

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2009
課題番号：19770196
研究課題名（和文）新規神経ガイダンス分子 Draxin 受容体の固定とその機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of Receptor for Draxin, a repulsive guidance protein

研究代表者

新明 洋平（SHINMYO YOHEI）

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号：00418831

研究成果の概要：

本研究では、cDNA ライブラリーの発現スクリーニングにより新規ガイダンス分子 Draxin 受容体の同定を試みた。FACS を用いた発現スクリーニングを行ったが、受容体のクローニングには至らなかった。一方、既知の受容体タンパクからのスクリーニングを行った(candidate approach)結果、Draxin と強く結合する膜タンパクを見出した。現在、この分子が真に Draxin 受容体であるかどうかを詳細に解析している。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物学科・発生生物学

キーワード：細胞認識、新規神経ガイダンス分子、受容体、脊髄発生

1 . 研究開始当初の背景

脳では膨大な数の神経細胞がそれぞれ適切な位置に配置され、非常に精密な神経回路網を形成しており、記憶、学習、行動などの機能に重要な役割を果たしている。これらの神経回路網形成には、様々な細胞外神経ガイダンス分子が担う細胞間の相互作用が必須であると考えられる。

我々のグループは、このような細胞間相互作用に機能する分子を探索するため、膜蛋白質や分泌蛋白質の cDNA を選択的にクローニングするシグナルシーケンストラップ法を用いて、分子探索を行ってきた。その結果、ニワトリ胚やマウス胚の脳から脊髄にいたる中枢神経系の背側に発現し、既知のガイダンス分子とは全くホモロジーの無い反撥性の新規神経ガイダンス分子を見出し、Draxin (Dorsal repulsive axon guidance protein) と命名した。本研究では発現クローニングによる Draxin 受容体の同定を試みる。

Draxin分子とその神経ガイダンス機能は世界に先駆けて我々が発見した。Draxin分子と同様にその受容体もまた新規分子の可能性があるため、Draxin受容体の同定及びその機能解析は極めて新規性と独創性の高い研究であると考えられる。脊髄交連神経の軸索ガイダンスの研究は神経回路形成のモデルとして最も盛んに研究されている系の一つであるが、未だ完全には分子機構が解明されていない。従って、ここに提案する研究により、脊髄交連神経の軸索ガイダンスにおいてDraxin及びその受容体の役割を解明できれば、交連神経軸索成長の floor plate までの成長機構が完結し、神経回路形成機構の解明に新たな局面をもたらす事ができると考えられる。

2 . 研究の目的

レトロウイルスを用いたcDNAライブラリーの発現スクリーニングを行い、Draxin受容体の同定を目指す。本研究では、Draxin受容体の同定と脊髄交連神経の軸索形成過程におけるDraxin受容体の役割の解明を目的とする。脊髄交連神経細胞の軸索成長において、floor plateから分泌される netrinが軸索を誘引する活性をもつ分子として発見された。その後、Deleted in Colorectal Cancerがnetrin受容体である事が報告され、さらに、それらのノックアウトマウスでは脊髄交連神経線維の走行が異常になる事が示された。また、floor plateからの誘引因子とは相反して、roof plateから分泌されるBMP 7, GDF7が軸索成長に反撥性因子として機能する事がこれら遺伝子のダブルノックアウトマウスを用いた研究などから明らかにされた。非常に興味深い事に、このノックアウトマウスのroof plateは、交連神経に対してなおも反撥作用を示すことから、新たに別の反撥因子(X)の存在が示唆されている。我々が発見したDraxinは、その発現パターンと軸索伸長に対する反撥活性から、このX分子の候補であると考えられる。

3 . 研究の方法

(Draxin 蛋白質のビオチン化とその活性検定)

精製した Draxin 蛋白質のビオチン化を ECL protein Biotinylation Module (GE ヘルスケア)を用いて行う。さらに、このビオチン化

Draxin 蛋白質を精製した後、神経軸索成長の阻害活性が保持されているかどうかを調べる。活性の保持されたビオチン化 Draxin 蛋白質を用いて、以下に示す binding assay 及び cDNA ライブラリーのスクリーニングを行う。

