

新潟大学研究推進機構超域学術院 研究プロジェクト 研究成果報告書

(1) 研究プロジェクト名

成長円錐のプロテオミクスから脳構築と損傷修復の過程を探る

平成 20 年 4 月 1 日—平成 23 年 3 月 31 日

(2) 研究プロジェクト構成員・職・氏名

リーダー 五十嵐 道弘 (医歯学系・教授)

メンバー 武内 恒成 (医歯学系・准教授 20 年 9 月—; 渡部 通寿と交代)

同 野住 素広 (医歯学系・講師)

同 横山 峯介 (脳研究所・教授)

同 佐藤 俊哉 (脳研究所・助教)

同 柴田 実 (医歯学系・教授; 前・医歯学総合病院・教授)

同 渡邊(浅田) 裕美 (日本学術振興会 RPD 特別研究員; 前・超域特別研究員)

同 本多(法山) 敦子 (超域学術院特別研究員; 前・科研費研究補助者)

外部メンバー 加藤 薫 (独立行政法人産業技術総合研究所・研究員)

同 木山 博資 (名古屋大学・教授; 前・大阪市立大学・教授)

(3) 研究成果の概要

①プロジェクトにおいて目標としたもの

成長円錐は脳の神経回路を形成するために発達期の神経細胞の突起先端に形成される構造体であり、活発に運動して遠距離を移動し、正しい経路と標的を認識してシナプス形成を行う。この構造体は、神経回路の構築および修復に必須の構造体であるが、それを担う分子機構は哺乳動物では全く分かっていない。本プロジェクトは、代表者の研究室を中心に成長円錐のプロテオミクスの手法で分子情報を包括的に得て、それをもとに神経回路の形成とリモデリングに関与する多数の蛋白質群の役割を、発生工学で作成したマウスや、リアルタイムの各分子の挙動解析を用いて明らかにし、神経回路の構築・修復の分子情報を飛躍的に広げることにある。またこれらの研究を通じて、網羅的に神経系分子群の機能を研究する技術を確立することがもう 1 つの目標である。

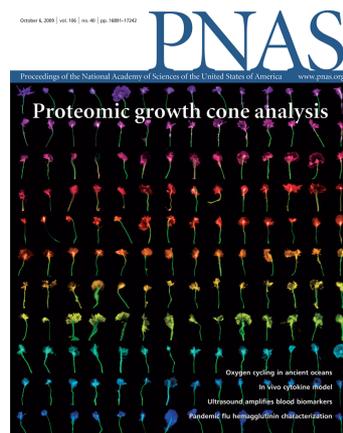
②目標に到達するために選択した方法・手段

主たる研究手段として、蛋白質を網羅的に同定するプロテオミクスの手法をまず用いた。またこの系に空間的な情報を導入するため、多数の同定分子に対して新規抗体を作成し、系統的な免疫染色を施した。これによって、空間的に成長円錐に濃縮されている分子を定量的に、かつ効率的に見出すことに成功した。さらに RNAi (RNA 干渉) を多数の遺伝子に適用する新手法を、EGFP トランスジェニックラットを使用して開発した。神経成長時の分子動態のリアルタ

イム解析は種々のバイオイメーキングを駆使して行われた。またシナプス関連分子の解析、軸索再生関連のモデルマウスの作成に成功した。

③その結果、得られた成果

1) 成長円錐の分子マーカーの確立（五十嵐、武内、野住）：成長円錐のプロテオミクス、定量的な免疫染色、系統的な RNAi を組合せて、成長円錐の分子マーカーを確立した。これらは培養大脳皮質ニューロンにおいて、選択的に成長円錐に局在することが証明された。また成長円錐のプロテオミクスを成熟シナプスと比較して、微小管に関する分子群が成長円錐を特徴づけるタンパク質群であることを証明した。この結果は、PNAS【米国科学アカデミー紀要】に掲載され、またその掲載号の表紙に”growth cone proteomics”として大きく取り上げられた（PNAS 106 (40) 表紙;2009年10月6日号;左図）。また掲載時の Editor である L. Landmesser 博士から「成長円錐のプロテオミクスは、モデル生物の変異体解析を補完する研究といえるが、今まで誰も着手してこなかった業績であり、その研究の重要性は大きい」との褒賞を得た。新潟大学の HP や、新聞二紙の掲載を得て、大きく評価され、その後の科学研究費基盤研究 A 獲得につながった。また文部科学省特定領域研究「統合脳」の報告書扉ページにも取り上げられた。



この研究をさらに発展させるため、PC12 細胞の成長円錐でもこれらの成長円錐分子マーカーになるかどうかを検討したところ、全ての分子がマーカーとなることを証明した。これによって、われわれが見出した分子群は、神経細胞の種類によらず、共通の成長円錐の分子マーカーとなることが明らかとなった。

