

## 研究課題別評価

### 1. 研究課題名 神経細胞が極性を獲得する機構

### 2. 研究者氏名 稲垣直之 (奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)

### 3. 研究の狙い:

神経細胞は、1本の軸索と複数の樹状突起を有し神経極性を形成する。神経極性は、神経細胞の基本的な機能であるシグナルの入出力や統合に重要な役割を果たすにも関わらず、その形成および維持の分子機構は未だよくわかっていない。本研究の目的は、神経細胞の極性形成に関わる分子群を同定し機能解析を行うことにより 神経極性形成・維持の分子ネットワークを明らかにすることである。

### 4. 研究結果:

#### I) CRMP-2 の軸索形成作用の解析

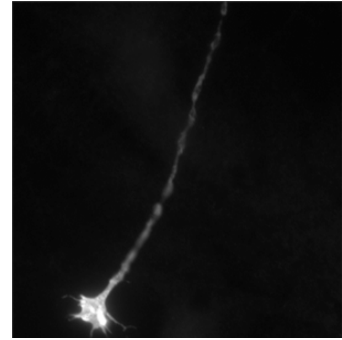
- 1) 培養海馬神経細胞の軸索形成を担う分子のひとつとして Collapsin response mediator protein 2 (CRMP-2)を見いだし、これが細胞内で微小管の重合促進を介して作用することが明らかとなった。
- 2) 大阪市立大学、木山博教授との共同研究により、ラット舌下神経が再生の過程で CRMP-2 を高レベル発現すること、またアデノウイルスを用いて CRMP-2 を切断後のラット舌下神経に遺伝子導入すると神経再生の速度が上昇することがわかった。

#### II) プロテオミクスを用いた神経細胞の極性形成に関わる分子群の網羅的同定

- 1) 神経極性形成分子群の網羅的検出のために、高解像度二次元電気泳動法を確立した。確立した二次元電気泳動法は 93 cm x 103 cm の巨大ゲルを用いたシステムで、通常の約5倍の1万個以上のタンパク質スポットを検出することが可能となった。また、質量分析法による高感度タンパク質同定のためのタンパク質前処理法および消化法を確立した。以上により本研究での高感度のプロテオミクスを用いた神経極性形成分子群の解析が可能となった。
- 2) 確立した高解像度二次元電気泳動システムを用いてラット培養海馬神経細胞の軸索あるいは樹状突起・細胞体に濃縮するタンパク質のディファレンシャル解析を行った。その結果、培養海馬神経細胞に発現するタンパク質 5,164 個のうち4%にあたる200個のタンパク質が軸索、27%にあたる 1,414 個のタンパク質が樹状突起・細胞体に濃縮することがわかった。これら200個の軸索に濃縮するタンパク質スポットのうち82個のタンパク質を質量分析装置を用いて同定した。
- 3) 同様の二次元電気泳動解析により、海馬神経細胞に発現するタンパク質 6,197 個のうち4.5%にあたる277個のタンパク質が、神経極性形成に伴って発現量が上昇することが明らかとなった。またこれらのうち92個のタンパク質を質量分析装置を用いて同定した。

### III) プロテオミクスで同定された分子の機能解析

1) 以上の研究から特に興味深い分子として、1個の新規タンパク質が同定された。この分子は CRMP-2 と同様に軸索に濃縮するのみならず神経細胞の極性形成にもなって発現が上昇することがわかった。また、Myc タグを付加した遺伝子を発現させて細胞内局在を調べたところ神経軸索の先端部の成長円錐に強く濃縮していた (図)。



2) 神経軸索に濃縮するものとして同定された分子の中には RNA 結合タンパク質、翻訳終結因子等のタンパク質の翻訳に関与する分子が含まれていた。また、実際に軸索で局所的に翻訳合成を受ける 12 個のタンパク質を検出した。

#### 5. 自己評価：

本研究ではまず細胞内タンパク質 CRMP-2 に軸索形成活性を見だし、その分子作用機構の解析を行った。続いてプロテオームの手法を用いた新規極性形成分子の同定に挑戦した。実際にプロテオーム解析を行ってみると、一般に行われていた手法には、2次元電位泳動法で検出できるタンパク質数が少なすぎる、あるいは質量分析法でのナノグラムレベルの微量タンパク質の同定が実際には困難である等の問題点が存在することがわかった。そこでプロテオーム解析法を自ら改良せざるを得ず、予想以上に時間がかかった。しかし最終的には研究期間内にいくつかの興味深い分子を同定することができ、神経細胞のかたち作りの分野に今後新たな知見を見出す基盤づくりができたものと安堵している。今後は、軸索成長円錐に濃縮する新規タンパク質と軸索で局所的に翻訳合成を受けるタンパク質に焦点を絞って解析を進めていく予定である。今後は、本研究をしっかりと発展させていく責任を強く感じる。

#### 6. 研究総括の見解：

本研究に着手して間もなく、上司(教授)の転出に伴い研究計画の大幅な、また不測の変更を強いられた。したがって、CRMP-2 の濃縮機構に関する当初の研究計画を推進することが不可能となった。しかし、アドバイザーや他の研究者の示唆や助言を十分に生かし、二次元電気泳動による目標タンパク質の探索に独自の方法的工夫をこらして、当初の危惧を見事に克服し、最終的には幾つかの興味深い標的タンパク質の検出分離に成功した。この成果は今後の研究の飛躍的發展を基礎付けるものとして高く評価する。

