

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20700332

研究課題名 (和文) 神経軸索形成因子 CRMP-2 の機能解析

研究課題名 (英文) The functional analysis of key molecule in axon formation, CRMP-2

研究代表者

有村 奈利子 (ARIMURA NARIKO)

玉川大学・脳科学研究所・グローバル COE 准教授

研究者番号：20420375

研究成果の概要 (和文)：脳神経系は極めて精巧な神経回路網を有する。この回路を形成する軸索形成において、重要な分子として CRMP-2 が報告されている。私は CRMP-2 の軸索形成における機能の解析を行い、以下の結果を得た。1) CRMP-2 は相互作用する Slp1 や Rab27 を介して TrkB の順行性輸送を制御している。2) CRMP-2 は cytoplasmic dynein という逆行性輸送を行う分子と相互作用してその機能を阻害する。これらの結果は、CRMP-2 が軸索内部の分子輸送を制御して軸索形成を制御していることを示唆する。

研究成果の概要 (英文)：The brain consists of the remarkably fine neural circuits. This circuits are made of axons, and CRMP-2 previously had been identified as a key molecule in axon formation. I analyzed the functional meaning of CRMP-2 in axon formation, and obtained the following results: 1) CRMP-2 regulates anterograde TrkB transport in axon through the association with Slp1 and Rab27. 2) CRMP-2 binds directly to cytoplasmic dynein, a motor protein of retrograde transport, and negatively regulates its function. These results suggest that CRMP-2 play a role in axon formation through regulating the molecular transport in axon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
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・神経科学・神経薬理学

キーワード：神経伝達物質・受容体

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は主要な二種類の神経突起、一本の軸索と複数の樹状突起を有刺、緻密な神経

回路を形成する。樹状突起は他の神経細胞から信号を受容する。受容された信号は細胞体に集約された後、軸索へと伝導する。軸索は信号をその末端まで伝達し、他の神経細胞へ

と伝達する。このような二種類の異なる神経突起は、神経細胞の機能に重要である。しかしながらこれら二種類の神経突起がどのようにして運命決定され、必要な特徴を獲得してゆくのかについては不明な点が多い。私の所属していた研究室では collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) という蛋白質が神経極性形成や軸索形成分化に重要であることを見出した。また、PI3-kinase や GSK-3 β も極性形成に関与することを明らかにしてきた。私は CRMP-2 が Rho キナーゼによりリン酸化されることを報告してきたが、これらリン酸化の意味や物質輸送における CRMP-2 の役割は不明であった

2. 研究の目的

本研究課題では、CRMP-2 を含む軸索形成分子機構を解明することを目的とする。具体的には以下の3点を目的とした。

- (1) CRMP-2 及び CRMP family のリン酸化による機能制御の解明
- (2) CRMP-2 が制御する小胞輸送の制御機構の解明
- (3) CRMP-2 による逆行輸送の制御機構の解明

CRMP-2 はその一次配列上に多様なキナーゼによるリン酸化サイトを持つことが示唆されているリン酸化蛋白質である。近年私達は、CRMP-2 が Rho キナーゼや GSK-3 β によってリン酸化されると、軸索を伸長させる活性を失っていることを報告した。また CRMP-2 がアルツハイマー病脳では高度にリン酸化されて神経原繊維中に存在することや、ダウンシンドローム症脳では異常なリン酸化の増減が見られること等が報告されている。しかしながら何故リン酸化 CRMP-2 の量が増減するのか、またそれらはどのようにして神経細胞の生理機能に影響するのかについては明らかにされていなかった。本研究では CRMP-2 をリン酸化する多種のキナーゼの同定とリン酸化による活性制御機構の解析も行う。CRMP-2 はその神経細胞内含有量が非常に多い分子であり、多種多様な分子と相互作用して軸索の運命決定や軸索形成を促進していると考えられる。一般に軸索の形成、伸長は細胞骨格の形成や膜の輸送により促進していると考えられる。私は、CRMP-2 が小胞輸送に関与する synaptotagmin-like protein1 (Slp1) と結合することを見出した。本研究では、軸索の運命決定に必要な膜の輸送機構に解明と、CRMP-2 による膜輸送の制御機構の解明を目的とする。また軸索内の蛋白質輸送は一般的に軸索の先端方向に向かう順行性気候と細胞体方向に向かう逆行性気候の2つの輸送様式により調節されていると考えられている。以前私は CRMP-2 が順行性輸送の分子モーターである Kinesin-1 と相互

