

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500336

研究課題名(和文) 神経突起伸展・成長円錐ガイダンスのFRETイメージングによる解析

研究課題名(英文) Analysis of neurite outgrowth and growth cone guidance by using FRET imaging

研究代表者

中村 岳史 (TAKESHI NAKAMURA)

東京理科大学・生命科学研究所・教授

研究者番号：60362604

研究成果の概要(和文)：

cAMPにより誘導される神経突起伸展機構のうち、ほとんど明らかになっていなかったcAMPから細胞骨格を直接制御する経路について、PKA-STEFG-Rac1が主要な因子として働いていることを見出した。また、NGFによる神経突起伸展制御の機構と、今回明らかになったcAMPによる機構を比較することにより、突起先端部での局所的なRac1とCdc42の活性化が神経突起伸展の最小基本要素であるという作業仮説を立てるに至った。また軸索極性形成におけるRap1Bのinstructiveな役割を明らかにするとともにその下流のシグナル経路を見出した。

研究成果の概要(英文)：

(1) cAMP plays a pivotal role in neurite growth and guidance, but its downstream pathways leading to the regulation of Rho GTPases, centrally implicated in neuronal morphogenesis, remain elusive. We have shown that phosphorylation of STEFG by PKA is critical for Rac1 activation and neurite outgrowth in dbcAMP-treated PC12D cells. (2) We have shown that Rap1B plays an instructive role in neuronal polarization through RalA and Nore1A in addition to PI3-kinase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

神経細胞が特定の相手と機能的な結合をして精妙な神経回路を作り上げる過程で、局所的なガイダンス因子に応答する成長円錐の伸展制御は中心的な役割を果たしている。RhoファミリーG蛋白質およびイノシトールリン脂質制御系は、外部刺激に応答するシ

グナル伝達経路と細胞骨格/輸送等の制御系を結びつける機能分子であり、ガイダンス制御においても、これらのG蛋白質とイノシトールリン脂質制御系がCa²⁺やcAMPと並んでキー分子として働いていることが広く認められている。それにも関わらず、RhoファミリーG蛋白質とイノシトールリン脂質制御系がガイダンス制御機構の中はどう

組み込まれて働いているかについては、実際にはごく限られたことしかわかっていない。それはひとつには、運動している成長円錐で、RhoファミリーG蛋白質活性やイノシトールリン脂質量についての時空間変化を検出するための適切な方法が存在しなかったためである。

研究代表者が2010年度まで所属していた研究室では、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理に基づくプローブを作製して、G蛋白質の活性やイノシトールリン脂質量の局所的な変化を生きた細胞で検出する技術(FRETイメージング技術)の開発を行ってきた。特に研究代表者らは、この技術を使って神経成長因子NGFによる突起伸展のメカニズムを理解することに注力し、NGF刺激により誘導された突起先端部に右図のような局所的なポジティブフィードバックとネガティブフィードバックが存在し、突起形成初期における形態形成の原動力となっていることを明らかにした。同様のメカニズムが、神経突起が成熟して伸び続ける過程や成長円錐ガイダンスの過程でも働いているかどうかを検討することにより、神経突起伸展・ガイダンス制御に共通する形態変化制御シグナルの基本原則が浮かび上がってくるのが期待できる状況にあった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、成熟して伸び続ける神経突起およびガイダンス因子に応答して方向転換する成長円錐でのRhoファミリーG蛋白質活性とイノシトールリン脂質量の時空間変化をFRETイメージング技術で可視化し、その知見をもとに、突起伸展・成長円錐ガイダンス制御に共通する神経細胞の形態変化制御シグナルの基本原則を明らかにすることである。

3. 研究の方法

神経突起、成長円錐でのRhoファミリーG蛋白質活性とイノシトールリン脂質量の時空間変化をFRETイメージング技術で可視化することを中心技術として用い、阻害剤、RNAi法などをそれと併用し、さらに生化学的な方法論も用いてシグナル経路を詳細に検討した。