2) コンドロイチン硫酸の遺伝子改変マウスの解析（五十嵐、武内、渡邊、横山、佐藤）：成長円錐に関する最も大量に存在する抑制性因子であるコンドロイチン硫酸(CS)に関する、成長円錐の機能解析を行うため、CS 合成酵素の 1 つである CSGalNAcT1, T2 のノックアウトマウスを解析し、研究を進めることとした。まず CSGalNAcT1 の欠損マウスを作成したところ、脳の形成に著変は見られなかったが、脳の細胞移動に遅延が見られた。また骨端軟骨の発生が異常で、低身長が起こった。骨端軟骨の微細構造も異常であり、CS 量は正常の半分に減少していた。さらに脊髄損傷を作成したところ、成長円錐の機能抑制によって通常では生ずる再生障害が大きく緩和され、軸索再生の頻度が向上した。

3) 成長円錐のリン酸化プロテオミクスと GAP-43 リン酸化（五十嵐、武内、柴田、野住、木山）：リン酸化プロテオミクスに基づいて、6,000 種類のリン酸化部位を見出した。このうち、成長円錐の古典的分子マーカーである GAP-43 のリン酸化に関して 10 種類の新規リン酸化部位を見出した。このうち、5 種類の部位にリン酸化部位特異抗体を作成し、検討したところ、2 種類の抗体が成長円錐に特異的に分布することを証明した。一方、この抗体を使って、切断後に再生する末梢神経を用いて実験したところ、成長円錐のみならず、再生神経が特異的に染まって認識されることがみだされた。これは発生の際に、成長する軸索全体が染まることに対応する結果であった。

4) 成長円錐の新規分子群の役割（五十嵐、武内、野住、本多、加藤）：成長円錐での極性に関する分子群を、成長円錐のプロテオミクスによって M6a を見出した。その下流の結合分子として、M6BP, rap2 を見出したが、これらが複合体を作った際にのみ、軸索が単一に形成されることが分か

った。また成長円錐の小胞の運動についてイメージングを行い、これらが複数の運動に分類され、それぞれが別個の方向性や異なる細胞骨格との連関を有することを見出した。

5) シンタキシンの変異に基づくシナプス可塑性の研究 (五十嵐、渡邊、横山) : 成長円錐からシナプスになった過程で、シナプス伝達の中核分子シンタキシンをめぐる短期可塑性機構を検討した。その結果、変異マウス R151G について、マウスのシナプス伝達の効率、シナプス小胞密度、マウスの高次機能行動に異常が存在し、これらはシンタキシンと脳可塑性の中心分子 CaMKII の相互作用の低下と、その後生ずる小胞の伝達準備状態への生化学的移行の低下であることが見出された。

④研究発表実績

同プロジェクトによる研究成果の全部又は一部を学会誌等に発表したものについては、次に記載した区分の順に所要事項を記入すること。(別紙を添付しても可。)

ア 学会誌等 (発表者名, テーマ名, 学会誌名, 巻, 年月日)

五十嵐 道弘

- 1) Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, **Igarashi M**, Endo T, **Takeuchi K**, Tsukita S: Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* 585(4):606-612 (2011).
- 2) Lu J, **Nozumi M**, **Takeuchi K**, Abe H, **Igarashi M**: Expression and function of neuronal growth-associated proteins (nGAPs) in PC12 cells. *Neurosci Res.* 70(1):85-90 (2011).
- 3) Kobayashi T, *Terajima K, Nozumi M, Igarashi M, Akazawa K: A stochastic model of neuronal growth cone guidance regulated by multiple sensors. *J. Theor. Biol.* 266, 712-722 (2010).
- 4) Watanabe Y, Takeuchi K, Higa Onaga S, Sato M, Tsujita M, Abe M, Natsume R, Li M, Furuichi T, Saeki M, Izumikawa T, Hasegawa A, Yokoyama M, Ikegawa S, Sakimura K, Amizuka N, Kitagawa H, *Igarashi M: Chondroitin sulfate N-Acetylgalactosaminyltransferase-1 is required for normal cartilage development. *Biochem. J.* 427, 47-55 (2010).
- 5) Nozumi M, Togano T, Takahashi-Niki K, Lu J, Honda A, Taoka M, Shinkawa T, Koga H, Takeuchi K, Isobe T, *Igarashi M : Identification of functional marker proteins in the mammalian growth cone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 17211-17216 (2009). (direct submission; cover paper of PNAS #40 issue)
- 6) Lu J, Nozumi M, Fujii H, *Igarashi M: A novel method for RNA interference using EGFP-transgenic rats. *Neurosci. Res.* 61, 219-224 (2008).
- 7) Kajiura S, Yashiki T, Funaoka H, Ohkaru Y, Nishikura K, Kanda T, Ajioka Y, *Igarashi M, Hatakeyama K, *Fujii H: Establishment and characterization of monoclonal and polyclonal antibodies against human I-FABP. *J. Immunoassay. Immunochem.* 29, 19-41 (2008).

