

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790239

研究課題名 (和文) 神経突起伸長における PLCdelta3 の生理機能の解明

研究課題名 (英文) Physiological function of PLCdelta3 in neuronal outgrowth

研究代表者

河内 全 (KOUCHI ZEN)

東京薬科大学・生命科学部・研究員

研究者番号：70322485

研究成果の概要 (和文)：Phospholipase Cd3 (PLCd3) はイノシトールリン脂質代謝において二種の主要なセカンドメッセンジャー (IP3, DAG) を産生する酵素であり、神経組織に多く発現が見られる。我々は子宮内エレクトロポレーションによりマウス胚にて大脳皮質における PLCd3 の発現をノックダウンすると大脳皮質発生時に見られる神経細胞の移動が阻害されることを見出した。更に小脳顆粒細胞や神経芽腫細胞の分化過程で PLCd3 をノックダウンすると神経突起の伸長が阻害されることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：Phospholipase Cd3 (PLCd3) is a key enzyme, which generates two second messengers including IP3 and DAG in phosphatidylinositol signaling and is highly expressed in neuronal tissues. We found that PLCd3 knockdown in cerebral cortex of E14 embryo by *in utero* electroporation caused the migratory inhibition of cortical neurons in developing cerebral cortex. Furthermore, we demonstrated that neuronal outgrowth was significantly inhibited in cerebellar granule cells or neuroblastoma cells when PLCd3 was transiently knockdowned during differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞内シグナル伝達、ホスホリパーゼC

1. 研究開始当初の背景

PLCはd1, d3, d4の3種類のアイソザイムが存在する。ノックアウトマウスを用いた解析から PLCd1 及び PLCd4 は各々表皮の恒常性維持や精子先体反応に重要な役割を持つこ

とが示されていたが、PLCd3 ノックアウトマウスは顕著な表現型の異常を示さず、その機能は不明であった。PLCd3 は大脳皮質や小脳等の神経組織に多く存在するため、脳における PLCd3 の生理機能を解明するこ

とを試みた。

2. 研究の目的

神経突起伸長及び神経細胞移動における PLCd3 の機能を明らかにする。また PLCd3 によって制御される神経突起形成に関わる細胞内シグナル伝達機構を解明する。

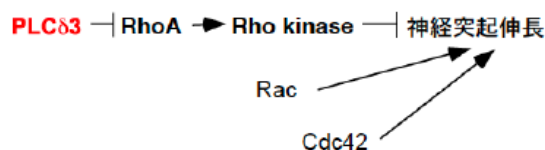
3. 研究の方法

PLCd3 は大脳皮質や小脳等の神経組織に多く存在する。(1) E14 胚において大脳皮質の PLCd3 を子宮内エレクトロポレーション法にてノックダウンし、ノックダウン細胞を GFP 陽性細胞として可視化することにより、大脳皮質板形成過程における神経細胞の移動(生後2日目)や先導突起の形成(生後0日目)に及ぼす影響を *in vivo* レベルで解析した。

(2) 生後2日目に単離した小脳顆粒細胞の初代培養系において PLCd3 を一過性にノックダウンすることにより神経突起の形成に及ぼす影響について解析した。(3) PLCd3 を多く発現する神経芽腫細胞 Neuro2a を血清除去、或いはレチノイン酸処理により分化誘導した系を用いて PLCd3 のノックダウンが神経突起伸長に及ぼす影響を調べた。突起伸長は細胞体の2倍の長さ以上の神経突起を有する細胞の割合を突起伸長率として定義することにより定量化した。また(4) PLCd3 ノックダウン細胞に PLCd3 の活性変異体や他の PLCd アイソザイムを導入することにより神経突起形成に PLCd3 活性が重要であるか否かについて解析した。更に(5)血清除去による Neuro2a 細胞の分化モデルをもとに突起伸長に重要なアクチン細胞骨格系を制御する Rho ファミリー蛋白質に着目し、PLCd3 ノックダウン細胞に Rho 活性変異体を導入、或いは Y-27632 等の Rho キナーゼ阻害剤で処理することにより、PLCd3 によって制御される Rho シグナル伝達経路が神経突起形成に関与することを明らかにした。

図1 PLCδ3によるRhoファミリー蛋白質シグナルの制御と神経突起伸長

RacやCdc42は神経突起伸長を促進するのに対してRhoA活性の上昇は神経突起の伸長を抑制する。PLCδ3はRhoAの発現を選択的に阻害することにより、神経突起の伸長を促すと考えられる。



4. 研究成果

(研究の主な成果)