作用することを見出した。一方、私は CRMP-2 が逆行性輸送モーターであるダイニンとの相互作用についてのデータも得ている。本研究では逆行性輸送における CRMP-2 の機能解析も行い、CRMP-2 が神経極性形成及び軸索形成時にどのような分子機構で結合し、どのような影響をダイニンの活性にもたらすかを検討する。

3. 研究の方法

(1) CRMP-2 のリン酸化キナーゼの同定とリン酸化による機能制御機構の解明
CRMP-2 はその一次配列に多様なキナーゼによるリン酸化サイトを持つことが示唆されているリン酸化蛋白質である。しかし、CRMP-2 をリン酸化するキナーゼの報告は少ない。そこで CRMP-2 をリン酸化するキナーゼを網羅的に探索、同定する。CRMP-2 は分子モーターと積み荷分子との結合を仲介する機能を有するが、モーターと積み荷分子との結合乖離については重要な問題でありながら知見がほとんどない。リン酸化による CRMP-2 と Kinesin-1 との結合乖離の変化や軸索内輸送における意義について検討する。

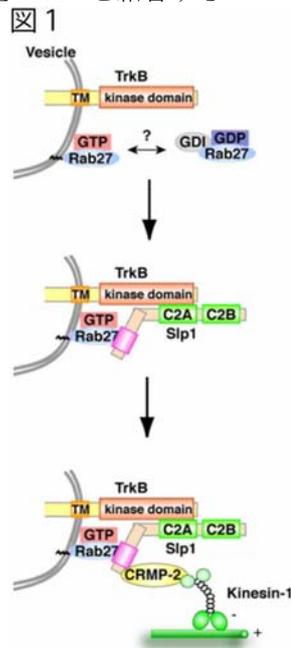
(2) CRMP-2 結合分子 synaptotagmin-like protein1 (Slp1) の解析
神経極性制御因子である CRMP-2 は過剰発現させると複数の軸索を形成する。しかしながら、軸索の形成に必要なと考えられる細胞膜の輸送とその制御機構についてはほとんど明らかにされていない。私はこれまでに CRMP-2 が Slp1 に結合し、Slp1 の機能を制御することを示す予備的なデータを得ている。Slp1 は Rab27 と相互作用し小胞と相互作用する可能性があるため、これらの点について検討する。具体的には初代海馬神経細胞を用いて Slp1 や CRMP-2 の局在、相互作用を検討する。また CRMP-2 や Slp1 の遺伝子導入や RNA interference 法を用いてノックダウンを行い、表現型の観察を行う。神経成長因子受容体にも着目し、これらの輸送に CRMP-2 や Slp1 がどのような影響を及ぼすか検討する。

(3) CRMP-2 の逆行輸送における機能解析
私はこれまでの研究で CRMP-2 がダイニンと相互作用するという予備的なデータを得ている。ダイニンは軸索の内部で Kinesin-1 と結合し軸索先端に輸送され、軸索先端の小胞や蛋白質を逆行輸送によって細胞体に輸送すると考えられている。しかしこれらの Kinesin-1 やダイニンが軸索内部でどのように制御され、順行性と逆行性の制御を行っているのかについては不明である。私は CRMP-2 が Kinesin-1 とダイニンに結合するという知見から輸送方向の選択制に CRMP-2 が

関与していると考えている。この仮説を検討するために、細胞生物学的、生化学的検討を行う。具体的にはダイニンにより輸送される微小管などに着目し、CRMP-2やKinesin-1の過剰発現によりどのような影響をうけるかを検討する。