武内 恒成

- 1) Horiuchi M., Takeuchi K., Noda N., Muroya N., Takahasi K, Nakamura T., Kawamura-Tsuzuku J., Yamamoto T. and *Inagaki F: Structural basis for antiproliferative activity of Tob-hCaf1 complex. *J.Biol.Chem.* 284: 13244-13255 (2009)
- 2) Nishimura K, Kitamura Y, Umesono Y, Takeuchi K, Takata K, Taniguchi T, Agata K: Identification of glutamic acid decarboxylase gene and distribution of GABAergic nervous system in the planarian *Dugesia japonica*. *Neuroscience.* 153:1103-1114 (2008).
- 3) Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, Takeuchi K, Fujimori T, Nabeshima Y, Noda T, Tsukita S, Tsukita S: Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell.* 19: 2465-2475 (2008).

横山 峯介

- 1) Ageta, H., Ikegami, S., Miura, M., Masuda, M., Migishima, R., Hino, T., Takashima, N., Murayama, A., Sugino, H., Setou, M., Kida, S., **Yokoyama, M.**, Hasegawa, Y., Tsuchida, K., Aosaki, T. and Inokuchi, K.: Activin plays a key role in the maintenance of long-term memory and late-LTP. *Learn Mem.* 17(4):176-85. 2010

- 2) Yamamoto, T., Morita, S., Go, R., Obata, M., Katsuragi, Y., Fujita, Y., Maeda, Y., **Yokoyama, M.**, Aoyagi, Y., Ichikawa, H., Mishima, Y. and Kominami, R.: Clonally expanding thymocytes having lineage capability in gamma-ray-induced mouse atrophic thymus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 77(1): 235-43. 2010
- 3) Saito, K., Kakizaki, T., Hayashi, R., Nishimaru, H., Furukawa, T., Nakazato, Y., Takamori, S., Ebihara, S., Uematsu, M., Mishina, M., Miyazaki, J., **Yokoyama, M.**, Konishi, S., Inoue, K., Fukuda, A., Fukumoto, M., Nakamura, K., Obata, K. and Yanagawa, Y.: The physiological roles of vesicular GABA transporter during embryonic development: a study using knockout mice. *Mol Brain.* 3:40. 2010
- 4) Kato, T., Kasai, A., Mizuno, M., Fengyi, L., Shintani, N., Maeda, S., **Yokoyama, M.**, Ozaki, M. and Nawa, H.: Phenotypic characterization of transgenic mice overexpressing Neuregulin-1. *PLoS One.* 9;5:e14185, 2010
- 5) Suzuki-Migishima, R., Hino, T., Takabe, M., Oda, K., Migishima, F., Morimoto, Y. and **Yokoyama, M.**: Marked improvement of fertility of cryopreserved C57BL/6J mouse sperm by depletion of Ca²⁺ in medium. *J. Reprod. Develop.* 55:386-392, 2009.
- 6) Kumagai, T., Tanaka, M., **Yokoyama, M.**, Sato, T., Shinkai, T. and Furukawa, K.: Early lethality of β-1,4-galactosyltransferase V-mutant mice by growth retardation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379:456-459, 2009.
- 7) Hino, T., Oda, K., Nakamura, K., Toyoda, Y. and **Yokoyama, M.**: Low fertility in vivo resulting from female factors causes small litter size in 129 inbred mice. *Reprod. Med. Biol.*, 8:157-161, 2009.
- 8) Azuma, S., Anzai, M., Juni, A., **Yokoyama, M.** and Toyoda, Y.: Efficient isolation of embryonic stem cell lines from hatched blastocysts. *Kitasato. Med. J.* 39:126-134, 2009.
- 9) Kumagai, T., Tanaka, M., **Yokoyama, M.**, Sato, T., Shinkai, T. and Furukawa, K.: Early lethality of beta-1,4-galactosyltransferase V-mutant mice by growth retardation. *Biochem Biophys Res Commun.* 379(2): 456-9. 2009
- 10) Ageta, H., Murayama, A., Migishima, R., Kida, S., Tsuchida, K., **Yokoyama, M.** and Inokuchi, K.: Activin in the brain modulates anxiety-related behavior and adult neurogenesis. *PLoS One.* 3(4):e1869. 2008
- 11) Shimamura, M., Huang, Y.Y., Suzuki-Migishima, R., **Yokoyama, M.**, Saitoh, T. and Yamamura, T.: Localization of NK1.1(+) invariant Valpha19 TCR(+) cells in the liver with potential to promptly respond to TCR stimulation. *Immunol Lett.* 121:38-44, 2008.

