

## 細胞が非対称性を獲得する原理の分子レベルおよび数理・数式レベルでのモデル構築

●稲垣 直之 ◆島田 忠之

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

### <研究の目的と進め方>

組織や細胞は発生・分化に伴って非対称性（極性）を獲得して固有の形態を形づくる。生体がゲノム情報を用いてどの様にして非対称性を獲得するかという問題は、生物学および数理科学分野における重要な研究テーマである。

神経細胞は、培養条件下で細胞自立的に1本の軸索と複数の樹状突起を形成し細胞極性を獲得する(self-organized symmetry breaking)。また、いったん極性を獲得した神経細胞の軸索を切断して極性を失わせると、再び複数の突起のうち1本のみが急激に伸びて軸索となり、神経極性の再獲得がおこる。従って、神経極性形成の過程は強固(robust)なシステムであると考えられる。このように、対称な神経細胞にいかにして非対称性が生じるかという点は謎である。

我々は、これまでの大規模なプロテオーム解析により、軸索に存在するタンパク質群を網羅的にスクリーニングし、神経極性形成タンパク質 Shootin1 を見出した。本研究では、Shootin1 の実験計測データを条件とした自立的に極性を獲得することができるモデルニューロンの構築を行う。そして、数理解析の結果を実験科学にフィードバックして研究を推進するアプローチを通して、細胞が非対称性を獲得するしくみの原理を分子レベルおよび数理・数式レベルで解き明かすことを目指す。

### <2007年度の研究の当初計画>

我々は、昨年度までの研究で、ラット培養海馬神経細胞の極性形成に伴う Shootin1 の細胞内挙動を計測し、以下のデータを得ている。

- i) 神経極性形成に伴う Shootin1 の発現上昇
- ii) 神経突起先端における Shootin1 の濃縮に伴う神経突起伸長
- iii) Shootin1 の細胞体から神経突起先端への能動輸送
- iv) Shootin1 の神経細胞内での拡散

また、コンピュータを用いて1つの細胞体と5本の神経突起からなる基本モデルニューロンを構築し、上述の4つ(i-iv)の実験計測データを条件として組み入れると、このモデルニューロンは培養ニューロン同様に自立的に1本の軸索を形成して極性を獲得した。以上の結果から、基本モデルニューロンが概ね正しく神経極性形成を再現できると考えられた。

そこで、本年度は

- 1) 上述(i-iii)の、より詳細な定量的データを取得する。
- 2) (iii-iv)より、Shootin1 がより長い突起に濃縮しやすいことが予想されるが、これを実験的に証明する。これによって Shootin1 がポジティブフィードバックループを形成することによって神経細胞の非対称性を獲得を引き起こす実験的な根拠を得る。
- 3) 1) の定量データを基にした完成型のモデルニューロンを構築する。
- 4) iii) の Shootin1 による神経突起伸長の分子メカニズムを解明する。

を目標に研究を進めた。以上の研究により、神経細胞が非対称性を獲得するしくみの原理が分子レベルおよび数理・数式レベルで明かとなることが期待される。

### <2007年度の成果>

#### 1) 神経極性形成に伴う Shootin1 の発現上昇の定量的計測

神経極性形成に伴う Shootin1 の発現上昇に関して、培養海馬神経細胞における細胞あたりの Shootin1 発現量の定量的データをイムノプロット法によって計測した。神経細胞あたりの総タンパク質量が極性形成に伴う軸索の伸長とともに増加することを考慮して、 $\gamma$ -tubulin を標準化のマーカータンパク質として用いた。神経細胞あたりの Shootin1 発現量は、極性形成がおこる培養12-84時間の間に急激に上昇がおこり、それ以降はほぼ一定値を取ることがわかった。

