

# 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

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、生物学および数理解科学分野における重要な研究テーマである。

神経細胞は、培養条件下で自発的に対称性を破って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 (spontaneous 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。

ここで目指す「分子レベルおよび数理数式レベル」のモデルは、生物学的・物理学的に適切な数式で記述し、またパラメータも実際に Shootin1 の実験定量データをフィッティングして得られたもののみを用いて構築するモデルである。

## <研究開始時の研究計画>

- 1) 神経極性形成タンパク質 Shootin1 の細胞内分子挙動をライブイメージングで定量的に計測する。
- 2) Shootin1 の定量的実験計測データを条件とした定量的モデルニューロンを構築する。
- 3) モデルおよび培養ニューロンの実験パラメータに様々な変動を与え、両ニューロンの極性形成過程を比較して、モデルニューロンの検証・評価を行う。

以上の研究により、実験計測データを基盤とした定量的なモデルを構築して、神経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・数式レベルで明かすことを目指す。

## <研究期間の成果>

### 1) Shootin1 の細胞内分子挙動の観察：

ラット培養海馬神経細胞を用いて、神経極性形成に伴う Shootin1 の細胞内挙動を観察し、以下の結果を得た。

#### i) 神経極性形成に伴う Shootin1 の発現上昇：

Shootin1 に対する抗体を用いたイムノプロットにより、海馬神経細胞の極性形成に伴って Shootin1 の細胞内発現が 10 数倍上昇することがわかった。

#### ii) 神経突起先端における Shootin1 の濃縮は神経突起伸長を

引き起こす：

EGFP-shootin1 を用いたタイムラプス計測により、Shootin1 が神経極性形成前後に神経突起先端の成長円錐においてゆらぐように濃縮と消失を繰り返すことがわかった。また、神経突起先端における Shootin1 の濃縮は神経突起伸長を引き起こした。

#### iii) Shootin1 の細胞体から神経突起先端への能動輸送：

EGFP-shootin1 を用いたタイムラプス計測により、Shootin1 が細胞体から神経突起先端に向かって能動的に輸送されることがわかった。

#### iv) Shootin1 の神経細胞内での拡散：

Kaede-shootin1 を用いたタイムラプス計測と、Shootin1 の能動輸送の阻害実験の結果から Shootin1 が濃度差に従って神経突起内を拡散することが示唆された。

## 2) ライブイメージングを用いた Shootin1 の細胞内分子挙動の定量的計測：

### i) 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。

### ii) 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上昇することがわかった。

### iii) 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。

## 3) 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、神経突起の長さや突起先端の Shootin1 濃度の定量結果からも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)

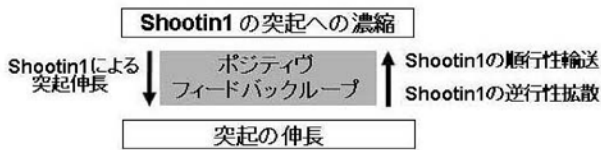


図1

#### 4) Shootin1による神経突起伸長の分子メカニズムの解明：

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 L1-CAM 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。

#### 5) 定量的モデルニューロンの構築：

(2) で得られた Shootin1 の詳細な定量的データ

- 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

に関して、生物学的・物理学的に適切な数式を導入し、データのパラメーターフィッティングを行った。その結果、得られた複数の微分方程式は、すべて (2) で得られた Shootin1 の細胞内動態を定量的によく再現した。さらにこれらの微分方程式をモデルニューロンにおいて統合することによって、自発的に極性を獲得する完成型モデルニューロンを構築に成功した。このモデルニューロンのパラメータは、実質的に実験定量データのみから得られており、また、モデルニューロンは培養海馬神経細胞と極めてよく似た挙動を示した。

#### 6) モデルニューロンによる予想と培養海馬ニューロンの挙動の比較検討：

以上の研究成果に加えて、完成型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：

- i) 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。
- ii) 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。
- iii) 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、培養ニューロンもモデルニューロンと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、培養ニューロンもモデルニューロンと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、培養ニューロンもモデルニューロンとともに 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 (i-iii) 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示唆された。

