

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06880

研究課題名（和文）軸索の伸長・再生・変性を支える双方向輸送のG蛋白質シグナルによる制御機構

研究課題名（英文）Mechanism of G protein signals regulating bi-directional axon transport and axon growth, regeneration and degeneration

研究代表者

中村 岳史（Nakamura, Takeshi）

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：60362604

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：神経軸索の再生に不可欠であるTC10は、膜輸送の制御に加えて微小管安定化を通して軸索伸長に働く。この際に神経細胞では、小胞上にあるTC10がPAK2 JNK 微小管制御因子であるSCG10とMAP1Bのリン酸化という経路で局所的にシグナルを流す。Rab7はリソソーム分解経路のマスターレギュレーターであり、アルツハイマー病モデルを使って、Rab7活性を可視化するセンサーにより変性疾患とリンクするRab7活性分布の異常を検索する研究を進めた。AAVによりRab7センサーを神経特異的に発現させ、共焦点顕微鏡によるFRETイメージングでのRab7活性分布の解析を脳スライス等で行う系を立ちあげた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rho GTPasesによるアクチン骨格制御は詳細に明らかにされているが、微小管制御の分子機構は多くの点が不明である。本研究により、神経細胞においては小胞上のTC10が局所的に微小管安定化に働くことを示し、Rho GTPasesと微小管制御をつなぐシグナル経路を初めて明らかにした。またTC10による微小管安定化経路が軸索再生・変性の決定過程に重なって働く可能性が示され、今回の知見は軸索変性治療の開発において有用と考えられる。神経変性疾患とリンクするRab7活性分布の異常を検索するシステムを本研究で立ち上げたことにより、神経変性疾患の発症と細胞内輸送の障害を結び付ける解析系を提供できる。

研究成果の概要（英文）：TC10, which is critical for axon regeneration, promotes axon outgrowth through microtubule stabilization in addition to membrane addition to the plasma membrane. In neurons, TC10 on vesicles locally transmits signals through the pathway of PAK2 JNK SCG10 and MAP1B, which regulate microtubule stability. Since Rab7 is a master regulator of the lysosomal degradation pathway, we have searched for abnormalities in the distribution of Rab7 activity linked to the onset of degenerative diseases using FRET sensor in Alzheimer's disease models. For this purpose, we have established a system in which the Rab7 sensor is expressed specifically in neurons by AAV and thereby the distribution of Rab7 activity is analyzed by confocal FRET imaging in neurons and brain slices.

研究分野：分子・細胞神経科学

キーワード：軸索伸長 軸索再生 軸索変性 微小管 細胞内輸送 G蛋白質

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回路を作り上げる過程で、局所的なガイダンスキューに応答する軸索の伸長制御が中心的な役割を果たしている。また、でき上がった回路の軸索が損傷を受けると、環境や神経細胞の成熟度によって、あるものは再生して標的に再投射し、あるものは軸索が変性して細胞自体の死につながる。この軸索の再生と変性のシグナル経路の間には分子レベルで重要なオーバーラップがあることが見出されている。さらには、損傷で起きる軸索変性と、神経変性疾患の初期に生じる軸索変性とを関連づけて理解できると想定されている。こうした軸索の伸長・再生・変性というマクロな現象を支えるものとして軸索における順行・逆行輸送があり、その双方向輸送を Rab 分子などの G 蛋白質が時空間的に制御するという構造になっている。ところが、膜輸送が時空間的に変動し続ける局所的な事象の集まりであることや、個々の G 蛋白質が結合するエフェクターが多様であるために、制御マシナリーの実体は十分には理解されていない。

2. 研究の目的

神経軸索の伸長・再生・変性というマクロな過程を共通して支えるものとして軸索内部での順行と逆行の輸送があり、Rab 分子などの G 蛋白質がモーター分子などを介してその輸送を制御している。しかしながらそうした時空間的な制御の実体は多くがブラックボックスのままである。本研究は、軸索の伸長・再生・変性それぞれに大きく関わる軸索での順行と逆行の輸送を G 蛋白質シグナルがどう制御しているかを理解することを目的とする。これにより、軸索の伸長・再生・変性という過程を互いに結びついたものとして統一的に理解するための枠組みを見出すことが期待できる。(1) Rab11 の GTP 結合型と GDP 結合型それぞれが軸索でのリサイクリング小胞の輸送にどう関わって軸索の伸長や再生に働くのかを明らかにする。(2) 輸送に関わる Rho ファミリー G 蛋白質 TC10 の KO マウスで見られる軸索再生やガイダンスに関わる異常がどのような輸送障害から起きてくるかを明らかにする。その解析により、成熟した中枢神経細胞での軸索再生能の低下に TC10 が関わっているかという問いに答える。(3) 成長円錐や軸索のリソソーム分解経路で働く Rab5-Rab7 スイッチ(小胞上で Rab5 が Rab7 に置き換わる機構)の実体を解明し、神経変性疾患と直接結びつく可能性のある軸索変性や輸送障害が、Rab スイッチ機構の変化とどういう関係にあるのかを突き止める。