#### 2) 神経突起先端における Shootin1 の濃縮が引き起こす神経突起伸長の定量的計測

神経突起先端における Shootin1 の濃縮に伴う神経突起伸長に関して、EGFP-shootin1 の神経突起先端における蛍光量と神経突起伸長をタイムラプス計測することにより定量化した。また、赤色の蛍光色素タンパク質 mRFP を共発現して同時に計測することにより、EGFP-shootin1 の相対濃度を算出した(EGFP-shootin1/mRFP)。その結果、神経突起の伸長スピードは、神経突起先端における Shootin1 の濃度上昇に伴ってS字状の曲線を描いて上昇することがわかった。

#### 3) Shootin1 の細胞体から神経突起先端への能動輸送の定量的計測

Shootin1 の細胞体から神経突起先端への能動輸送は、EGFP-shootin1 の神経突起シャフトにおける輸送をタイムラプス計測することによって測定した。その結果、Shootin1 は塊となって stochastic に細胞体から神経突起先端へと運ばれることがわかった。また、塊となって細胞体から輸送される Shootin1 の量は、細胞体の Shootin1 の濃度上昇とともに増加することがわかった。

#### 4) Shootin1 がポジティブフィードバックループを形成することの実験的証明

次に、Shootin1 がより長い突起に濃縮しやすいという仮説の証明を行った。まず、神経突起先端から細胞体への Shootin1 の拡散による移動を、紫外線によって赤色に変色した Kaede-shootin1 の蛍光をタイムラプス計測することにより測定した。その結果、予想通り Shootin1 が拡散によって細胞体に戻るのに長い突起ほど長い時間を要することがわかった。また、軸索切断とその後の Shootin1 の軸索断端への濃縮を免疫細胞染色によって解析したところ、Shootin1 がより長い突起に濃縮しやすいということが証明された。さらに、神経突起の長さと同様の結論が得られた。以上の結果から、Shootin1 の神経突起への濃縮が突起伸長を引き起こし、その結果伸長した突起により Shootin1

が濃縮されるというポジティブフィードバックループが実験的に証明された (図1)

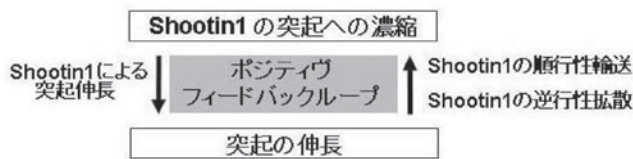


図1

#### 5) Shootin1 による神経突起伸長の分子メカニズム

Shootin1 の1分子計測とレーザーピンセットを用いた研究により、Shootin1 が神経突起先端でおこるアクチンフィラメントの逆行性移動および細胞接着因子と相互作用することによって神経突起伸長に必要な牽引力を生み出すことがわかった。

#### 6) 完成型のモデルニューロンの構築

本年度に得られた Shootin1 の詳細な定量的データを用いて完成型のモデルニューロンを構築した。培養神経細胞と極めてよく似た自立的な極性形成を起こすニューロンの構築にほぼ成功した。現在、いくつかのパラメータに関してさらに詳細な数値の調整中である。

#### 7) 基本モデルニューロンを用いたモデルの検証

以上の研究成果に加えて、昨年度までに作成した基本モデルニューロンおよび培養ニューロンを用いて以下に示すような実験パラメータに変動を与えて、極性形成過程への影響を調べた：

- 神経極性形成過程で発現が上昇する Shootin1 の量を、通常量以下に低下させる。
- 極性形成過程で発現が上昇する Shootin1 の量を、通常量以上に増加させる。
- Shootin1 の突起先端への能動的な輸送を停止させる。

まず、神経極性形成過程で発現が上昇する Shootin1 の量を、通常量以下に低下させた場合、培養ニューロンも基本モデルニューロンもともに極性形成に遅れが生じた。

次に、極性形成過程で発現が上昇する Shootin1 の量を、通常量以上に増加させた場合は、培養ニューロンも基本モデルニューロンもともに過剰な軸索を形成して極性形成に乱れが生じた。