4. 研究成果

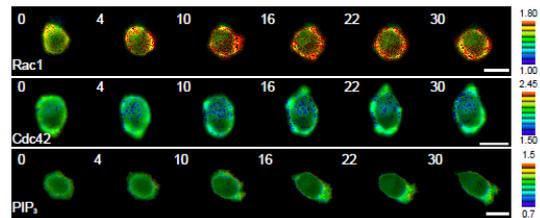
(1) cAMPにより誘導される神経突起伸展機構の解明

1975年にPrasadとKumarによりcAMPがヒト神経芽腫由来の細胞株の神経突起伸展を誘導することが報告されて以来、様々な系で

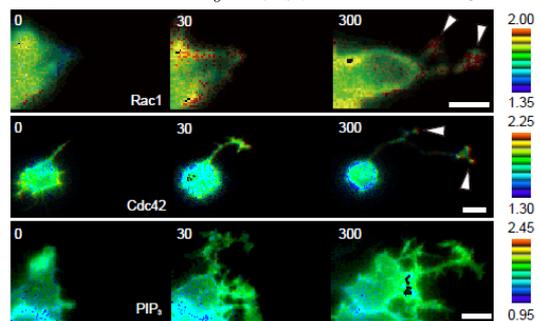
cAMPレベルによる神経突起伸展の促進が見出されている。また、軸索ガイダンスにおいても、MAG(ミエリン結合性糖蛋白質)などによる突起伸展の阻害や反発性ガイダンスを、cAMPレベルの上昇により反転できることが示されている。in vivoでの解析においても、cAMPが神経軸索再生を促進すること、嗅覚レセプター(GPCR)を介したcAMPレベルの上昇が嗅覚神経ネットワークの標的への到達に関与することなどが示されている。

いろいろな組織の細胞でアクチン骨格制御を担っているRhoファミリーGタンパク質は、軸索の成長とガイダンスを含む神経細胞の形態変化においても中心的な役割を果たしている。実際に、近年の研究で、様々な突起伸展因子やガイダンス因子の下流からRhoファミリーGタンパク質に至るシグナル経路が明らかにされている。ところが、cAMPからRhoファミリーGタンパク質に至る経路についてはほとんど不明であった。研究代表者らはこのシグナル経路を明らかにする目的で、FRETイメージングを用いた解析を行なった。

PC12D細胞をdbcAMPで刺激すると、Rac1の活性はゆるやかに上昇して高いレベルを保つ。この時に、神経突起伸展に一般的に必要なと考えられているPIP₃のレベルは変化しない。

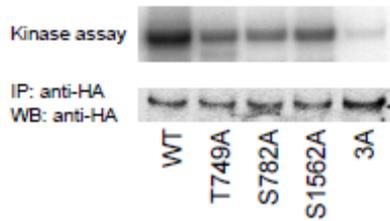


同様の系で5時間の観察を行なうと、5時間後には神経突起の先端部でRac1とCdc42の局所的な活性が認められるが、このときも突起先端部にはPIP₃の集積は見られない。

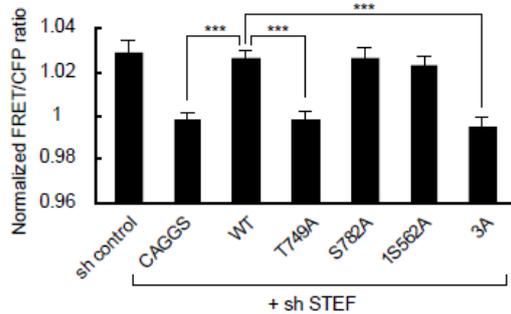


cAMPシグナルの下流には、主にPKAを介する経路とEpac/Rap1を介する経路があるが、この系でのcAMPによるRac1活性化は、PKAとSTEF/Tiam2を介することがRNAi法とFRETイメージングを用いた解析で明らかになった。また、STEFのノックダウンによりdbcAMPによる神経突起伸展は顕著に減少する。in vitroでの解析から、PKAは主にSTEF上にあ

る3か所のセリン/スレオニン(Thr749, Ser782, Ser1562)をリン酸化することがわかった。



その中でも、Thr749のリン酸化がcAMPによるRac1活性化と突起伸展において特に重要である。



脊髄損傷などの再生治療において、実際にcAMP経路の増強が検討されている。この場合、転写因子であるCREB活性化の影響が広範囲に及びことを考えると、比較的低レベルのcAMPを投与した上で、突起伸展シグナルのみを特異的に活性化して相乗的な効果を上げることができれば有効な治療法となる可能性がある。本研究の結果はそうした方向に応用できる可能性を持っていると考えられる。