佐藤 俊哉

- 1) Yokoseki A, Ishihara T, Koyama A, Shiga A, Yamada M, Suzuki C, Sekijima Y, Maruta K, Tsuchiya M, Date H, **Sato T**, Tada M, Ikeuchi T, Tsuji S, Nishizawa M, Onodera O Genotype-phenotype correlations in early onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminaemia. *Brain* 134(Pt 5):1387-99 (2011).
- 2) Sato T, Miura M, Yamada M, Yoshida T, Wood JD, Yazawa I, Masuda M, Suzuki T, Shin RM, Yau HJ, Liu FC, Shimohata T, Onodera O, Ross CA, Katsuki M, Takahashi H, Kano M, Aosaki T, Tsuji S: Severe neurological phenotypes of Q129 DRPLA transgenic mice serendipitously created by en masse expansion of CAG repeats in Q76 DRPLA mice. *Hum Mol Genet.* 18: 723-736 (2009).
- 3) Yamada M, Sato T, Tsuji S, Takahashi H: CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 115: 71-86 (2008).

渡邊 裕美

- 1) Matsumoto N, Taguchi A, Kitayama H, Watanabe Y, Ohta M, Yoshihara T, Itokazu Y, Dezawa M, Suzuki Y, Sugimoto H, Noda M, Ide C: Transplantation of cultured choroid plexus epithelial cells via cerebrospinal fluid shows prominent neuroprotective effects against acute ischemic brain injury in the rat. *Neurosci Lett.* 469: 283-288 (2010).

柴田 実

- 1) Komagata S, Chen S, Suzuki A, Yamashita H, Hishida R, Maeda T, **Shibata M**, Shibuki K: Initial phase of neuropathic pain within a few hours after nerve injury in mice. *J Neurosci.* 31(13):4896-905 (2011).

イ 口頭発表 (発表者名, テーマ名, 学会等名, 年月日)

(シンポジウム発表)

A. 国際学会

- 1) **Igarashi M**: "The novel neuronal growth-associated proteins revealed by the proteomic analysis of the growth cone". 1st NeuroTalk 2010 (Singapore), 2010.6.25
- 2) **Igarashi M**: "How to use the proteomic results for the growth cone research?" Axon Guidance, Synaptic Plasticity & Regeneration. Cold Spring Harbor Symposium (Cold Spring Harbor, New York, USA), 2010. 9.21-24
- 3) Lu J, Nozumi M, **Igarashi M**: Cold Spring Harbor Asia Symposium (蘇州、中国)、2010. 4. 12-16
- 4) Watanabe Y, **Igarashi M**: "Syntaxin-1A (R151G) knock-in mice that cannot be associated with CaMKII show the impaired vesicle recycling after stimulation." FENS Satellite symposium (Amsterdam) 2010.6.30-7.2

(渡邊 裕美)

WATANABE Y, ITO R, TADA Y, TAKAO K, MIYAKAWA T, SAKIMURA K, IGARASHI M

THE EFFECT OF R151G MUTATION OF SYNTAXIN-1A ON THE INTERACTION OF SYNTAXIN-1A-CAMKII IN VIVO, CREST

Neuroscience International Symposium "Hippocampal neurogenesis: its implication in neural functions and mental diseases"

Awaji Yumebutai International Conference Center 2009/6/2-3

B. 国内学会

(五十嵐 道弘)

- 1) 五十嵐 道弘: プロテオミクスを用いた成長円錐の分子基盤研究 日本生化学会関東支部会・新潟生化学懇話会ミニシンポジウム「神経系の発達と脳の高次機能」(長岡)、2010. 5. 28
- 2) 五十嵐 道弘: 成長円錐機能を支配する分子群とその役割 第1回脳表現型の分子メカニズム研究会(大阪)、2010. 10. 23
- 3) 五十嵐 道弘: プロテオミクスから見た成長円錐機能の分子機構 包括脳ネットワーク・蛋白質研究所共催「神経科学と構造生物学の融合」(大阪)、2010. 10. 28
- 4) 五十嵐 道弘: 成長円錐のプロテオミクスによる新しい成長円錐分子マーカー群の発見
Newly identified neuronal growth-associated proteins (nGAPs) using proteomics
日本神経科学学会(Neuro2010)(神戸)、2010. 9. 4
- 5) 五十嵐 道弘: プロテオミクスによって初めて可能となった成長円錐研究: 特異分子マーカーと機能制御機構. 文部科学省特定領域「統合脳」プロテオミクス講演会 2009. 11. 1
- 6) 五十嵐 道弘: 成長円錐研究におけるプロテオミクス導入の意義と新たな研究戦略 シンポジウム「網羅的アプローチ(-omics)による、神経化学の新しい世界観」(オーガナイザー: 五十嵐 道弘、古市 貞一) 第52回日本神経化学会(伊香保)、2009.6.23
- 7) 五十嵐 道弘: 神経成長とシナプス伝達に關与するリン酸化蛋白質の解析と意義 第52回日本神経化学会(伊香保) 2009.6.23

(武内 恒成)

1. 武内恒成

細胞外基質コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは如何に神経発生に機能するか?