Shootin1 の突起先端への能動的な輸送を停止させた場合は、Shootin1 のポジティブフィードバックループ (図1) の形成に支障が生じると考えられる。予想通り、培養ニューロンも基本モデルニューロンもともに Shootin1 を1本の突起に濃縮させることができず、神経極性形成が阻害された。

以上、すべての条件下 (a-c) で培養ニューロンとモデルニューロンが一致した挙動を示したため、モデルニューロンが概ね正しく神経極性形成を再現することがさらに示唆された。

#### <国内外での成果の位置づけ>

細胞の非対称性獲得の原理として、局所シグナルのフィードバック増殖と側方抑制の数理モデル (Meinhardt and Gierer, *BioEssays* 22, 753, 2000) が提唱されてきた。すなわち、細胞がシグナルの小さな空間的勾配や確率論的 (stochastic) な揺らぎを増殖するシステムを持つことによって細胞極性を形成するという考えである。最近の出芽酵母 (Wedlich-Soldner et al., *Science* 299, 1231, 2003; Irazoqui, et al., *Nat Cell Biol* 5, 1062, 2003) や

白血球 (Xu et al., *Cell* 114, 201, 2003) を用いた研究は、このようなモデルで極性形成の説明を試みている。また、実験データと数理モデルを組み合わせようとする試みもなされている (Wedlich-Soldner et al., *Science* 299, 1231, 2003)。しかし、これらの研究でフィードバック増殖を起こすシステムは明確に同定されておらず、側方抑制のメカニズムも不明である。また、数理モデルも定性的なものにとどまっている。ごく最近、実験データと数理モデルを組み合わせる神経細胞の非対称性破壊の説明を試みる論文が発表されたが (*Curr Biol.* 18, 44-50, 2008)。しかし、このモデルは定性的なモデルであり、実験的に検証されていない重要な仮定を含んでいる。すなわち、「突起先端でのシグナルが上昇すると、そのシグナル分子の突起先端への輸送が高まる」という仮定が入っているが、このフィードバック増殖において決定的要素に関する実験的な検証が欠けている。

今回我々が構築したモデルニューロンは、ポジティブフィードバックが実験的に証明されているという点と、すべて定量的なデータに基づいて構築されているという点で、これまでの研究に比べて抜きん出ている。従って、細胞が非対称性を獲得するしくみの原理を分子レベルおよび数理・数式レベルで示す画期的なモデルとなることが予想される。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

Shootin1 の構成するポジティブフィードバックの証明と定量的な Shootin1 の実験計測データを得るのに予想以上の時間を要してきた。しかし、目標はほぼ達成されつつある。

#### <今後の課題>

- 今回構築したモデルニューロンのパラメータを実験計測データに基づいてさらに調整することにより、最終的な完成型のモデルニューロンを構築する。
- 今回は基本モデルニューロンを用いたモデルの検証を行ったが (研究成果7)、完成型のモデルニューロンを用いてモデル検証を行う。また、パラメータの変動は、今回のものに加えて、条件を5種類以上変動させて厳密な検証を行う。
- 我々は、今年度、神経細胞の過剰な軸索形成を抑制して神経極性に強固性 (robustness) を与える新規分子 Singar1 を同定している (Mori et al., *J. Biol. Chem.* 282, 19884-19893, 2007)。今後は、本研究で作成された Shootin1 のみからなる完成型のモデルニューロンに Singar1 の分子挙動も組み入れ、さらに発展型のモデルニューロンを構築する。

#### <成果公表リスト>

- 論文  
1. 0705051217  
Mori T., Wada T., Suzuki T., Kubota Y., and Inagaki N., Singar1, a novel RUN domain-containing protein, suppresses formation of surplus axons for neuronal polarity, *J. Biol. Chem.* 282, 19884-19893 (2007).
- 共同研究  
コンピュータを用いたモデル構築と数理解析は、奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科 作村論一准教授 (生命システム情報) との共同研究で進めている。