3. 研究の方法

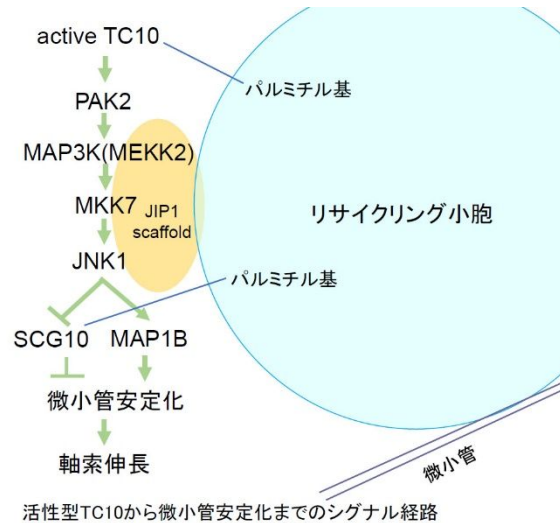
軸索内部での順行と逆行の輸送が神経軸索の伸長・再生・変性というマクロな過程を共通して支えており、Rab 分子などの G 蛋白質がモーター分子などを介してその輸送を制御している。本研究では、G 蛋白質シグナルによる軸索での双方向性の輸送の制御機構のコアをなす 3 つのマシナリー Rab11 とリサイクリング小胞の輸送、TC10 と軸索再生機構、成長円錐及び軸索での Rab5-Rab7 スイッチ機構について、輸送が行われている状態のまま分子活性を可視化できる FRET センサーと高速高精細なイメージングを用いて定量的に調べて、マシナリーの分子機構を解明することを目指す。

4. 研究成果

(1) 軸索伸長における TC10 による微小管安定化機構の解明

哺乳類成体の中枢神経軸索は損傷からの再生能力を失っている。この再生能の欠如は、末梢神経や発生期哺乳類の中枢神経が示す軸索再生能の高さと対照をなす。私たちは、これまでに、膜輸送の制御を通じて神経突起の伸展を促進する TC10 (Cdc42 に近縁な Rho ファミリー G タンパク質) が末梢神経の再生に不可欠であること、および人工的に誘導された中枢神経の軸索再生にも重要であることをノックアウト (KO) マウスの解析により示した。また、本研究で、TC10 が膜輸送の制御だけでなく、微小管を安定化させて軸索の退縮を防ぐことによって神経突起伸展を促進していることを見出した。TC10 単独の遺伝子欠損で微小管制御に異常が生じることは予想外

の結果であった。TC10 から微小管安定化までのシグナル経路を明らかにすることを目的として海馬初代培養神経細胞を用いて解析を行った。TC10 は細胞膜と Rab11 陽性小胞に存在し「TC10 活性は小胞上で高く細胞膜上で低い」ことがわかっている。TC10 欠損により、安定な微小管のマーカであるアセチル化チューブリン量が低下する。この表現型は、野生型 TC10 や小胞のみに局在する TC10 変異体でレスキューできるが、細胞膜に局在する TC10 変異体ではレスキューできない。また生化学的



解析により、TC10 PAK2 JNK 微小管制御因子である SCG10 と MAP1B のリン酸化という経路で微小管安定化シグナルが流れるモデル(右上図)を考えている。PAK2、JNK のスキャフォールドである JIP1、SCG10 は TC10 と同じ小胞に存在するというデータと前述のレスキュー実験の結果から、小胞上の TC10 が局所的に微小管安定化に働くと考えられる。TC10 による微小管安定化は TC10 による軸索再生の促進に直接働くと推測され、AAV を用いた検証系を構築した。