第88回日本生理学会大会・日本解剖学会総会合同大会

パシフィコ横浜 2011/3/28-30 (開催予定が震災にて中止されたが誌上開催の形態をとつ

た)

2. 武内恒成、五十嵐道弘

「遺伝子抑制法と遺伝子導入法の展開から見えるもの～新技術から医薬応用に向けての新しい研究展開～」オーガナイザー：武内恒成、村上章

遺伝子導入からみた遺伝子発現と遺伝子発現抑制系

(Gene expression and knockdown : from the viewpoint of the gene transfection.)

第 82 回 日本生化学会大会 神戸国際会議場 (4 日目) 2009/10/21~24

(一般発表)

1. Motohiro Nozumi, Jia Lu, Kosei Takeuchi, Michihiro Igarashi.

Neuronal growth-associated proteins (nGAPs) regulate the growth cone morphology. (ポスター発表)

ASCB 50th Annual Meeting Philadelphia, USA 2010/12/11-15

2. Jia Lu, Motohiro Nozumi, Kosei Takeuchi, Michihiro Igarashi.

Neuronal growth-associated proteins(nGAPs) regulate neurite the growth cone morphology through rearrangement of F-actin

第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 神戸コンベンションセンター 2010/12/7-10

3. 峯田克彦、山本康子、田中啓雄、山崎裕自、齋藤邦明、田村淳、武内恒成、月田早智子

新規クローゼイン候補遺伝子群の予測と機能推定

第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 神戸コンベンションセンター 2010/12/7-10

4. 山本康子、峯田克彦、田中啓雄、山崎裕自、齋藤邦明、田村淳、武内恒成、月田早智子

新規クローゼイン細胞間バリアー機能における役割

第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 神戸コンベンションセンター 2010/12/7-10

5. Susumu Higa Onaga, Yumi Watanabe, Kosei Takeuchi, Michihiro Igarashi.

Brain development abnormality in the mice lacking in the enzymes synthesizing chondroitin sulfate

SFN 2010(米国神経科学会) San Diego 2010 /11/13-17

6. 渡邊裕美、多田幸代、崎村建司、五十嵐道弘

変異シntaxin 1 A ノックインマウス由来海馬神経細胞におけるシナプス開口放出機構の解析

(Syntaxin-1A (R151G) knock-in mice that cannot be associated with CaMKII show the impaired dynamics of syntaxin-1A and vesicle recycling after stimulation)

Neuro2010 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学大会・第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会 神戸コンベンションセンター 2010/9/3

7. Susumu Onaga Higa, 武内恒成、渡邊裕美、小牟田縁 (ゆかり)、泉川友美、北川裕之、五十嵐道弘

コンドロイチン硫酸合成酵素欠損マウスにおける脳発達異常

(Brain development abnormality in the mice lacking in the enzymes synthesizing chondroitin sulfate)

Neuro2010 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学大会・第 20 回日本神経回路学会
大会 合同大会 神戸コンベンションセンター 2010/9/3

8. 野住 素広、呂 嘉、五十嵐 道弘

プロテオミクスで同定された成長円錐分子マーカー群の機能解析 (ポスター発表)

2010 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ 札幌 2010/7/27-30

9. 武内恒成、五十嵐道弘

新規バキュロウイルス発現細胞と膜タンパク質応用解析技術

J S T キャンパス・イノベーションセンター 新技術説明会

キャンパス・イノベーションセンター東京 2010/7/30

10. Kosei Takeuchi, Susumu Higa-Onaga, Hitoshi Kawano, Michihiro Igarashi.

Functional analyses of mice lacking an enzyme for chondroitin sulfate synthesis

7th Forum of European Neurosciences. Amsterdam (Netherland) 2010/7/ 3-7

11. Hitoshi Kawano, Nozomu Yoshioka, Yukari Komuta, Kosei Takeuchi, Koki Kawamura.

The fibrotic scar is a major impediment for axonal regeneration after traumatic central nervous system injury

7th Forum of European Neurosciences. Amsterdam (Netherland) 2010/7/ 3-7

12. Nozomu Yoshioka, Kosei Takeuchi, Shinichi HIsanaga, Hitoshi Kawano.

The involvement of lesion scar on healing of damaged CNS tissue and axonal regeneration

7th Forum of European Neurosciences. Amsterdam (Netherland) 2010 /7/3-7

13. 野住素広、呂嘉、武内恒成、五十嵐道弘

成長円錐プロテオームに基づいた神経成長関連蛋白質 (n G A P s) の同定

平成 22 年度日本生化学会関東支部例会・第 51 回新潟生化学懇話会 合同研究集会

長岡技術科学大学 2010/5/28~29

14. 本多敦子、武内恒成、五十嵐道弘

テトラスパニンM6 a 結合蛋白質群による軸索突起形成の制御機構

平成 22 年度日本生化学会関東支部例会・第 51 回新潟生化学懇話会 合同研究集会

長岡技術科学大学 2010/5/28~29

15. Hirotaka Kyo, Mitsunori Hayashi, Nobuyuki Sasakawa Yumi Watanabe, Michihiro Igarashi, Kenji Sakimura, and Konosuke Kumakura.