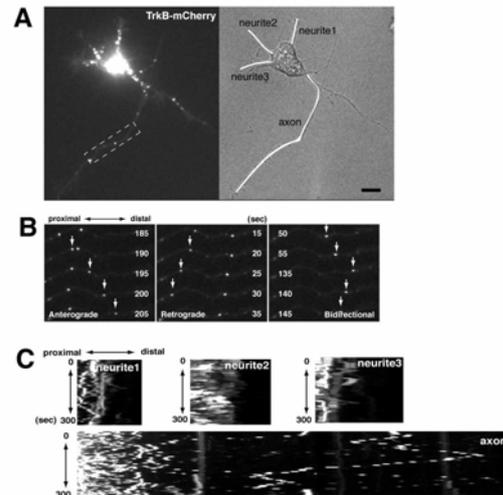
4. 研究成果

(1)以前の研究で私は、CRMP-2の免疫染色を神経細胞を用いて行くと、少数の小胞状の染色像が得られることから、CRMP-2は小胞輸送に関与すると考えていた。そこでCRMP-2がどのような小胞と相互作用しうるかについて検討した (Arimura et al., *Developmental Cell* 16, 675-86, 2009)。軸索形成に重要な分子として神経成長因子とその受容体が知られている。特に海馬神経細胞を含む中枢神経系では、神経成長因子のBDNFの受容体TrkBが、軸索遠位側に存在し、軸索伸長や神経伝達、生存などを制御している。軸索先端部がBDNFで刺激されると、TrkBはエンドサイトーシスされ、軸索先端から細胞体へ逆行性に輸送される。しかし、細胞体から軸索先端にどのようにしてTrkBが輸送されるかは明らかではなかった。我々はCRMP-2とTrkBの共染色を行い、2つの分子が同じ小胞に存在することを見出した⁶⁾。また、免疫沈降法を行い、CRMP-2とTrkBが共沈降することを明らかにした。ところが、CRMP-2とTrkBは直接には結合しなかった。そこで、CRMP-2とTrkBを介在する分子を探索したところ、Slp1 (synaptotagmin-like protein1)を見出した。Slp1は活性化型Rab27と結合するエフェクター分子であり、N末側にRab27結合部位を、C末側に2つのカルシウム結合部位を有する(図1)。海馬神経細胞において、Slp1とRab27は小胞状に共局在していた。Slp1はCRMP-2とN末端側で直接結合し、活性化型Rab27と三者複体を形成した。また、Slp1はCRMP-2を介してKLCと結合した。ラット脳抽出物からTrkBを免疫沈降すると、Slp1とRab27と共にKIF5とKLCの共沈降が確認された。Slp1はC末側のカルシウム結合部位でTrkBと結合した(図1)。



これらの結果から、TrkB/Slp1/Rab27/CRMP-2/Kinesin-1複合体の存在が明らかとなった。次に、これらの分子を介してTrkBが軸索先端に輸送されているか否かを検討した。TrkBにmCherryという赤色蛍光蛋白質を融合させたTrkB-mCherryを作成し、その挙動を観察した。培養海馬神経細胞では、TrkB-mCherryは軸索において両方向へ活発に輸送されることが確認された(図2)。

図2



Slp1やRab27、CRMP-2、KLCの発現をsiRNAを用いたRNA干渉法により抑制すると、①輸送されずに停止しているTrkB-mCherry小胞の数が増加、②軸索遠位方向に輸送されるTrkB-mCherry小胞の数は減少、③内在性のTrkBの軸索遠位部での数が減少、④BDNF依存的なERKのリン酸化も減少することなどが明らかとなった。

さらにこれらの輸送複合体形成はCRMP-2のリン酸化により抑制されることも見出した。これらの結果は、TrkB受容体を含む輸送小胞はSlp1/Rab27複合体やCRMP-2を介してKinesin-1と結合し、軸索遠位方向に輸送されることと、この輸送がBDNF刺激による軸索伸長機構を制御しうることを示唆している。Rab27はGTP結合活性化型のみSlp1と複合体を形成する。TrkBのみならず、様々な成長因子の受容体や接着分子が、軸索遠位方向に選択的に輸送され、軸索の伸張やその機能発現に重要な役割を果たすと考えられているが、輸送の制御機構は殆ど不明である。今後は、リン酸化やGDP/GTP交換反応を介して、種々の輸送複合体形成がどのように制御されるのかといった問題の解決が期待される。