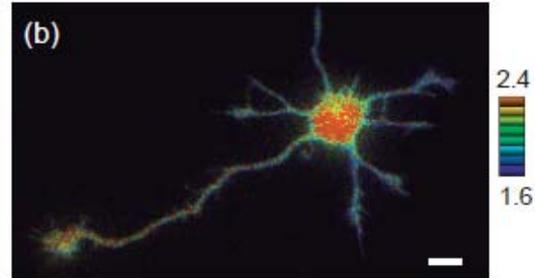
また、NGFによる神経突起伸展制御の機構と、今回明らかになったcAMPによる機構を比較することにより、突起先端部での局所的なRac1とCdc42の活性化が神経突起伸展の最小基本要素であるという作業仮説を立てるにいたった。今後、ほかの刺激による神経突起伸展および3次元での突起伸展の系などで同様の解析を行なって、その作業仮説の検討を行なう予定である。

(2) 軸索極性形成におけるRap1Bの役割の解析

一本の軸索と多数の樹状突起が生じてくるいわゆる「軸索極性形成」は神経の発生過程において重要なステップであり、この10年間でそれに関わる多くの分子が同定されてきた。そのうちのひとつがRasファミリーGタンパク質であるRab1Bであるが、Rab1Bが

どのようなシグナル経路を介して軸索極性形成に寄与しているかは断片的にしか理解されていない。研究代表者らは、FRETセンサーを海馬神経細胞に導入して、ステージ2およびステージ3 (in vitro培養開始後12~24時間)でのイメージングを行なうことでそのシグナル経路の解析を行なった。

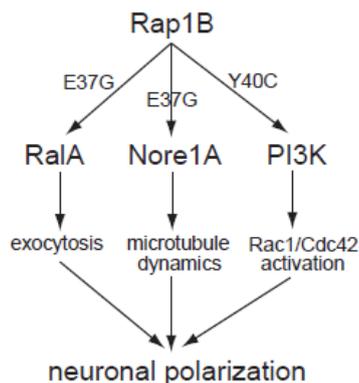
FRETイメージングにより、ステージ2では複数の未成熟な神経突起で見られていた



Rap1Bの活性化が、極性形成が行なわれるステージ3では、将来軸索になると予想される最も長い神経突起 (future axon) で特異的に見出されることがわかった。

これに対し、同様に極性形成において重要な役割を果たすとされるPIP₃の集積やCdc42の活性化は、future axon特異的ではなく、それ以外の神経突起でも伸長が見られる場合には観察されることがわかった。このことから、極性形成においてRap1Bはinstructiveな役割を果たし、PIP₃やCdc42はpermissiveな役割を果たすことが考えられる。

次に研究代表者らは、Rap1Bのエフェクター変異体を用いて極性形成に関与する下流シグナルを明らかにすることを試みた。Rap1B G12V/E37GとRap1B G12V/Y40Cの過剰発現により複数の軸索を持つ神経細胞の割合が有意に増大した。生化学的および細胞生物学的な解析により、Rap1B G12V/E37Gの下流にRalAとNore1Aが存在することがわかった。ステージ3でのRalAの活性化はRap1Bと同様にfuture axonに限られていた。実際、RalAの優勢劣性変異体を発現させた神経細胞では、Rap1B G12V/E37Gによる複数の軸索を持つ神経細胞の増加が有意に減少した。また微小管の動的制御に関わるとされるNore1Aのノックダウンは有意に軸索極性形成を阻害した。一方で、Rap1B G12V/Y40Cは軸索極性形成に必須であるPI3キナーゼにシグナルを流していることがわかった。以上の解析から、Rap1Bは軸索極性形成においてinstructiveな役割を果たし、その下流ではRalA、Nore1A、PI3キナーゼが働いていると考えられる。



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 10 件)

1. Goto A, Hoshino M, Matsuda M, Nakamura T: Phosphorylation of STEF by protein kinase A is critical for Rac1 activation and neurite outgrowth in dbcAMP-treated PC12D cells. *Mol. Biol. Cell* 22: 1780-1790 (2011). 査読有

2. Kiyokawa E, Aoki K, Nakamura T, Matsuda M: Spatiotemporal regulation of small GTPases as revealed by probes based on the principle of Förster resonance energy transfer (FRET): implications for signaling and pharmacology. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51: 337-358 (2011). 査読有

3. Yamada M, Yoshida Y, Mori D, Takitou T, Nakamura T, Atsuko H, Iwane AH, Yanagida T, Yu-Lee L, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S: mNUDC is required for plus-end directed transport of cytoplasmic dynein and dynactins by kinesin-1. *EMBO J.* 29: 517-531 (2010). 査読有

