

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300112

研究課題名（和文） 成長円錐内シグナル伝達過程のシステム生物学的解析

研究課題名（英文） Systems biological analysis of signal transduction in growth cones

研究代表者

岡 浩太郎 (OKA KOTARO)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：10276412

研究成果の概要（和文）：神経成長円錐内の細胞内シグナル伝達を解析するための蛍光イメージング手法と計算機シミュレーション法を新規に開発し、以下のような成果を得た。

(1) 蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）型センサーを用いることにより cAMP, cGMP, カルシウムイオン濃度を同時計測する新規な手法の開発に成功した。運動時の成長円錐内セカンドメッセンジャー濃度の局所変化を計測し、運動との関係を明らかにした。

(2) 成長円錐内のセカンドメッセンジャー濃度変化をシミュレートすることに成功した。また成長円錐の形状と外部環境を二次元格子上に定義し、各々の格子点における微小時間でのセカンドメッセンジャー濃度変化を算出するシミュレータを実装した。

研究成果の概要（英文）：We developed two methods for analyzing the behavior of the growth cones in neurons: FRET-based imaging technique for visualizing the intracellular second messengers (cAMP, cGMP and Ca²⁺) and quantitative simulation technique for intracellular second messenger concentrations and mobility (elongation and contraction) of the growth cones. Our main achievements are followings.

(1) New types of FRET sensors, simultaneous fluorescent observation equipment, and a software for linear separation of fluorescence were developed for visualizing intracellular second messenger cross-talk. Using this new method, we succeeded to measure the intracellular second messenger dynamics during actively mobile growth cones in detail.

(2) We developed a mathematical model, and it predicted that the concentration of cyclic nucleotide controls the frequency of the emergency of filopodia, and the turning direction of whole structure. We also developed a spatial model based on the above biochemical model. We reconstructed the turning phenomenon of a whole growth cone by setting the movement at each microdomain, which is represented by the lattices in the reaction space.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：システム生物学・神経科学

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：生体生命システム情報学

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の突起先端に位置する成長円錐は糸状仮足、葉状仮足よりなる運動性の高い部位である。この先端部分はアクチンが、また基部には微小管が主要な細胞骨格となっており、神経発生の初期過程に神経を特定なターゲットに誘導する役割を果たすだけでなく、障害を受けた神経における神経再生などに重要な働きを担っており、その機能を理解することは重要である。成長円錐は細胞外マトリックスや神経成長・誘導因子の濃度勾配を検出する高度なセンサー機能としての役割の他に、極めて運動性の高い細胞部位として、神経線維を特定の方向に誘導する重要な機能を有している。成長円錐の誘導を考える際に、成長円錐はどのように外界を認識するのかという問題は重要である。

このような研究には、古くは神経成長因子 NGF の濃度勾配に成長円錐が応答し、濃度勾配を上る方向を検出していることが知られている。その後この神経成長因子には種々のものが知られるようになり、その濃度勾配検出については 1 分子イメージングの手法を利用して成長円錐表面に露出している NGF レセプターに NGF が結合し、細胞内に取り込まれ、さらに核まで輸送されるメカニズムの実験的な研究が行われている (Tani et al. 2005)。また一方で濃度勾配を検出するための物理化学的な理論解析も行われてきている。また細胞外の成長因子の濃度勾配が成長円錐内のセカンドメッセンジャー濃度変化に変換されることも明らかになってきているものの、その制御機構は複雑である。例えば細胞内のサイクリックヌクレオチド (サイクリックグアノシンーリン酸 (cGMP) とサイクリックアデノシンーリン酸 (cAMP)) の濃度比が成長円錐先端の伸長と退縮を決めているという主張がある (例えば Nishiyama et al. 2003)。この研究では神経誘引物質である Netrin-1 の成長円錐ガイダンス機能が、細胞内のサイクリックヌクレオチド比によって制御されているという結果が示されている。しかしながら、これらセカンドメッセンジャークロストークと成長円錐運動との関係調べた研究は皆無である。

2. 研究の目的

本研究では成長円錐における細胞内シグナル伝達とその運動を制御している細胞骨格について、両者の情報クロストークについて十分な理解が必要であるという認識に至った。そのようなクロストークを研究する方法としては、実験的なアプローチとしては成長円錐からの複数の細胞内セカンドメッセンジャーや細胞骨格系のシグナルをリアルタイムに計測する技術が必要であり、またこれ

