

## 研究課題別評価

1. 研究課題名:神経回路網形成の分子情報伝達システムの解明

2. 研究者氏名:柳 茂

3. 研究の狙い:

神経回路網形成は神経細胞が局所の標識分子を認識することの連続により、最終的な標的に至る。近年、これらの分子としてセマフォリンなどの反発因子が同定され、そのシグナル伝達機構が注目されている。私たちはセマフォリンのシグナル伝達への関与が推測されている CRMP 分子群に注目し、新規 CRMP ファミリー分子である CRAM および会合タンパク質の同定と機能解析を通して神経回路形成の分子メカニズムの解明を目指す。これらの研究が神経変性疾患の病因解明や治療法にも有効であると期待できる。

4. 研究結果:

4-1.チロシンキナーゼ Fes/Fps による微小管調節機構 (J. Biol. Chem. 2003)

私たちは Fes/Fps が微小管と結合し、微小管の核形成と微小管重合を促進すること、微小管の安定性に関与していることを見いだした。Fes/Fps はセマフォリンシグナルと微小管動態をリンクしているのではないかと推測された。

4-2.CRAM に会合するミトコンドリア Septin の同定(Genes Cells 2003)

CRAM 結合蛋白質として新規の Septin ファミリー蛋白質が同定された。この Septin はミトコンドリアに移行することより Mitochondrial septin (M-septin)と命名した。M-septin は、傷害ミトコンドリアに集積し、傷害ミトコンドリアにユビキチン化を誘導し、消去機構に関与している可能性が示唆された。

4-3.CRAM はセマフォリン応答を負に制御する役割を発見 (Mol. Biol. Cell 2005)

CRAM は他の4つの CRMP と異なり、セマフォリンシグナルを抑制する役割が見いだされた。CRAM 過剰発現によりセマフォリンによる成長円錐の崩壊活性が完全に抑制された。また、CRAM が成長円錐の形成に必須であることが明らかとなった。

4-4.CRAM に結合する新規 GTPase 蛋白質 CRAG の発見(論文投稿中)

今回、セマフォリンのシグナル伝達に関与する CRMP の結合蛋白質として新規 GTPase CRAG (CRMP-Associated GTPase)を同定した。CRAG は UV などの活性酸素種 (ROS) を発生するストレスによって核移行し、ユビキチンを伴う封入体を形成する。そして核内において PML と結合し、PML body の形態変化 (Large ring-like structure) と PML のユビキチンリガーゼを活性化することが見いだされた。今回の CRAG の発見により、セマフォリンシグナルと ROS シグナルという新しいシグナル伝達機構の存在が示された。さらに CRAG はポリグルタミン病の密接に関連していることが見いだされたので、神経変性疾患の病態解明と治療へ応用が期待できる。

5. 自己評価:

私の研究のバックグラウンドは細胞内情報伝達機構の解析である。この分野で会得した知識と実験手技を駆使して、神経回路形成の分子メカニズムの解明に挑んだ。具体的なテーマは反発因子セマフォリンを介するシグナル伝達機構であり、私たちが同定したタンパク質 CRAM

に注目して機能解析を行った。この3年間の研究においてCRAMが成長円錐の形成に関与していること、およびセマフォリンにより成長円錐崩壊活性を抑制することなどを明らかにすることが出来た。また、CRAMと複合体を形成する分子群の同定と機能解析より、神経軸索ガイダンス機構が活性酸素をセカンドメッセンジャーとするストレス応答シグナルである可能性を示唆することが出来た。当初の研究計画に沿って実験が進み、期待通りの実験結果が得られたように思う。しかしながら、詳細な解析が出来ておらず、予備的な実験結果が多い点は否めない。今後、この点を確実に進めていく必要がある。さらに、ポリグルタミン病の病態と関連するタンパク質やミトコンドリア機能に関連するタンパク質の同定という思いがけない展開がみられたので、今後の研究に活かしたい。

#### 6. 研究総括の見解:

神経回路網形成を制御する分子情報の伝達機構を明らかにすることを最終的な目標とし、CRMP 遺伝子に焦点を絞って解析を進め、下流因子の解析にとどまらず、入力情報の解析も精力的かつ論理的に進捗させて、着々と優れた成果を生み出し公表しつつある。また、酸化ストレスによって封入体が形成され、ポリグルタミン病との関連を明らかにするなど、予定外の成果も挙げ、今後の研究の飛躍的な展開が大いに期待できる。本研究は目的を超える成果を収め、既に新しい研究展開がなされつつあり、「さきがけ的」研究の成功例であると評価できる。

#### 7. 主な論文等:

##### 原著論文

1. Qin Q., Inatome, R., Hotta, A., Kojima, M., Yamamura, H., Hirai, H., Yoshizawa, T., Tanaka, H., Fukami, K., and **Yanagi, S.** A novel GTPase, CRAM, mediates PML-associated nuclear body formation and degradation of expanded polyglutamine protein. *J. Cell Biol. In press*
2. Hotta, A., Inatome, R., Yuasa-Kawada, J., Qin, Q., Yamamura, H., and **Yanagi, S.** Critical role of CRMP-associated molecule CRAM for filopodia and growth cone development in neurons. *Mol. Biol. Cell* 16(1), 32-39 (2005)
3. Hirose, M., Kitano, J., Nakajima, Y., Moriyoshi, K., **Yanagi, S.**, Yamamura, H., Muto, T., Jingami, H., and Nakanishi, S. Phosphorylation and recruitment of Syk by ITAM-based phosphorylation of tamalin. *J. Biol. Chem.* 279(31), 32308-32315 (2004)
4. Takahashi, S., Inatome, R., Hotta, A., Qin, Q., Hackenmiller, R., Simon, M.C., Yamamura, H., and **Yanagi, S.** Role for Fes/Fps tyrosine kinase in microtubule nucleation through its FCH domain. *J. Biol. Chem.* 278(49), 49129-49133 (2003)
5. Takahashi, S., Inatome, R., Yamamura, H., and **Yanagi, S.** Isolation and expression of a novel mitochondrial septin that interacts with CRMP/CRAM in the developing neurons. *Genes Cells* 8(2), 81-93 (2003)

##### 口頭発表

1. **Shigeru Yanagi**, Hirohei Yamamura: Elucidation of molecular signaling mechanism of axonal guidance 第75回日本生化学会. 2003, 10/17, 横浜.
2. 堀田あづさ、稲留涼子、秦慶宇、**柳茂**: 神経軸索の反発性ガイダンス因子セマフォリンのシグナル伝達に関与するCRAMの細胞内局在と機能解析、分子生物学会春季シンポジウム 2004、5/20、奈良

3. 秦慶宇、稲留涼子、堀田あづさ、山村博平、**柳茂**:ポリグルタミン病の変性蛋白質核内移行制御因子CRAGの同定と機能解析 A novel neuronal GTPase CRAG promotes nuclear translocation and degradation of inclusion bodies of the polyglutamine expanded protein、第77回日本生化学大会、2004、10、横浜

招待講演

1. **Yanagi, S.** Signaling mechanism of Semaphorin-mediated axon guidance. Symposium Signal Cascades in Tissue Remodeling 2003, 1(1/9), Geneva, Switzerland.

2. **Shigeru Yanagi**: Molecular mechanism for semaphoring-mediated signaling 第77回日本生化学会. 2004, 10/13, 横浜.

受賞

平成16年10月 日本生化学会奨励賞