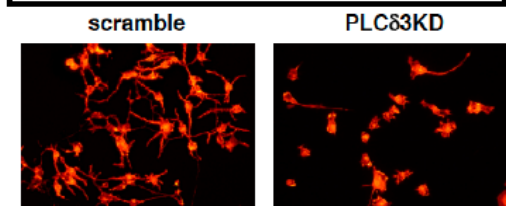
(1) PLCd3 を E14 胚の大脳皮質においてノックダウンした結果、生後2日目において皮質板形成過程における大脳皮質ニューロンの移動が顕著に阻害された。また PLCd3 ノックダウン細胞では大脳皮質ニューロン移動時の先導突起の形成が顕著に阻害されていた。神経細胞の向きはノックダウンによる影響を殆ど受けなかったことから、大脳皮質発生時において PLCd3 は先導突起の形成を制御することにより大脳皮質ニューロンの移動を制御することが示唆された。

(2) 小脳顆粒細胞を単離し、PLCd3 を一過性にノックダウンした後に分化誘導した結果、神経突起の形成が顕著に阻害された。

(3) Neuro2a 細胞を用いて PLCd3 を一過性にノックダウンした後に血清除去、或いはレチノイン酸処理により分化誘導した結果、神経突起の形成が顕著に阻害された(図2)。また GFP-PLCd3 を PLCd3 ノックダウン(KD)細胞に導入したところ、神経突起形成が回復することを見出した。また PLCd3 ノックダウンによる突起伸長の阻害は PLCd1 の導入によりレスキューされないことを示し、PLCd3 によるアイソザイム特異的な機能が神経突起伸長を制御することを明らかにした。

図2 分化後のNeuro2a細胞におけるPLCδ3による突起伸長の阻害

Neuro2aでPLCδ3を図2と同様にノックダウンし、分化を誘導した。コントロール(scrambled)及びPLCδ3KD細胞のアクチンフィラメントを蛍光ファロイジンで細胞染色した。PLCδ3KD細胞では殆どの細胞で神経突起の退縮が見られた。



(4) PLCd3KD細胞に活性変異体 H393A 及び恒常的活性化(CA)変異体を Neuro2a 細胞に導入し、分化誘導したところ、H393A 導入細胞では神経突起形成の阻害が見られたが、CA変異体では神経突起伸長の異常な亢進が見られた。またPleckstrin homology domain中に存在するPIP2結合部位に点突然変異を導入した変異体(CA-R79D)では、野生型 PLCd3 と比較して PLC 活性は著しく低下していた。CA-R79D 発現細胞では分化誘導後の神経突起形成の阻害が認められたことから PLCd3 活性が正常な神経突起伸

長に重要であることを明らかにした。

(5) PLCd3KD 細胞に Rho ファミリー蛋白質 (Cdc42, Rac1, RhoA) を導入し、血清除去による分化誘導時における神経突起形成に及ぼす影響を解析した結果、ドミナントネガティブ型 RhoA を導入した PLCd3KD 細胞においてコントロールレベル (scrambled 配列を持つベクターを導入した細胞) とほぼ同程度にまで神経突起の回復が見られた。一方、他の Rho ファミリー活性化変異体は PLCd3KD による突起伸長阻害をレスキューできなかった。また Rho キナーゼ阻害剤 (Y-27632) で PLCd3KD 細胞を処理したところ、PLCd3KD により阻害された突起形成が回復することを見出した。GTP 結合型 RhoA 量を指標に RhoA の活性化レベルを定量化した結果、分化誘導後のコントロール細胞では活性化型 RhoA 量が減少していたが、PLCd3KD 細胞では分化前後において RhoA 活性に変化が見られなかった。また分化前後におけるコントロール細胞と PLCd3KD 細胞における Rho ファミリー蛋白質の発現レベルの変化を解析した結果、コン

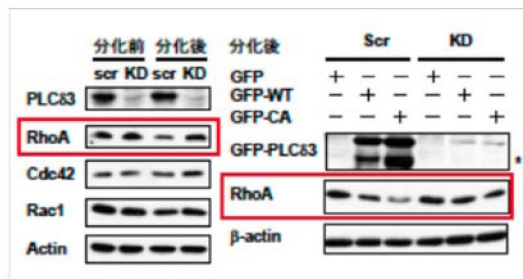


図3 分化後のNeuro2a細胞における PLCβ3によるRhoA発現量の抑制
Neuro2a細胞においてPLCβ3をノックダウンし、24時間後に血清を除去することにより分化を誘導した。48時間後にコントロール (scr) 及びPLCβ3KD細胞を回収し、Rhoファミリー蛋白質の発現量を調べた。分化後特異的にPLCβ3はRhoA発現量を低下させることが明らかとなった (左図)。また分化後に恒常的活性化型 PLCβ3 (GFP-CA) をコントロール細胞或いはPLCβ3KD細胞に発現させると、GFP-CA発現細胞では野生型PLCβ3発現細胞 (GFP-WT) に対してRhoA発現量の低下が見られた (右図)。