らのクロストークを定量的に理解するために、情報伝達を解析するための計算機を用いたシミュレーション技術を利用した。

3. 研究の方法

(1) 細胞内セカンドメッセンジャー定量解析方法の確立と成長円錐運動性の計測

異なる蛍光波長を有する複数のセカンドメッセンジャーを定量できる蛍光タンパク質型プローブを導入し、細胞局所でのセカンドメッセンジャー濃度を同時計測する系を構築した。そのために、新規な蛍光タンパク質型プローブの開発、蛍光同時計測のための光学系の開発、ソフトウェアの開発を進めた。この新規光学系を用いて、複数の細胞内セカンドメッセンジャーの動態を可視化した。また成長円錐に関しては、成長円錐中央部 (C ドメイン) と周辺部 (P ドメイン) でのセカンドメッセンジャー濃度を計測しながら、成長円錐運動との関係を解析した。細胞形態変化を担う骨格タンパク質と接着タンパク質を蛍光タンパク質ラベリングし、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(2) 細胞内セカンドメッセンジャーおよび成長円錐動態のシミュレーション

モデルの構築の際には、1. 細胞外シグナルによる cAMP, cGMP 濃度変化、2. cAMP, cGMP による細胞膜上および ER 膜上のカルシウムチャネルのリン酸化、3. 細胞内カルシウム濃度の上昇に伴う細胞骨格系の重合、脱重合、の 3 点に着目した。次に、構築したモデルに対し微分方程式を用いた数式の定義を行い、微小時間における各々の要素の濃度変化をシミュレーションによって解析した。このモデルによって、cAMP, cGMP 濃度変化に応じた細胞骨格系タンパク質重合速度調節による、成長円錐の成長方向制御機構を推定した。次に、このモデルを元に、神経細胞内部での局所的なカルシウムイオンの移動に cAMP/cGMP が深く関与し、マイクロドメインを形成している事実を視野にいれ、空間情報を加味したシミュレーションを行った。空間情報を加味したシミュレーションを行うために、成長円錐の形状と外部環境を二次元格子にて定義し、各格子に対し作成した常微分方程式を計算することで、各々の位置における微小時間での要素の濃度変化を算出するシミュレータを実装した。

4. 研究成果

(1) 細胞内セカンドメッセンジャー定量解析方法の確立と成長円錐運動性の計測

蛍光共鳴エネルギー移動 (以下 FRET と略称する) 型センサーを用いることにより、細胞内から少なくとも 2 種類のセカンドメッセ

ンジャー (cAMP, cGMP, Ca イオンのうちから 2 種類) を計測することを考えた。FRET が起きる蛍光タンパク質の組み合わせは種々考えることができるが、本研究では CFP/YFP と Sapphire/RFP の FRERT ペアをハードウェア制約 (入手可能な光学フィルターとダイクロイックミラーの組み合わせによる) とこれら蛍光タンパク質の蛍光波長等を考慮して決定した (図 1)。

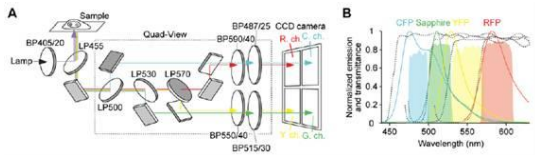


図 1 蛍光観察系 (A) と蛍光タンパク質蛍光波長と種々の光学素子パラメータ (B) との関係

図 1 A には光学系の構成を示している。励起光を 405nm の単一波長として、これによりアクセプタ蛍光タンパク質 (CFP と sapphire) の双方を同時に励起できる。また細胞からの蛍光は 4 枚のダイクロイックミラーと 4 枚の蛍光フィルターにより高感度 CCD カメラ上に、R, C, Y, G の 4 種類の蛍光が得られる。B 図には用いた蛍光タンパク質の蛍光スペクトルとダイクロイックミラー、蛍光フィルターの特性を描いている。この図よりわかるように、4 色の蛍光は重なりを持って CCD カメラ上にイメージを作っていることとなり、これを波長ごとに分解するためのソフトウェア上の工夫が必要となった。