4. Lu A, Tebar F, Alvarez-Moya B, López-Alcalá C, Caivo M, Enrich C, Agell N, Nakamura T, Matsuda M, *Bachs O: A clathrin-dependent pathway leads to KRas signalling on late endosomes en route to lysosomes. *J. Cell Biol.* 184, 863-879 (2009). 査読有

5. 中村岳史、北野正寛、中矢道雄、長田重一、松田道行 食食過程における低分子量 G 蛋白質 Rac1 と Rab5 の活性変化 蛋白質核酸酵素 54, 1114-1118. (2009). 査読無

6. Tsukada Y, Aoki K, Nakamura T, Sakumura Y, Matsuda M, Ishi S: Quantification of local morphodynamics and local GTPase activity by edge evolution tracking. *PLoS Comp. Biol.* 4, e1000223 (2008) 査読有

7. Yamada M., Toba S, Yoshida Y, Haratani K, Mori D, Yano Y, Mimori-Kiyosue Y, Nakamura T, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Ito K, Fushuki S, Setou M, Wynshaw-Boris A, Toyoshima YY, Hirotsune S: A unique role of Lis1 for plus-end tracking of cytoplasmic dynein using microtubules as a freighter. *EMBO J.* 27: 2471-2483. (2008). 査読有

8. Aoki K, Kiyokawa E, Nakamura T, Matsuda M: Visualization of growth signal transduction cascades in living cells with genetically encoded probes based on Förster resonance energy transfer. *Philos. Trans. R. Soc. London. B. Biol. Sci.* 363: 2143-2151 (2008). 査読無

9. Kitano M, Nakaya M, Nakamura T, Nagata S, Matsuda M: Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature* 453, 241-245 (2008). 査読有

10. 中村岳史、北野正寛、青木一洋、松田道行: FRETプローブによる細胞内シグナル伝達のリアルタイムイメージング 実験医学 26, 2692-2698. (2008). 査読無

[学会発表] (計 12 件)

1. 後藤明弘ほか 3 名、dbcAMP-induced Rac1 activation is mediated by Rac1-specific GEF regulated by PKA. *Neuroscience 2010 (SfN annual meeting) 2010 年 11 月、San Diego*

2. 中村岳史ほか 3 名、軸索極性形成における Rap1B の役割の解析、第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学学会大会、第 20 回日本神経回路学会大会合同年会、2010 年 9 月、神戸

3. 中村岳史、松田道行、FRET バイオセンサーと小胞輸送研究への応用、日本バイオイメージング学会学術集会、2010 年 9 月 9 日、東京

4. 後藤明弘ほか 2 名、dbcAMP 及び NGF によって誘導される神経突起形成の PC12D 細胞におけるシグナル伝達と形態変化の違い 第

32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月、名古屋

5. 中村岳史ほか 4 名、Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation, 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会大会合同年会、2008 年 12 月 9 日、神戸

6. 後藤明弘ほか 2 名、cAMP 刺激による PC12D 細胞の神経突起伸展過程におけるシグナル分子の FRET を用いた解析、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年会、2008 年 12 月、神戸

7. 中村岳史、In and out by FRET imaging、視る生物学 3 – イメージングの挑戦 – 2008 年 11 月、奈良

8. 中村岳史ほか 2 名、An essential role for the SHIP2-dependent negative feedback loop in neuritogenesis of nerve growth factor-stimulated PC12 cells. 第 31 回日本神経科学大会、2008 年 7 月、東京

[図書] (計 2 件)

1. Ishido N, Kobayashi H, Arai T, Sako Y, Nagai T, Fukuda M, Nakamura T: How to make FRET biosensors for Rab family GTPases. In Biosensors for Health, Environment and Biosecurity ISBN 978-953-307-155-8, InTech (2011).

2. Nakamura T, *Matsuda M: in vivo imaging of signal transduction cascades with probes based on Förster Resonance Energy Transfer. In Current Protocols in Cell Biology (Bonifacino JS, Dasso M, Harford J B, Lippincott-Schwartz J, Yamada KM eds,) John Wiley & Sons, Hoboken Chapter 14: Unit 14.10. (2009).

[その他]

ホームページ等

<http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~ribsnlab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 岳史 (TAKSHI NAKAMURA)

東京理科大学・生命科学研究所・教授

研究者番号：60362604