Possible involvement of Syntaxin 1A - CaMKII interaction in the regulation of exocytosis in mouse chromaffin cells

第 83 回日本薬理学会年会 大阪国際会議場 2010/3/16-18

16. 武内恒成、比嘉進、渡邊裕美、北川裕之、五十嵐道弘

コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの糖鎖合成酵素変異マウスにおける脳形成の解析

(Analysis of the knockout mice lacking in the enzymes synthesizing chondroitin sulfate)

第 32 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 (4 日目) 2009/12/9~12

17. 本多敦子、武内恒成、平田たつみ、五十嵐道弘

- テトラスパン蛋白質 M6a の軸索形成のためのシグナル基盤としての役割
(Tetraspan protein, M6a as a signaling platform for the axon protrusion.)
第 32 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 (4 日目) 2009/12/9~12
18. 本多敦子、武内恒成、五十嵐道弘
M6a 結合蛋白質による単一神経突起伸長の制御
(Regulation of single neurite protrusion by M6a-binding proteins)
第 82 回日本生化学会大会 神戸国際会議場 (4 日目) 2009/10/21~24
19. 渡邊裕美、渡部通寿、多田幸代、番場彩子、五十嵐道弘
CaMKII 結合部位に変異を有するシンタキシン 1 A を導入したノックインマウスにおける SNARE 複合体形成の解析
(Analysis of SNARE complex formation in mutated syntaxin-1A knock-in mice that cannot associate with CaMKII)
第 82 回日本生化学会大会 神戸国際会議場 2009/10/24
20. Motohiro Nozumi, Jia Lu, Michihiro Igarashi.
Newly identified neuronal growth-associated proteins (nGAPs) are involved in rearrangement of cytoskeletons in the growth cone. (ポスター発表)
Neuroscience 2009 - Society for Neuroscience Chicago, USA 2009/10/17-21
21. 本多敦子、武内恒成、五十嵐道弘
単一神経軸索伸長に関わる膜タンパク質 M6a の調節機能
(Regulation of single neurite protrusion by the axonal membrane glycoprotein M6a.)
第 32 回日本神経科学大会 名古屋国際会議場 (1 日目) 2009/9/16-18
22. Higa-Onaga Susumu、渡邊裕美、武内恒成、五十嵐道弘
コンドロイチン硫酸合成酵素欠損マウスの解析
(Functional analysis of mice lacking an enzyme for chondroitin sulfate synthesis.)
第 32 回日本神経科学大会 名古屋国際会議場 (1 日目) 2009/9/16-18
23. 渡邊裕美、多田幸代、番場彩子、崎村建司、五十嵐道弘
変異シンタキシン 1 A(R151G)ノックインマウスにおけるシナプス小胞輸送の解析(Analysis of the synaptic vesicle transportation of Syntaxin-1A (R151G) knock-in mouse)
第 32 回日本神経科学大会 名古屋国際会議場 2009/9/17
24. 野住素広、呂嘉、武内恒成、五十嵐道弘
新規に同定した神経成長関連蛋白質(nGAPs)の成長円錐における機能 (ポスター発表)
第 32 回日本神経科学大会 名古屋国際会議場 2009/9/16-18
25. 峯田克彦、阿形清和、五十嵐道弘、武内恒成
プラナリアから探る神経系の進化: 免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)とカドヘリンスーパーファミリー (CdhSF)接着分子群の多様性
第 11 回日本進化学会大会 北海道大学 (2 日目) 2009/9/2-4
26. 武内恒成、本多敦子、野住素広、五十嵐道弘
神経細胞への新規バキュロウイルスシステムによる遺伝子導入発現法

(A new transfection and expression technology for neural cells –Gene expression by BmNPV baculovirus system.)

第 52 回日本神経化学学会大会 伊香保ホテル天坊 (2 日目) 2009/6/21~24

27. Higa-Onaga Susumu、渡邊裕美、武内恒成、五十嵐道弘

コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの糖鎖生成酵素欠損マウスの解析

(Analyses of the knockout mice lacking in the enzymes synthesizing chondroitin sulfate.)