上記のような光学系で得られた蛍光画像をシグナル分離するために、我々は linear unmixing という手法を用いることにした。この方法では、事前に個別の蛍光タンパク質からの蛍光が、どのチャンネルにどれくらい漏れこむのかを調べておく。その漏れこみ状態を行列表現し、その漏れこみ行列の逆行列を用いることにより、蛍光シグナルを完全に分離することができた。

次に cGMP 計測用に蛍光タンパク質センサーを開発した。このセンサーは phosphodiesterase の cGMP 結合ドメインの N 末側に T-sapphire を、C 末側に赤蛍光を出す dimer2 蛍光タンパク質を接続した融合タンパク質である。HEK293T 細胞中にこのタンパク質センサーを発現させて、それ回収後 200 μ M の cGMP 存在下で蛍光波長を計測したところ、500 nm 近傍で蛍光変化することが明らかとなった。そこで cGMP 濃度に対する FRET ペアの蛍光強度比をグラフに描いてみたところ 40 nM を中心に、蛍光強度比から cGMP 濃度を見積もることが可能であることがわかった。またこのセンサーは同じ濃度範囲において cAMP に関してはほとんど応答しないこ

とも確認できた。

次に新規な Ca センサーの開発を行った。このセンサーは先に述べた cGMP センサーと同じ蛍光タンパク質の FRET ペアを用いており、この 2 つの蛍光タンパク質に挟まれるように Calmodulin の Ca イオン結合部位が挿入されている。このセンサーも 500 nm 付近の蛍光が Ca イオン濃度 (10^{-8} M - 10^{-3} M) に応答することが、*in vitro* のセンサー評価から明らかとなった。また同様な Ca センサーを Sapphire と DSRed の蛍光タンパク質の組み合わせでセンサーとして細胞内に発現させてみたところ、我々が今回開発した T-Sapphire/dimer2 との組み合わせの方が有意に明るいことが判明した。

これらセンサーにより、薬物刺激とは異なる生理的な応答が検出できるかを心筋細胞で調べた (図 2)。

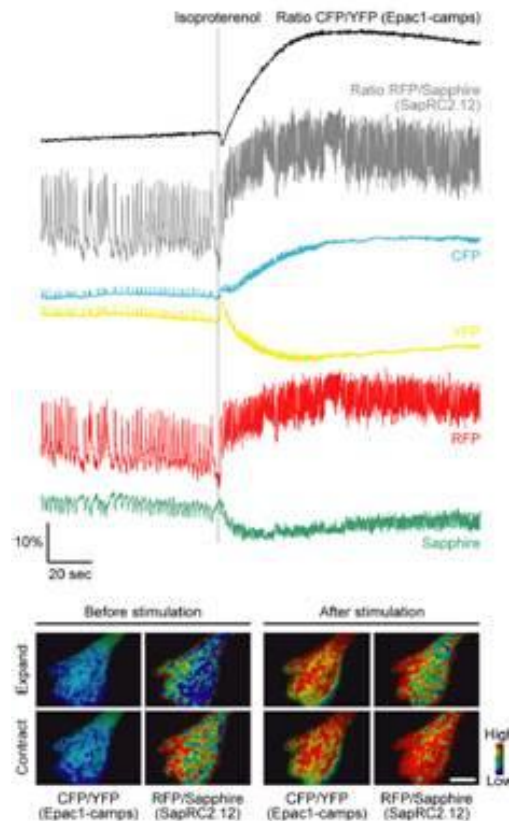


図 2 拍動する心筋細胞における細胞内 Ca イオンと cAMP 濃度の同時計測例

その結果、高速に伸縮をくりかえすラットの心筋細胞内で起きている、Ca 濃度の激しい変化と、cAMP の濃度上昇を、世界で初めて同時計測することに成功した。Dual-FRET イメージングにより、心臓の収縮力を高める薬 (isoproterenol) の刺激により細胞内 cAMP 濃度は急激に上昇し (一番上のグラフ)、それに伴って心拍上昇に伴う Ca イオン濃度変化 (上から 2 番目のグラフ) が計測されてい

る。また下図では単一細胞で cAMP 濃度変化と Ca²⁺ イオン濃度変化がイメージとして得られていることが示されている。心筋細胞ではカルシウム濃度は収縮に伴って振動しているのに対し、cAMP 濃度は振動せず、刺激により徐々に上昇していることを可視化することに成功した。