さらに完成型モデルニューロンと培養海馬ニューロンの挙動を詳細に比較検討してモデルの validity を解析した。その結果：

- iv) モデルニューロンでは培養ニューロンと同様に極性形成前に複数の未成熟な突起の先端で Shootin1 が揺らぐように濃縮と消失を繰り返した。
- v) モデルニューロンでは培養ニューロンと同様に極性形成前に複数の未成熟な突起が揺らぐように伸長と退縮を繰り返した。
- vi) モデルニューロンでは培養ニューロンと同様に極性形成前に軸索となる突起に持続的に Shootin1 が濃縮した。
- vii) モデルニューロンは培養ニューロンに見られるように突起の数を3-6本の間で変化させても安定して極性を形成した。
- viii) モデルニューロンは培養ニューロンと同様な非典型的な極性形成 (一過的に2本の軸索様突起を伸長させ、最終的には軸索を1本形成する) を再現した。
- ix) モデルニューロンは培養ニューロンと同様な非典型的な極性形成 (一過的に1本の軸索様突起を伸長させ、最終的には異なる突起から軸索を形成する) を再現した。
- x) モデルニューロンは培養ニューロンと同様な非典型的な極性形成 (数%のニューロンによる過剰軸索の形成) を再現した。
- xi) モデルニューロンは培養ニューロンと同様に培養48時間のあたりで極性形成を起こした。
- xii) モデルニューロンでは培養ニューロンと同様に極性形成前の1本の突起をひっぱるとその突起が軸索になった。
- xiii) モデルニューロンではすべての神経突起を合わせた長さの伸びに培養ニューロンと同様の制限が見られた。
- xiv) モデルニューロンでは培養ニューロンと同様に、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った。
- xv) モデルニューロンでは培養ニューロンと同様に、上述の軸索切断後、最も長い突起が軸索になった。

以上、総数15個のモデルニューロンによる予想と培養ニューロンの挙動の一致を確認した。

本研究では i) ライブイメージングと定量的計測データの取得、ii) 定量データのみを用いたモデルの構築、iii) モデルによる予想と実験データの比較によるモデルの検証を通じて、神経細胞の対称性の破れを理解する分子レベル・数理数式レベルのモデルの構築に成功した。本モデルから、Shootin1 の stochastic なシグナルのポジティブフィードバックによる増殖が神経細胞の対称性の破れに重要な役割を果たすことが示唆された。

#### <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て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。さらに、モデルニューロンは、総数15のケースにおいて培養海馬神経細胞と極めてよく似た挙動を示した。この数は、優れた数理モデルとして知られる Hodgkin and Huxley の活動電位モデル (*J. Physiol.* 177, 500-544, 1952) で報告されているモデルデータと実験データ的一致数 (8 ケース) よりも多い。従って、我々のモデルは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 の実験計測データを用いて完成型のモデルニューロンを構築するのに予想以上の時間を要してきた。特に、数式を導入するにあたって、生物学的「現象」や「分子メカニズム」を適切に記述できる数式を選ぶこととパラメータを定量的な計測データのみから決定することに時間がかかった。

しかし、上記のようにほぼ満足のゆく完成型のモデルニューロンを構築することができた。

#### <今後の課題、展望>

- 1) 今回構築した数理モデルはいくつかの点で実験データと定量的に一致しない挙動を示す。これは、我々のモデルが Shootin1 の計測データのみから構築されているからだと考えられる。我々は、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。今後は、本研究で作成された Shootin1 のみからなるモデルニューロンに Singar1 等の他の分子の分子挙動も組み入れ、さらに完成型のモデルニューロンを構築する。
- 2) 今回構築したモデルニューロンは、細胞外からの位置情報がない条件下で自発的に対称性を破って極性を形成する。しかし、脳内では細胞外環境によって神経極性の方向が厳密に制御されている。今後は、方向性を伴った細胞外環境に応じて極性の方向が決まる発展型のモデルニューロンの構築を目指す。また、Shootin1 のノックアウトマウスの作成と解析を通じて、Shootin1 の in vivo における神経極性形成への関与を解析する。

- 3) 本研究によって、Shootin1 が細胞体から神経突起先端に向かって能動的に輸送されることがわかった。この分子メカニズムは不明であり、今後、解析を進める。