#### 7. 主な論文等：

主な論文：

1. Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M., and Kaibuchi, K. (2001) CRMP-2 Induces Axons in Cultured Hippocampal Neurons. *Nature Neurosci.* 4, 781-782.
2. Taya, S., Inagaki, N., Sengiku, H., Makino, H., Iwamatsu, A., Urakawa, I., Nagano, K., Kataoka, S., and Kaibuchi, K. (2001) Direct Interaction of Insulin-like growth factor-1 receptor with leukemia-associated RhoGEF. *J. Cell Biol.* 155, 809-819.

3. Canossa, M., Gartner, A., Campana, G., Inagaki, N., and Thoenen, H. (2001) Regulated secretion of neurotrophins by metabotropic glutamate group I (mGluRI)- and Trk-receptor activation is mediated via phospholipase C signaling pathways, *EMBO J* . 20, 1641-1650.
4. Oguri, T., Takahata, I., Katsuta, K., Nomura, E., Hidaka, M., and Inagaki, N. (2002) Proteome analysis of rat hippocampal neurons by multiple large gel two-dimensional electrophoresis, *Proteomics* 2, 666-672.
5. Inagaki, N., Katsuta, K., Nomura, E., Ueda, T., Toriyama, M., and Mori, T. (2002) High resolution large gel two-dimensional electrophoresis for proteomics, *BIOforum Int.* 6, 324-325.
6. Fukata Y., Itoh T.J., Kimura T., Menager C., Nishimura T., Shiromizu T., Watanabe H., Inagaki, N., Iwamatsu A., Hotani H., Kaibuchi K. (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly, *Nature Cell Biol.* 4, 583-591.
7. Suzuki, Y., Nakagomi, S., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., Inagaki, N., Kaibuchi, K., Aizawa, H., Kikuchi, K., and Kiyama, H. (2003) Collapsin response mediator protein-2 accelerates axon regeneration of nerve-injured moter neurons of rat, *J. Neurochem.* 86, 1042-1050.
8. Inagaki, N. and Katsuta, K. (2004) Large gel two-dimensional electrophoresis: improving recovery of cellular proteome, *Curr. Proteomics*, in press.
9. Nomura, E., Katsuta, K., Ueda, T., Toriyama, M., and Mori, T. and Inagaki, N., (2004) Acid-labile surfactant improves in-solution dodecyl sulfate polyacrylamide gel protein digestion for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide mapping, *J. Mass Spectrometry*, in press.

#### その他 :出版物

1. 稲垣直之、貝淵弘三 (2001) CRMP-2 は海馬神経細胞の軸索形成を誘導する、*細胞工学* 20 (10) 1408-1409.
2. 有村奈利子、稲垣直之、貝淵弘三 (2001) CRMP-2 による神経極性形成の制御機構、*実験医学*.19 (17) 2309-2311.
3. 稲垣直之、貝淵弘三 (2001) 神経細胞の軸索および極性形成の分子機構、*生体の科学* 52 (3) 230-234.
4. 深田優子、稲垣直之、貝淵弘三 (2001) 神経細胞の極性 神経軸索と樹状突起の運命決定、*細胞工学* 20 (4) 520-529.
5. 稲垣直之 (2002) 細胞内の空間シグナル、*細胞工学* 21 (4) 345.
6. 稲垣直之 (2002) 高解像度ラージゲルを用いた二次元電気泳動法による細胞内発現蛋白質の網羅的検出、*実験医学* 20 (1) 85-88.
7. 稲垣直之 (2003) ポストシナプス 樹状突起スパインにおけるCaMKII の空間的シグナリング、*生体の科学* 54 (2) 90-96.
8. 稲垣直之、稲垣昌樹、単一スパインにおけるCaMKIIシグナリングの可視化 (2003) *動くシナプスと神経ネットワーク* (塩坂貞夫 編) 金芳堂、p103-110
9. 勝田和大、野村英子、稲垣直之 (2003) Multiple Large gel two-dimensional electrophoresis for proteomics, *J. Electrophoresis* 47, 27-31.

#### 招待講演

1. 稲垣直之、貝淵弘三、CRMP-2 による神経細胞の軸索形成およびガイダンス機構、
2. 第 74 回 日本生化学会大会シンポジウム、(2001) 京都
3. 稲垣直之、神経軸索と神経極性形成のメカニズム、第 6 回 「神経科学領域における分子モニタリング」シンポジウム、(2001) 松山
4. 稲垣直之、高解像ラージゲルを用いた二次元電気泳動法による細胞内発現タンパク質の網羅的検出、第 52 回 日本電気泳動学会シンポジウム 「プロテオミクスの最前線」、(2002) 東京

#### Plenary Session

1. Inagaki, N., Katsuta, K., Nomura, E., Ueda, T., Toriyama, M., and Mori, T., High resolution two-dimensional gel electrophoresis with huge gels, Proteomic Forum 2003, Munich, Germany (September 14-17, 2003).