次に一般的に用いられている CFP (シアン色) と YFP (黄色) の FRET センサーとは異なり、BFP (青色) と光らない YFP 「Dark YFP」を組み合わせれば、青色一色の蛍光を発するバイオセンサーが作れるのではないかと、というコンセプトの下、重要な生体分子の一つである環状グアノシンリン酸 (cGMP) を計測する青色一色のバイオセンサー-Cygnus (シグナス) を開発した。このセンサー-cGMP 濃度の増加に伴い、その蛍光は減少するタイプの蛍光センサーである。

その結果、たとえば生物の発生時の神経回路形成を協調して制御する cGMP と環状アデノシンリン酸 (cAMP) とカルシウムイオン (Ca²⁺) の、三つの生体分子の濃度変化を、一つの細胞内から世界で初めて同時計測することができた (図 3)。この図は、CFP/YFP の蛍光 cAMP センサータンパク質と赤蛍光化合物の Ca²⁺ センサーと組み合わせ、刺激に対する細胞内現象を計測例である。

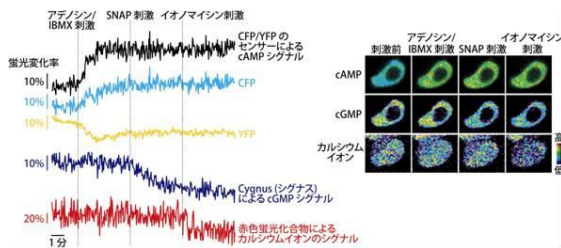


図 3 新たに開発した青色蛍光の環状グアノシンリン酸 (cGMP) センサー-Cygnus (シグナス) により、細胞内のカルシウムイオンと環状アデノシンリン酸 (cAMP) と cGMP を同時にモニターした実験

薬物の刺激による細胞内 cAMP 濃度変化 (一番上のグラフ)、cGMP 濃度変化 (下から 2 番目のグラフ)、カルシウム濃度変化 (一番下のグラフ) が同時に計測されている。

またこれらの新規センサーを成長円錐に導入し、成長円錐中の C ドメインと P ドメインのセカンドメッセンジャー濃度変化を、その運動の様子と同時に調べることに成功した (図 4)。この結果、cAMP は伸長時には P ドメインでより濃度は高くなった。また、黒→緑→水色→紫から停止の状態に移行する際には、cAMP 濃度は低下するが、特に C ドメインでその傾向は顕著だった。また退縮時には、P ドメインに対し C ドメインで濃度は上昇した。cGMP は停止時には C ドメイン、P

ドメインによらずに上昇していた。それに対して、伸長時間には C ドメインでより顕著に濃度上昇した。Ca²⁺ は伸長時に P ドメインで濃度が上昇するのに対し、退縮時には C ドメインで濃度上昇した。

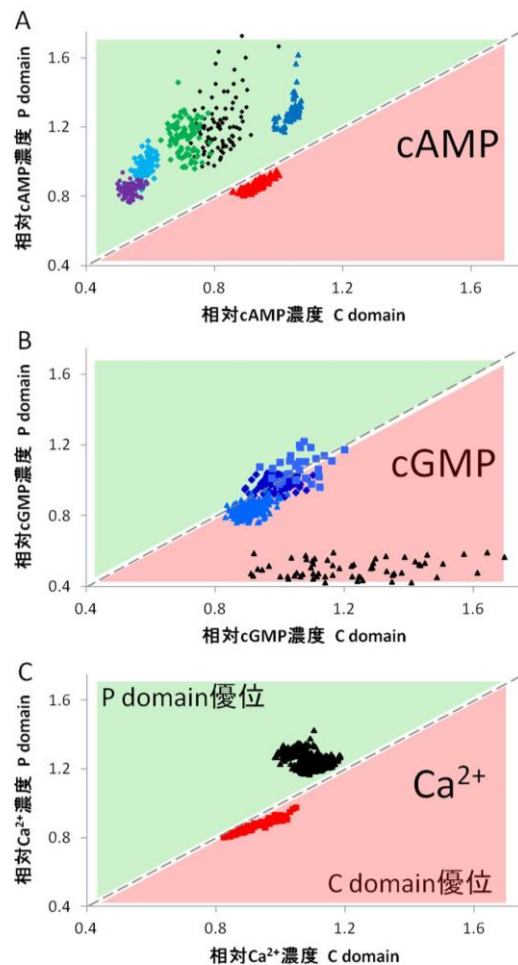


図 4 成長円錐の運動の状態別にみた、部位でのセカンドメッセンジャーの関係

A cAMP の運動と部位での関係、B cGMP の運動と部位での関係、C Ca²⁺ の運動と部位での関係を示す。プロットの色は時間 (A のみ) と運動の変化を示す。黒は伸長、青系が停止、赤が退縮を示す。

