

FILIP相同分子の機能解析による神経系発生の解析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2010-11-17 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 八木, 秀司 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/2774

FILIP 相同分子の機能解析による神経系発生の解析

研究代表者：八木 秀司（医学部、准教授）

電話：0776-61-8305、メールアドレス：yagi@fukui-u.ac.jp

概 要	
	<p>本教室では FILIP 遺伝子欠損マウスを作製し FILIP 分子の生体内の機能を解析しているが、FILIP 分子には FILIP 相同分子が存在し、相互に影響を及ぼしている可能性があることが判明した。そこで、アクチン線維に局在する FILIP 分子及びその相同分子に結合する共通の分子を検索した。その結果、FILIP 分子及び FILIP 相同分子はミオシンファミリーの一分子と結合していることを、免疫沈降法により明らかにした。また、FILIP 分子を強制発現することにより細胞内のミオシンの分布に影響を及ぼし、アクチンの形態に変化を生じることを見いだした。アクチン・ミオシンは細胞形態に関与することから、FILIP 遺伝子欠損マウスの大脳皮質神経細胞の形態を検討したところ、神経細胞に形態異常が存在することを見いだした。</p>
関連キーワード	<p>アクチン、FILIP、FILIP 相同分子、神経細胞、ミオシン</p>

研究の背景

細胞移動では、時空間的に細胞骨格は制御されている。移動方向に形成された葉状仮足内の架橋されたアクチン線維は分解され、移動方向の前方にアクチン線維が新規に形成される。この細胞骨格の調節はアクチン線維と相互作用する分子がコントロールしている。当研究室では、神経発生時の神経細胞移動に関わる機構の解明に向けて、FILIP 分子を研究対象としてきた。そして FILIP 分子はアクチン結合蛋白である Filamin の分解を促進することにより細胞移動を抑制することを永野らが報告した。この結果はアクチン線維の制御機構が神経細胞の移動においても重要であることを示している。しかしながら、我々は、こ

の FILIP 分子の生体内の機能を解析するため遺伝子欠損マウスの作製し検討してきたが、予想される表現型とは異なる表現型が認められており、未だに不明な点がある。この理由として FILIP 分子に相同分子が存在し、その相同分子もアクチン線維の制御に関与し、FILIP 遺伝子欠損マウスの表現型に影響を及ぼしている可能性があると考えられた。実際に、データベース検索により、FILIP 分子と高い相同性を持つ FILIP 相同分子が存在していた。この FILIP 相同分子と FILIP 分子の機能解析が発生期における発達の解析に重要であると考えられる。

研究の目的

FILIP および FILIP 相同分子により、細胞骨格がどのように制御されているか明らかにしていくことを通じ、神経細胞の発生に関わる細胞移動、さらに神経細胞の形態を含め新たな知見を得ることを目的としている。FILIP 分子は Filamin 分子と結合し、その分解を促進することが知られている。さらに生体内での機能を明らかにする目的で FILIP 遺伝子欠損マウスを作製し解析を行ってきたが、予想される表現型とは異なる表現型を有しており、FILIP 分子の機能を補完する分子が存在する可能性があると考えられた。その可能

性のある分子として FILIP 分子と相同性の高い分子 LUZP および FILIP1L が存在することがデータベース上の検索にて判明した。FILIP 分子および FILIP 相同分子の両方が共通に結合する分子を通じて、その機能が補完されている可能性を考えた。そこで、FILIP 分子および FILIP 相同分子に結合する分子の探索をおこなった。今回、共通の結合分子を同定し、FILIP 分子及びその相同分子の機能を解明することを目的として、実験を計画した。

研究成果

FILIP 分子および FILIP 相同分子と結合する分子の探索

FILIP 相同分子 LUZP の細胞内分布より、LUZP はアクチン線維、特にストレスファイバーに局在しており、ストレスファイバーを構成する蛋白と結合する可能性が高いことが判明した。そこで培養細胞 COS-7 細胞に FLAG タグを付けた LUZP 分子を強制発現し、免疫沈降を行った。その結果、LUZP と細胞内に存在する内在性のミオシンファミリーの一分子が結合することが明らかとなった。このミオシンファミリー分子は細胞の移動、細胞分裂、神経細胞のシナプス形成など、各種細胞の機能に関わっていることが知られている。