本研究は、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、石井信教授との共同研究で行われた。

#### <研究期間の全成果公表リスト>

##### 1) 論文

1. 0806121712  
Shimada, T., Toriyama, M., Uemura, K., Kamiguchi, H., Sugiura, T., Watanabe, N. and Inagaki, N., Shootin1 interacts with actin retrograde flow and L1-CAM to promote axon outgrowth, *J. Cell Biol.* 181: 817-829 (2008).
2. 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).
3. 0612192241  
Toriyama M. Shimada T., Kim K.B., Mitsuba M., Nomura E., Katsuta K., Sakumura Y., Roepstorff P., Inagaki N., Shootin1: a protein involved in organization of an asymmetric signal for neuronal polarization, *J. Cell Biol.* 175, 147-157 (2006).

##### 2) 学会発表

1. 稲垣直之、神経細胞の対称性の破れに関与するポジティブフィードバックループ、シンポジウム「フィードバックと形づくり」、第82回日本生化学会大会、2009年10月24日、神戸。
2. 中澤瞳、佐田忠行、森達也、福田光則、稲垣直之、神経極性の安定化に関与する新規分子 Singar1 の作用機構の解析、第82回日本生化学会大会、2009年10月24日、神戸。
3. 鳥山道則、島田忠之、上口裕之、杉浦忠男、渡邊直樹、稲垣直之、クラッチ分子 Shootin1 による神経突起伸長機構の解析、第32回日本神経科学大会、2009年9月16日 名古屋。
4. 稲垣直之、モーニングレクチャー「プロテオミクスと数理解析から見えてきた神経細胞が極性を獲得する仕組み」、第56回日本生化学会近畿支部会、2009年7月18日、大阪。
5. 鳥山道則、作村論一、島田忠之、石井信、稲垣直之、Shootin1 による神経突起長の計測と神経突起伸長の促進は神経極性形成を誘導する、第61回日本細胞生物学会大会、2009年6月2日 名古屋。
6. 稲垣直之、シンポジウム「システム生物学による機能解剖学」第114回 日本解剖学会総会、2009年3月28-30日、岡山。
7. Inagaki, N., A neurite-length sensing system involved in neuronal symmetry breaking, 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会シンポジウム、神経細胞と極性、2008年12月11日、神戸。
8. 鳥山道則、作村論一、島田忠之、石井信、稲垣直之、Shootin1 による神経突起長の計測および神経突起伸長の促進は神経極性形成を誘導する、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、2008年12月10日 神戸。
9. 稲垣直之、鳥山道則、島田忠之、森達也、新規タンパク質 Shootin1 と Singar1 による神経極性形成の制御、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会分子生物学会合同大

会ワークショップ、From shape to function: ニューロンの形態形成と可塑性司る分子基盤、2007年12月14日、横浜。

10. Shimada, T., Toriyama, M., Uemura K., Sugiura, T., Watanabe, N., Kamiguchi, H., and Inagaki, N., Shootin1 Transmits Driving Force of F-actin Flow to L1-CAM for Neurite Elongation, The American Society for Cell Biology 47th Annual Meeting, December 1-5, 2007, Washington DC, USA.
11. 稲垣直之、プロテオミクスを用いた脳神経回路網形成の分子機構の解析、第57回日本電気泳動学会シンポジウム、2007年6月20日、横浜。
12. Mori, T., Wada, T., Suzuki, T., Inagaki, N., Singar a Novel Protein that Suppresses Formation of Surplus Axons for Neuronal Polarization, Cold Spring Harbor Meeting on Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity, September 13-17, 2006, New York, USA.
13. Shimada, T., Toriyama, M., Uemura K., Sugiura, T., Watanabe, N., Kamiguchi, H., Lemmon, V., and Inagaki, N., Shootin1 Transmits Driving Force of F-actin Flow to L1-CAM for Neurite Elongation, Cold Spring Harbor Meeting on Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity, September 13-17, 2006, New York, USA.
14. Toriyama, M., Shimada, T., Kim, K.B., Mitsuba, M., Nomura, E., Roepstorff, P., and Inagaki, N., Shootin1 is involved in spontaneous neuronal polarity formation, 20th IUBMB International, Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto.