またアクチンフィラメントの重合・脱重合を制御しているコフィリンタンパク質の細胞内動態を調べたところ、細胞体積が小さい神経線維部位で拡散律速が起きていることを見いだした。また成長円錐を基質に接着させている接着分子パキシリンを光照射により局所破壊する系を確立した。

(2) 細胞内セカンドメッセンジャーおよび成長円錐動態のシミュレーション

図 5 のようなコンポーネントを含むモデルに対し、cyclic nucleotide の濃度依存的に各チャネルが活性型をとる確率、個別のチ

ヤネル由来のカルシウム濃度、細胞骨格タンパク質(アクチン、チューブリン)の細胞質内での重合型又は単分子濃度を、常微分方程式により定義した。

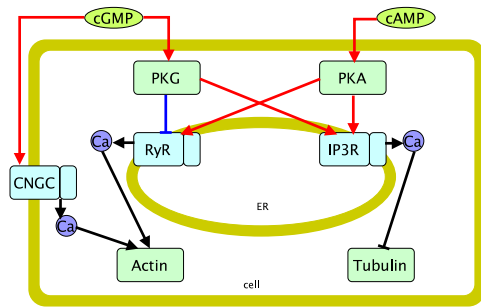


図5 モデル概要 cAMP, cGMP の刺激が3つのカルシウムチャンネルに伝わり、細胞質におけるカルシウムイオンの由来に依存して、アクチン、またはチューブリンの重合が制御を受ける。

シミュレーションの結果を図6に示す。この結果から、成長円錐はcAMP優勢の方向に高い頻度で仮足を伸長させる他、cyclic nucleotide 濃度が高い方向へ成長円錐自体が曲がっていくことが予測された。

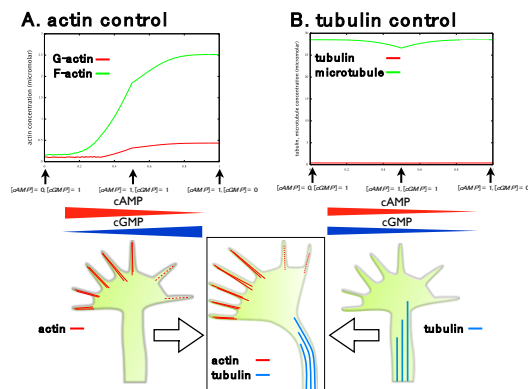


図6 モデルのシミュレーション結果と予想される成長円錐の運動模式図 A. アクチンの重合が促進されることにより、cAMP 高濃度側で高頻度に仮足伸長が起きる。B. cyclic nucleotide 高濃度側でチューブリン重合が阻害されることにより、全体として高濃度側に成長円錐が曲がっていく。

次に、マイクロドメイン毎のカルシウムイオン動態を加味した場合の成長円錐の動きを再現するため、成長円錐を表すシミュレーション空間を複数の格子より構成されると考え、格子ごとのカルシウム動態をシミュレーションし、その結果に応じて骨格タンパク質が伸長するか否か、また新たな因子として進行方向の再現性を決めるためのパラメータをモデルに導入した。結果を図7に示す。

各格子単位で、図6に示した制御が行われ、かつ1ステップ前の自己の成長方向と同じ方向に進むかどうかをランダムに決めた場合、成長円錐全体としてcAMP優勢側に仮足が集まり、伸長しやすいことが予測された。

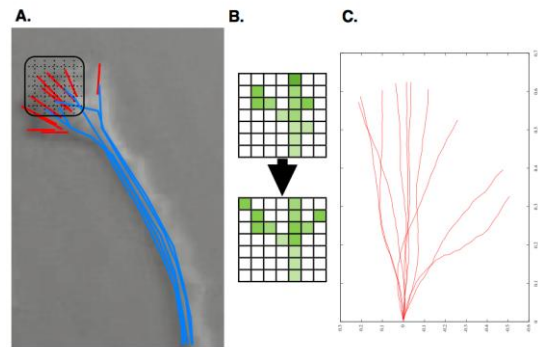


図7 成長円錐空間モデル成長円錐の伸長していく空間を格子に分け(A)、行列情報に変換する(B)。格子ごとにカルシウム濃度の変化をシミュレーションして、その中での成長距離と方向を決定する。これらで一つの神経細胞の成長円錐を表すと、cAMP 高濃度側で仮足出現頻度が増し、伸長速度も速くなる(C)。