第 52 回日本神経化学学会大会 伊香保ホテル天坊 (2 日目) 2009/6/21-24

28. 渡邊裕美、伊藤理恵子、多田幸代、高雄啓三、宮川剛、崎村建司、五十嵐道弘

シタキシン 1 A-CaMKII 相互作用のシナプス小胞輸送と脳高次機能における役割

第 52 回日本神経化学学会大会 伊香保ホテル天坊 2009/6/22-23

29. 野住素広、呂嘉、五十嵐道弘

新規に同定した神経成長関連蛋白質(nGAPs)の成長円錐における役割 (ポスター発表) 第 52

回日本神経化学学会大会 伊香保ホテル天坊 2009/6/21-23

30. 武内恒成

蛋白質発現系を駆使した回路形成イメージング

第 30 回神経組織培養研究会 湯河原厚生年金会館 (1 日目) 2009/3/14-15

31. 野住素広、武内恒成、五十嵐道弘

成長円錐のプロテオミクスに基づく神経成長関連分子の同定

第 30 回神経組織培養研究会 湯河原厚生年金会館 (1 日目) 2009/3/14-15

32. 野住素広、五十嵐道弘

成長円錐のプロテオミクスに基づく神経成長関連分子の同定 (口頭発表)

グリアクラブ ニセコ 2009/2/9-11

33. 野住素広、五十嵐道弘

軸索伸長に関わる成長円錐マーカー蛋白質の同定 (ポスター発表)

BMB2008(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) 神戸ポートアイランド 2008/12/9-12

34. 小林太一郎、野住素広、寺島健史、五十嵐道弘、赤澤宏平

神経軸索の成長シミュレーションの開発 (ポスター発表)

BMB2008(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) 神戸ポートアイランド 2008/12/9-12

35. 渡邊裕美、多田幸代、伊藤理恵子、五十嵐道弘

自己リン酸化 CaMKII 結合能を有しない変異シタキシン 1 A ノックインマウスにおけるシナプス小胞輸送の変化

BMB2008(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) 神戸ポートアイランド 2008/12/11

36. Motohiro Nozumi、Michihiro Igarashi.

The growth cone proteins that are essential to axonal growth. (ポスター発表) Neuroscience 2008 - Society for Neuroscience Washington DC, USA 2008/11/15-19

37. 野住素広、五十嵐道弘
軸索成長に係る成長円錐蛋白質の網羅的同定と分布の決定（口頭発表）
第 51 回日本神経化学学会大会 富山国際会議場 2008/9/11-13
38. 笹川展幸、松田冬香、林光紀、渡邊裕美、五十嵐道弘
マウスクロマフィン細胞における開口分泌の特性
第 51 回日本神経化学学会 富山国際会議場 2008/9/11
39. 野住素広、五十嵐道弘
成長円錐蛋白質の細胞内局在と RNAi による機能解析（ポスター発表）
第 31 回日本神経科学大会 東京 2008/7/9-11
40. 呂嘉、野住素広、阿部春樹、五十嵐道弘
神経成長における FABP-7 の役割の解析（ポスター発表）
第 31 回日本神経科学大会 東京 2008/7/9-11
41. 海老原利枝、白川彩弓、戸高玲子、野住素広、小澤睦、五十嵐道弘、加藤薫
成長円錐のプロテオミクスで検出されたアクチン関連タンパクの動態解析（ポスター発表）
第 31 回日本神経科学大会 東京 2008/7/9-11
42. Motohiro Nozumi, Michihiro Igarashi.
Systematic identification of the growth cone proteins involved in axonal growth.（ポスター発表）
8th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society of Neurochemistry 上海 2008/6/23-26
43. Jia Lu, Motohiro Nozumi, Haruki Abe, Michihiro Igarashi.
A novel method of RNAi applied to the neuron for the genome-wide research.（ポスター発表）
8th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society of Neurochemistry 上海 2008/6/23-26
44. 野住素広、五十嵐道弘
成長円錐のプロテオミクスと機能解析（口頭発表）
新潟生化学懇話会 新潟 2008/6/21

ウ 出版物（著者名，書名，出版社名，年月日）

*Igarashi M, Ohko K: Proteins Involved in the Presynaptic Functions. *In* “Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neural Signaling Mechanisms”(Lajtha A, Mikoshiba K, eds), pp. 45-62, Springer, US (2009)

⑤競争的資金の応募・採択状況

プロジェクト認定期間中における競争的資金への応募・採択状況を構成員毎に記載する。ただし、学内者のみとし、プロジェクト推進経費等の学内公募の研究費は除くものとする。
(記載事項：代表者名，研究費の名称，研究期間，総額，採否の別)

五十嵐 道弘

- 1) 科学研究費基盤研究 A（代表）成長円錐の新規分子マーカー群及び関連分子の機能・動態解析 22-25 年度 38,600 千円 **採択**
- 2) 科学研究費新学術領域（脳科学研究支援）（分担；代表者 木村 実・自然科学研究機構教授）「包括型脳科学ネットワーク」 22-27 年度 12,500 千円 **採択**
- 3) 沖縄科学技術研究基盤整備機構共同研究（代表）成長円錐分子群の神経回路形成における、哺乳動物・線虫間の共通分子原理の研究 20-21 年度 1,999 千円 **採択**
- 4) 科学研究費特定領域研究（代表）「成長円錐のシナプス形成に関与する Ca²⁺センサーの探索と機能解析」 20-21 年度 28,300 千円 **採択**