トロール細胞では分化誘導後に RhoA の発現量の低下が認められたのに対して PLCd3KD 細胞では RhoA 量が変化しなかった (図 3)。

以上の結果より PLCd3 は分化誘導シグナルに応じて Rho 発現量を負に制御することにより Rho/Rho キナーゼシグナルを抑制し、神経突起の伸長に関与することを明らかにした。また PLCd3 による神経突起伸長の制御には

PLC 活性が重要であることを示した。

(得られた成果の国内外における位置づけ)

種々のイノシトールリン脂質代謝酵素のノックアウトマウスに関しては主にシナプス形成の異常や神経細胞死の亢進等、神経機能に異常を生じるケースが多く報告されている。今回見出した PLCd3 のノックダウンで見られる大脳皮質発生時における神経細胞移動の阻害と神経突起形成異常は他のイノシトールリン脂質関連酵素の機能と比較して類を見ない点でユニークな現象である。また大脳皮質発生時の神経細胞移動の異常は滑脳症等の高次精神疾患でも見られ、Ca²⁺シグナルが重要であることも示唆されている。PLCd3 が関わる神経突起誘導メカニズムを明らかにすることにより、イノシトールリン脂質を介した Ca²⁺代謝と脳機能疾患の関連性が明確になることが期待され、インパクト性は高いと考えられる。

(今後の展望)

PLCd3 ファミリーはイノシトールリン脂質代謝において主要なセカンドメッセンジャーを産生する重要な酵素であるが、その活性化機構は未だ明らかにされていない。PLCd3 結合蛋白質を Neuro2a 等の神経芽種細胞に発現させ、本研究手法と同様に神経突起誘導活性を指標にすることにより、その機能を評価することができれば、PLCd3 活性を中心とするシグナル伝達ネットワークを明らかにすることが可能である。PLCd3 の神経機能における関与を明らかにすることにより、アイソザイム特異的なイノシトールリン脂質シグナルの分子基盤に関する数多くの知見が得られることが期待される。

また胚発生時の大脳皮質ニューロンでは分化時に Rho の活性や発現レベルが低下することが知られている。PLCd3 が RhoA 発現量を制御するメカニズムについて解析することにより大脳皮質の神経分化に関する重要な知見が得られることが期待される。また大脳皮質における *in vivo* PLCd3 発現制御システムや大脳皮質ニューロンの分散培養系により PLCd3 が樹状突起や軸索形成にどのように関わるかについて解析することにより神経回路形成や高次脳機能とイノシトールリン脂質シグナルの関連性について明らかになると考えられる。また PLCd3 のノックダウンによる大脳皮質ニューロンの移動阻害は統合失調症等の精神疾患に関わるシグナル因子の異常でも共通して見られる現象であり、*in vivo*における PLCd3 による突起伸長誘導メカニズムを明らかにすることができれば、

高次神経機能の異常に起因する精神疾患の
解明にも大きく寄与することが期待される。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 河内 全、五十嵐隆公、柴山奈美、中村
由和、山口英樹、深見希代子「Neuro2a 細胞の神経突起伸長における PLCd3 の機能解析」第 51 回日本脂質生化学会(2009. 7. 30)、
名古屋
- ② 河内 全、五十嵐隆公、中原正道、柴山
奈美、中村由和、山口英樹、深見希代子
「PLCd3 は Neuro2a 細胞における神経突起
伸長に関与する」第 31 回日本分子生物学
会年会 / 第 81 回日本生化学会大会
(2008. 12. 9)、神戸
- ③ 河内 全、五十嵐隆公、中原真道、中村
由和、山口英樹、深見希代子「PLCd3 は
Neuro2a 細胞における神経突起伸長に関与
する」第 50 回日本脂質生化学会
(2008. 6. 29)、徳島
- ④ 河内 全、五十嵐隆公、中村由和、山口
英樹、深見希代子「Phospholipase Cd3 is
involved in neurite extension in Neuro2a
cells」第 60 回日本細胞生物学会大会
(2008. 6. 6)、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河内 全 (KOUCHI ZEN)
東京薬科大学・生命科学部・研究員
研究者番号：70322485

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：