以上本研究において、神経細胞成長円錐を含む細胞局所において、重要な3種類のセカンドメッセンジャーを計測するための新規計測方法を開発し、また実際に成長円錐内の局所部位であるCドメインとPドメインについて、従来困難であった運動中のセカンドメッセンジャー濃度変化を可視化・定量することに成功した。また一方で、成長円錐内のセカンドメッセンジャークロストークを計算機シミュレーションにも成功した。特にこのシミュレーションでは細胞形態が変化する様子を忠実に再現することができる。以上の実験手法とシミュレーション技法を併用することにより、成長円錐だけでなく、運動性の高い種々の細胞の動態についてもシステム生物学的な定量評価が可能になるものと期待される。

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)

①Yusuke Niino, Kohji Hotta, Kotaro Oka, “Blue Fluorescent cGMP Sensor for Multiparameter Fluorescence Imaging”, PLoS one, 5(2), online Journal, 2010, 査読有。

②Yusuke Niino, Kohji Hotta, Kotaro Oka, “Simultaneous Live Cell Imaging Usin

g Dual FRET Sensors with a Single Excitation Light”, PLoS one, 4(6), online Journal, 2009, 査読有.

[学会発表] (計 8 件)

- ① T. KOBAYASHI, K. Hotta, K. Oka, “Kinetic analysis of cofilin rods formation in differentiated PC12 cells”, Society for Neuroscience 2010, Walter E. Washington Convention Center (USA), 16 Nov 2011.
- ② 小林孝彦, 堀田耕司, 岡浩太郎, “細胞局所におけるコフィリンロッド形成の速度的解析”, 第34回日本神経科学大会, パシフィコ横浜 (神奈川県), 2011年9月15日.
- ③ 小林孝彦, 堀田耕司, 岡浩太郎, “コフィリンロッド形成および消失の速度論的解析”, 第20回日本バイオイメーjing学会学術集会, 千歳科学技術大学 (北海道), 2011年9月1日.
- ④ 佐久間逸, 山崎亮輔, 新野祐介, 広井賀子, 舟橋啓, 岡浩太郎, “数理モデルによる神経成長円錐の運動機構解析” 定量生物学の会 第3回年会, 東京大学生産技術研究 (東京), 2010年11月28日.
- ⑤ R. Yamazaki, Y. Nino, K. Hotta and K. Oka, “Subcellular analysis of paxillin contribution to bradykinin-induced neurite retraction with a photoinactivatable paxillin”, Society for Neuroscience 2010, San Diego Convention Center (USA), 15 Nov 2010.
- ⑥ S. Sakuma, R. Yamazaki, Y. Niino, N. Hiroi, A. Funahashi and K. Oka, “Mathematical analysis of movement mechanism of nerve growth cone”, 11th International Conference on Systems Biology, Edinburgh International Conference Centre, Edinburgh (UK), 12 Oct 2010.
- ⑦ 山崎亮輔, 新野祐介, 堀田耕司, 岡浩太郎, “蛍光タンパク質 KillerRed を用いた神経突起退縮における細胞内パキシリンの部位特異的機能の解析”, 第19回日本バイオイメーjing学会学術集会, 慶應義塾大学 (横浜), 2010年9月9日.
- ⑧ 広井賀子, 舟橋啓, “マイクロ流体デバイス自動制御システムの構築”, 定量生物学の会 第2回年会, 大阪大学吹田キャンパスコンベンションセンター (大阪), 2010年1月10日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡浩太郎 (OKA KOTARO)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号: 10276412

(2) 研究分担者

舟橋啓 (FUNAHASHI AKIRA)
慶應義塾大学・理工学部・准教授
研究者番号: 70324548

堀田耕司 (Hotta KOHJI)
慶應義塾大学・理工学部・専任講師
研究者番号: 80407147

(3) 連携研究者

該当なし