### 3) 図書

1. 0911271454  
Mori T., Inagaki N., Kamiguchi H., Neuronal Process Outgrowth., In Lajtha F.W. (ed): Springer-Verlag, Berlin, Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, 2009, pp40-44.
2. 0911271459  
稲垣直之、鳥山道則、鳥田忠之、神経極性形成とShootin1のフィードバックループ、生化学 79, 799-802 (2007).
3. 0911271503  
稲垣直之、鳥山道則、鳥田忠之、Shootin1による神経細胞の対称性破壊と極性形成、脳 21、10, 107-109 (2007).

### 4) 特許

1. 0602082046  
国際出願番号：PCT/JP2006/321364、発明者：稲垣直之、森達也、小原収、長瀬隆弘、出願人：奈良先端科学技術大学院大学、かずさDNA研究所、Singarの発現または機能の抑制による神経軸索の形成・伸長と神経再生への応用、特許出願日：平成18年10月26日。

### 5) 新聞発表

1. 806121728  
朝日新聞 (2008年6月3日朝刊29面) 神経成長にクラッチ役 軸索伸びる仕組み解明 奈良先端大。
2. 806121731  
読売新聞 (2008年6月3日朝刊2面) 神経細胞軸索成長タンパク質を確認 奈良先端大学院大。

3. 806121743  
毎日新聞 (2008年6月3日朝刊3面) 神経伸ばす第三「分子」奈良先端科技大 タンパク質解明。
4. 806121725  
産経新聞 (2008年6月3日朝刊25面) 「神経成長に作用」タンパク質を確認 奈良先端科学技術大学院。
5. 806121740  
日経産業新聞 (2008年6月3日朝刊10面) 神経伸ばす調節役 奈良先端大など タンパク質特定。
6. 806121737  
日刊工業新聞 (2008年6月3日朝刊24面) 神経のクラッチ役解明 たんぱく質「シューティン」細胞伸びに関与 奈良先端科技大。
7. 806121734  
奈良新聞 (2008年6月3日朝刊13面) 神経のクラッチ発見 先端大、伸縮の仕組み解明 再生医療へ応用期待。
8. 0806121718  
京都新聞 (2008年6月3日朝刊25面) 神経成長速める物質 奈良先端科学技術大学院大 ラットで解明。
9. 806121746  
化学工業日報 (2008年6月5日朝刊11面) 神経細胞再生治療開発などに期待 奈良先端科技大が神経を伸ばすしくみ解明。
10. 0806121757  
WEB 徳島新聞 神経成長を加速する物質、ラットで。
11. 0911271514  
科学新聞 (2008年6月27日2面) 神経のクラッチ役。
12. 2008年6月3日付全国の地方紙23紙 (東奥日報、山形新聞、福島民報、東京新聞、下野新聞、茨木新聞、山梨日日新聞、中日新聞、静岡新聞、岐阜新聞、北日本新聞、福井新聞、神戸新聞、山陽新聞、四国新聞、徳島新聞、高知新聞、西日本新聞、大分合同新聞、長崎新聞、佐賀新聞、熊本日日新聞、南日本新聞) クラッチ分子シューティンに関する記事。
13. 0612201749  
毎日新聞 (2006年10月11日(朝)2面 総合 ニュースの焦点) 神経細胞作る物質 奈良先端大チーム確認 再生医療応用も。
14. 0612201757  
産経新聞 (2006年10月11日(朝)29面 社会) 神経再生の“司令塔”世界初、タンパク質発見 奈良先端大。
15. 0612201751  
日経産業新聞 (2006年10月11日(朝)11面 先端技術) 神経細胞のネットワーク 奈良先端大が解明 再生医療へ期待。
16. 0612201754  
日刊工業新聞 (2006年10月11日(朝)21面 科学技術・大学) 神経軸索形成タンパク質 奈良先端大が発見。
17. 0612201808  
奈良新聞 (2006年10月11日 15面 社会) 奈良先端大 稲垣助教授ら 脳の「司令塔」発見 タンパク質シューティン 遺伝子治療開発に期待。
18. 0612201743  
Chunichi Web Press (2006年10月10日(朝)社会) 神経通路形成を統率 タンパク質を特定、治療応用も。
19. 0911271511  
科学新聞 2006年10月20日 神経軸索を決定 関与タンパク質発見 奈良先端大の稲垣助教授ら。