解析:
 前述のように、アクチン線維は、アクチン線維結合タンパク質群を輸送する足場として機能し、アクチン線維の移動とともに、数多くのアクチン結合タンパク質も同時に輸送される可能性がある。そこでCortactin, Coronin1B, Ezrin, Fascin等のアクチン結合タンパク質のEGFP融合タンパク質を培養海馬神経細胞に発現させてRFP-actinとともにライブイメージングを行う。その際、前年度の実験で用いた、アクチン線維の細胞外基質へのつなぎ止めを弱める(アクチン線維を空回りさせた場合)あるいはこのクラッチ効率を増強させる操作を行う。そして、アクチン結合タンパク質の輸送速度がアクチン線維の移動速度の変化に応じてどのように変化するかを解析することにより、アクチン結合タンパク質群がアクチン線維と相互作用しつつ輸送される可能性を検証する。

2) 数理モデルを用いたアクチン輸送メカニズムの解析:
 最後に、以上の実験データを組み入れて、アクチン線維の重合・脱重合とクラッチメカニズムによって起こる軸索輸送の数理モデルを構築する。応募者らはこれまでにアクチン線維の重合・脱重合とShootin1のクラッチメカニズムによって起こる軸索伸長のモデル化に成功しており(Toriyama et al, Mol Sys Biol 2010)、これを基盤としてモデル構築を行う。そして、モデル上で前年度の実験で用いたクラッチの減弱や増強させる操作を行う。予想外の結果が出た場合は、臨機応変にモデルを実験データに合わせて変更しつつモデルの検証を行う。モデルによるシミュレーションで予想されるデータが実験データと一致すれば、アクチン線維の重合・脱重合とShootin1の分子クラッチによるアクチン輸送機構をサポートする重要な根拠となる。

13.研究発表(平成24年度の研究成果)

〔雑誌論文〕計(1)件 うち査読付論文 計(1)件

著者名	論文標題【掲載確定】			
吉田互, 鳥山道則, 稲垣直之	プロテオミクスを基礎にした神経細胞が非対称性を獲得する機構の解析			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
生物物理化学	有	56:31	2012	1-4
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)				
10.2198/sbk.56.1				

〔学会発表〕計(6)件 うち招待講演 計(1)件

発表者名	発表標題【発表確定】	
Kubo, Y., Toriyama, M., Kozawa, S., Ikeda, K., Sugiura, T. and Inagaki, N.	Cortactin functions as a clutch molecule to promote axon outgrowth	
学会等名	発表年月日	発表場所
International Symposium on "Sensory Systems and Neural Circuits"	2013年02月11日	東京大学本郷キャンパス

発表者名	発表標題【発表確定】	
Kubo, Y., Toriyama, M., Kozawa, S., Ikeda, K., Sugiura, T., and Inagaki, N.	Cortactin functions as a clutch molecule to promote axon outgrowth	
学会等名	発表年月日	発表場所
2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology	2012年12月16日	San Francisco, USA

発表者名	発表標題【発表確定】	
Katsuno, H., Toriyama, M., Sakumura, Y., Ikeda, K. Mizuno, K., and Inagaki, N.	Slow axonal transport driven by directional actin treadmilling	
学会等名	発表年月日	発表場所
2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology	2012年12月18日	San Francisco, USA

発表者名	発表標題【発表確定】	
Inagaki, N.	Mechano-systems biological analysis of neuronal polarity formation	
学会等名	発表年月日	発表場所
ドイツ生化学分子生物学会 (GBM) Perspectives in Molecular Neurobiology (招待講演)	2012年09月14日	Bochum, Germany

発表者名	発表標題【発表確定】	
Katsuno, H., Toriyama, M., Sakumura, Y., Ikeda, K., Mizuno, K., and Inagaki, N.	Slow axonal transport driven by directional actin treadmilling of anchored actin filaments	
学会等名	発表年月日	発表場所
第35回 日本神経科学大会	2012年09月19日	愛知県名古屋市

発表者名	発表標題【発表確定】	
Kubo, Y., Toriyama, M., Kozawa, S., Ikeda, K., Sugiura, T., and Inagaki, N.	Cortactin functions as a clutch molecule to promote axon outgrowth	
学会等名	発表年月日	発表場所
第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会	2012年05月29日	兵庫県神戸市

〔図書〕計(1)件

著者名	出版社	
久保祐亮, 稲垣直之	CRMP2	
書名【発行確定】	発行年	総ページ数
脳科学辞典(田中啓治, 御子柴克彦 編)	2 0 1 2	インターネットのみにて公開

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

Inagaki Lab 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 神経形態形成学研究室
http://nippon.naist.jp/inagaki_g/