(2)このTrkBの輸送は順行性輸送と呼ばれるが、軸索内には逆行性と呼ばれる軸索遠位から細胞体への輸送があることが知られている。物質を正しく軸索内部に配置するために

は、順行性及び逆行性輸送が協調的に機能する必要があるが、その分子的相関関係については不明な点が多かった。私は CRMP-2 と逆行性輸送制御モーター分子ダイニンが相互作用することを明らかにした (Arimura et al., Journal of Neurochemistry 111(2), 380-90, 2009)。CRMP-2 はダイニン (cytoplasmic dynein) の重鎖 (heavy chain) と直接結合した。CRMP-2 のダイニン結合部位を細胞内で過剰発現させると、ダイニン誘導型の微小管の輸送が阻害された。以上の結果から、CRMP-2 はダイニンに結合して、ダイニンの機能を阻害する可能性が示唆された。CRMP-2 は Kinesin-1 に結合して物質の順行性輸送を仲介する一方で、ダイニンに結合して逆行性輸送を阻害し、結果として、順行性輸送を適切に制御しているのかもしれない。今後は Kinesin-1 とダイニンの挙動に絞って両者の動きを総合的に検討し、これらの関係性を明らかにしてゆくことが必要であると考えられる。

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 4 件)

① Arimura N, Kimura T, Nakamuta, S, Taya S, Funahashi Y, Hattori A, Shimada A, Ménager C, Kawabata S, Fujii K, Iwamatsu A, Segal RA, Fukuda M, & Kaibuchi K. Direct interaction of Slp1 and Rab27 with TrkB receptor regulates its anterograde transport in axons. *Developmental Cell*, 査読有, 16, 675-86, 2009.

② Arimura N, Hattori A, Kimura T, Nakamuta S, Funahashi Y, Hirotsune S, Furuta K, Urano T, Toyoshima YY, Kaibuchi K. CRMP-2 directly binds to cytoplasmic dynein and interferes with its activity. *Journal of Neurochemistry*, 査読有, 111(2), 380-90, 2009.

③ Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, Sobue G. TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases. *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 284, 22059-66, 2009.

④ Patrakitkomjorn S, Kobayashi D, Morikawa T, Wilson MM, Tsubota N, Irie A, Ozawa T, Aoki M, Arimura N, Kaibuchi K, Saya H, & Araki N. Neurofibromatosis type 1 (NF1) tumor suppressor, neurofibromin,

regulates the neuronal differentiation of PC12 cells via its associating protein, CRMP-2.

Journal of Biological Chemistry, 査読有, 283, 9399-413, 2008.

[学会発表] (計 4 件)

① Nakayama Y, Arimura N, Yamagata T, Tanji J, Hoshi E. : Involvement of subareas within the dorsal premotor area (PMD) in a conceptually demanding visuomotor task. *Neuroscience2009*, 2009.10.19, Chicago

② Funahashi Y, Arimura N, Nakamuta S, Kaibuchi K. プロテオミクス解析による、Slp1 相互作用タンパク質として PI 3-kinase の同定、第 32 回日本神経科学大会、2009.9.18、名古屋

③ Funahashi Y, Arimura N, Kaibuchi K. Identification of Slp1-interacting-protein in neuron. *BMB2008*, 2008.12.9、Kobe

④ 有村奈利子、中牟田信一、船橋靖広、貝淵弘三 : Rab27 and Slp1 regulate anterograde transport of TrkB receptors in axons. 第 60 回日本細胞生物学会大会、2008.6.29、神戸

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/Yakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有村 奈利子 (ARIMURA NARIKO)

玉川大学・脳科学研究所・グローバル COE 准教授

研究者番号 : 20420375