5) JST-CREST (分担)「視覚経験はいかにして脳に刻印されるか」(代表者: 畠 義郎・鳥取大学教授) 20-24年度 申請総額 240,000千円 不採択

武内 恒成

- 1) 科学研究費基盤研究 C (代表)「神経プロトカドヘリンとダウン症 CAM(DsCAM)のリガンド結合と分子機能解析」 20-22年度 3,700千円 採択
- 2) 農林水産省アグリヘルス研究促進プロジェクト (代表) 「脊髄損傷保護・神経再生促進材料研究」 22-26年度 30,000千円 採択
- 3) 生研センター/生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業 (分担)「昆虫細胞膜への膜蛋白質発現とリガンド・抗体検索、イメージングシステムの構築」 49,400千円 19-23年度 採択

野住 素広

- 1) 科学研究費若手研究 B (代表)「成長円錐における神経成長関連蛋白質群の機能」 22-23年度 3,200千円 採択

柴田 実

- 1) 科学研究費基盤研究 B (代表)「新たな神経可塑性の検討と可塑性を考慮した末梢神経修復成績向上への研究」 16,300千円 21-23年度 採択
- 2) 科学研究費挑戦的萌芽研究 (代表) 「高倍率手術用立体視モニター付き双眼ルーペの開発」 3,100千円 採択

⑥研究成果による知的財産権の出願・取得状況

研究で得られた成果で知的財産権(特許権, 実用新案権等)を出願している場合(取得を含む。)はその内容を記載すること。記載する事項が無い場合は、「該当なし」と記載すること。

出願1件

「無血清培養カイコバキュロ培養細胞株の作出とその応用」特願 2009-20018、出願日 2009/05/22 出願者 武内 恒成

申請中1件

「神経軸索再生および神経軸索発生の検出に優れた GAP-43 リン酸化部位認識抗体の作出およびその応用」出願者 五十嵐 道弘、武内 恒成、野住 素広

⑦新聞等のメディアに掲載された事項

プロジェクトに関するもので、学外向けのメディアに取り上げられた場合は、その内容を記載すること。

2009年 9月 26日 新潟日報社会面(左図)

2009年 10月 27日 日経産業新聞(下図)



⑧プロジェクトに対する自己評価

本研究においては、プロテオミクスの達成とその生理的な意義の解明、ということにあったが、多数の分子の意義を明らかにする方法論については、類例のない研究であったため、技術開発等を含めて非常に時間がかかった。よって、まさに学問の方法論から作り上げることで困難を切り開くことになり、今後の同種の研究のモデルになったものと考えている。

主たる論文の2009年（平成21年）のPNAS【米国科学アカデミー紀要】誌発表という大きな成果は、新聞紙上に取り上げられたほか、「統合脳」の報告書のカラーページにも選抜され、掲載された。単一研究室からこのような大型の網羅的研究が可能であったのは、超域研究の支援、またいくつかの外部資金の援助によって達成されたものと考えている。

後継の超域学術院プロジェクトには、本プロジェクトの多くが継続しているが、昨今の研究が大型化し、主要な学術雑誌掲載には数年規模のかかるため、第二期で着手した計画で、まだ完遂していない（論文としては投稿準備中の）大きな研究が2つ残った。これは3年間の期間は必ずしも長いとは言えず、研究も継続性が高いのでやむを得ないが、後継プロジェクトで大きな花を咲かせる種をまいた時期であったと考えている。後継プロジェクトの「成長円錐の分子機能に基づく神経回路の形成と修復の総合的研究」では専任教員も得て、さらにこれを大きく発展させることを認めていただき、本研究の基盤の上に、さらなる大きな学術的発展を企図している。

なお本研究の結果、代表者が科研費基盤研究Aを獲得したほか、構成員のうち、教員の多くが新たな科研費を得たほか、超域の特別研究員であった渡邊 裕美が、「シナプス開口放出を担うシタキシン1A、1B分子の機能の違いとその原因の探索」で日本学術振興会特別研究員RPDに採用され、科研費研究補助者であった本多 敦子が新規プロジェクトの超域特別研究員に採用された。これは本超域研究が成功に終わったことの評価であると考えている。

以上の成果は、参加したメンバーとの共同研究であり、また数多くの学内・学外の研究者のサポートによるものである。超域研究機構として、当プロジェクトを支援いただいた新潟大学、および共同利用スペース配分にご配慮いただいた医学部と合わせて、深謝申し上げます。