(ビオチン化 Draxin 蛋白質を用いた binding assay)

Draxin 蛋白質の脊髄組織片の軸索成長に対する阻害活性は、これらの細胞への受容体を介した結合により発揮されると考えられる。脊髄切片や脳切片にビオチン化 Draxin 蛋白質を加えインキュベートし、PBS で組織片を洗浄した後、蛍光標識したストレプトアビジンを用いて、Draxin 蛋白質の結合を検出する。これらの実験系を用いて、Draxin のその受容体発現細胞への結合を検出するための最適条件 (Draxin 蛋白質の添加量やインキュベーション時間など) を決定し、これらの条件をもとにライブラリーのスクリーニングを行う。

(cDNA ライブラリーの発現スクリーニング)
E3-4 ニワトリ胚脳と脊髄から mRNA を回収し、レトロウイルスベクターを用いて cDNA ライブラリーを作製した。cDNA を発現させたレトロウイルスを BaF3 細胞に感染後、ビオチン化 Draxin 蛋白質が結合する細胞を I-Magnet を用いて分離する。分離した細胞を数日間培養した後、再度、I-Magnet を用いてビオチン化 Draxin 蛋白質が結合する細胞を分離する。最終的に、これらの細胞集団から、Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) を用いて単一細胞をクローニングし、さらに培養した後、これらの細胞からゲノム DNA を抽出する。このゲノム DNA から PCR により増幅した Draxin 受容体候補 (Y) 遺伝子をクローニングし、シーケンス解析を行う。

4 . 研究成果

ビオチン化 Draxin を調製し、このタンパク

に反撥活性がある事を in vitro の培養系を用いた実験により明らかにした。次に、ビオチン化 Draxin タンパクの脳や脊髄組織への結合性を調べた。その結果、これらの Draxin タンパクが大脳や脊髄交連線維などの神経軸索に特異的に結合することがわかった。これらの結果から、Draxin 受容体が一部の神経細胞に発現する事とビオチン化 Draxin タンパクが発現スクリーニングに有用である事がわかった。これらの結果をもとに、発現スクリーニングを行った。

cDNA ライブラリーをレトロウイルスを用いて BaF3 細胞に安定的に導入し、それらの BaF3 細胞にビオチン化 Draxin タンパクを反応させた。その後、ビオチン化 Draxin タンパクが結合した BaF3 細胞を FACS を用いて選別し、培養した。結合する細胞は一定の割合で存在するものの、陽性の単離細胞の増殖が著しく悪いために、陽性細胞を安定的に維持する事ができなかった。この事は、Draxin が BaF3 細胞の増殖を負に制御する可能性が考えられ、この方法によるスクリーニングが困難であると考えられた。

そこで、既知の受容体タンパクからのスクリーニングを行った(candidate approach)。その結果、Draxin と強く結合する膜タンパクを見出した。現在、この分子が真に Draxin 受容体であるかどうかを、この膜タンパクのノックアウトマウスの脊髄や脳組織片に対する Draxin の反撥活性が保持されているかどうかを調べる事により解析している。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Islam SM#, Shinmyo Y#, Okafuji T, Su Y, Naser IB, Ahmed G, Zhang S, Chen S, Ohta K,

Kiyonari H, Abe T, Tanaka S, Nishinakamura R, Terashima T, Kitamura T, Tanaka H.

These authors contributed equally to this work.

Draxin, a repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures.

Science.2009, 323,388-93. 査読の有

新明洋平、田中英明 反撥性ガイダンス分子 draxin は脊髄と大脳の交連線維形成に必須である 実験医学 Vol. 27 No.9 (6月号):1376-1379 (2009)

〔学会発表〕(計 2 件)

新明 洋平 A Novel repulsive Axon Guidance Protein, Draxin 日本発生物学会第 41 回大会 2008 年 5 月 28 日-5 月 30 日 徳島

新明洋平 マウス脳発生過程における新規ガイダンス分子 Draxin の役割 日本発生物学会第 40 回大会 2007 年 5 月 28 日-5 月 30 日 福岡

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

新明 洋平 (SHINMYO YOHEI)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教
研究者番号 : 00418831

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者