このミオシンファミリー分子と FILIP 分子も結合する可能性が高いと考え、免疫沈降法を用いて、この二つに分子の結合を検討した。COS-7 細胞に FLAG タグを付けた FILIP 分子を強制発現し、免疫沈降を行ったところ、細胞内に存在する内在性のミオシンファミリー分子と結合することが明らかとなった。

FILIP 分子とミオシンファミリー分子との関係

次に FILIP 分子がミオシンファミリー分子に及ぼす影響を明らかにするため、培養細胞を用いて検討を行った。その結果、FILIP 分子の強制発現を行うと、細胞質内のミオシンファミリー分子の分布がコントロールと比較し異なることを見いだした。ミオシンファミリー分子の分布はアクチン線維と一致することが知られているが、FILIP 分子の強制発現により、細胞質内では繊維状の分布から、細かいドット状にミオシンファミリー分子の分布が変化した (図 1)。また、培養細胞内のストレス線維の構成成分であるミオシンファミリー分子の分布が変化するから、細胞内のストレス線維の分布が変化することが期待された。そこで、ファロイジンを用いてアクチン線維を可視化し、FILIP 分子を強制発現した細胞内のアクチン線維の分布を検討した。その結果、ストレスファイバーと考えられるアクチン線維を有する細胞が減少していることが明らかになった。

FILIP 分子欠損における生体内での影響

FILIP 分子の神経細胞内での分布を検討するため、FLAG タグを付けた FILIP 分子を初代培養神経細胞内に発現させた。抗 FLAG 抗体を用いた細胞免疫染色にて、FILIP 分子の分布を検討した結果、細胞周囲及び神経突起内の基部に近い部分に存在することが明らかとなった。この結果より、FILIP 分子の機能を欠損した場合、ミオシン及びアクチンに影響を及ぼし、神経細胞の形態に影響を及ぼす可能性があると考えた。

そこで、DiI を用いて FILIP 遺伝子欠損マウス的大脑皮質の細胞の形態を可視化し、検討した。その結果、生後まもなくの時点では、交連線維を伸ばしている神経細胞の形態に異常を認めた。特に頂上突起の基部に近い部位が、正常と比較し、細くなっている像を得た。

以上のより、FILIP 分子と FILIP 相同分子は、ミオシンファミリー分子の動態を制御することにより、細胞形態に影響を与えていると考えている。

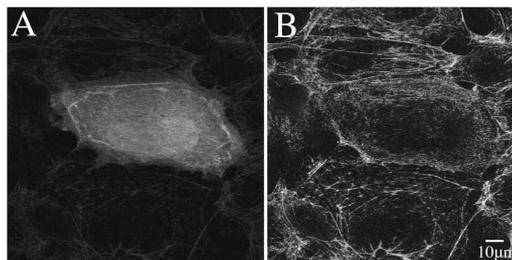


図 1. FILIP 分子強制発現によるミオシンファミリー分子の分布変化

COS-7 細胞に FILIP 分子を強制発現し、抗ミオシン抗体を用いて、細胞内ミオシンの分布を検討した。A は FILIP 分子が発現している細胞を示す。B はミオシンファミリー分子の分布を示す。FILIP 分子を発現している細胞では、ミオシンファミリー分子の分布が線維状にはならず、細かいドット状に見える。

特記事項・発表論文など

「特記事項」

本研究に関しまして、本教室の佐藤真教授、および教室の皆様の様々なご指導、御協力をいただきました。この場をお借りいたしまして、お礼申し上げます。

「本研究に関わる発表論文」

Yagi, H., Noguchi, Y., Kitamura, K., Sato, M. Deficiency of Vlg1 resulted in deafness and susceptibility to audiogenic seizures while the degree of hearing impairment was not correlated with seizure severity in C57BL/6- and 129-backcrossed lines of Vlg1 knockout mice. *Neurosci Lett.* 18; 461(2): 190-195.