(2) 分解経路のマスターレギュレータである Rab7 の解析

後期エンドソームやリソソームで構成される分解経路は細胞内輸送の主要ルートの一つである。リソソームはエンドサイトーシス、オートファジー、貪食の各経路から生体高分子や細胞内小器官などを受け取って分解する役割を持つ。また、変性蛋白質の細胞内蓄積に由来する神経変性疾患の初期病変の多くについて、リソソームの形成と細胞内配置の異常が関わると考えられている。G タンパク質である Rab7 は、オン (GTP 結合型) とオフ (GDP 結合型) の二状態をシャトルする分子スイッチであり、分解経路のマスターレギュレータとして働いている。

エンドソーム経路で働く Rab7 の小胞膜リクルートメントの解析

Rab7 は分解経路のマスターレギュレータとして働いているが、その局所的な活性制御や特定の小胞膜へのターゲティングについては理解が十分でない点が多く、分子機能の生理的意義を考える際に障害になっている。そこで本研究では、Rab7 の活性と局在の関係を新しい視点から見直すことを試みた。

EGFP と融合させた Rab7-T22N 変異体 (ほぼ全てが GDP 結合型) を恒常的に発現する細胞株 (COS-7 細胞および HeLa 細胞) を作製して定常状態で観察した。Rab7-T22N はどちらの細胞株でも細胞質だけではなく小胞膜にも存在していた。一般的に、Rab 分子はオフ (GDP 結合型) 状態では RabGDI と結合して細胞質に存在し、オン (GTP 結合型) 状態では RabGDI から離れて膜に移行して機能すると考えられているが、Rab7 についてはその定説と異なる制御が存在することが示唆された。次に各種エンドソームマーカーと Rab7-T22N の共局在を検討した。初期エンドソームのマーカーとして EEA1 と APPL1 を使用した。Rab7-T22N 陽性小胞の 50% には EEA1 が存在し、20% には APPL1 が存在した。したがって Rab7-T22N 陽性小胞の大部分は初期エンドソームである。LAMP1 (後期エンドソームおよびリソソームのマーカー) および LysoTracker (リソソームのマーカー) は Rab7-T22N とはほとんど共局在しなかった。以前に、4 回膜貫通型蛋白質である RABAC1 (Yip3, RPA1 と呼ばれる) が、RabGDI から Rab を引き離すことで複数の Rab 分子を小胞膜へリクルートすること、RABAC1 と Rab7 の間にある程度の強さの結合があることが報告されている。そこで EGFP-Rab7-T22N 定常発現細胞株で RABAC1 をノックダウンして Rab7-T22N の局在の変化を検討したところ、予想に反してノックダウン細胞ではコントロール細胞よりも多くの Rab7-T22N が小胞にリクルートされた。このように Rab7 には他の Rab 分子と異なる特有の膜ターゲティングが存在することがわかった。

アルツハイマー病とリンクする Rab7 活性分布異常の解析

アルツハイマー病 (AD) 発症の最初期において初期エンドソームの肥大化が認められ、この異常は AD 発症のトリガーとなると考えられている。ただし初期エンドソームを肥大化させるメカニ

ズムについては、初期エンドソームから後期エンドソームへの移行(およびその背景にある Rab5 から Rab7 への移行)の異常が想定されるものの、十分に明らかになっていない。私たちは、Rab5 や Rab7 の FRET センサーを用いることで細胞内分解経路の制御機構の解析を進めており、マクロピノサイトーシスでの初期エンドソームから後期エンドソームへの移行において、マクロピノソーム上で Rab5 活性が低下する必要があるが、この過程には活性型 Rab7 に依存した Rab5 活性化因子 ALS2 の離脱が必要であることを見出した。また、Neuro2A 細胞を使って、優勢劣性型 Rab7 の発現や Rab7 不活性化因子の発現といった Rab7 の持続的な活性低下の誘導により、初期エンドソームで Rab5 活性上昇が起きることを確認している。さらに、アルツハイマー病モデル(swedish 変異体)を使って、Rab7 活性を可視化するセンサーにより変性疾患とリンクする Rab7 活性分布の異常を検索する研究を進めた。AAV により Rab7 センサーを神経特異的に発現させ、共焦点顕微鏡による FRET イメージングでの Rab7 活性分布の解析を脳スライス等で行う系を立ちあげた。

(3)神経突起での輸送過程の Rab11 活性変化の可視化

Rab11 はリサイクリング経路を制御するマシナリーの中心因子のひとつであり、リサイクリング経路が関わるさまざまな細胞機能への関与が報告されている。そのひとつが神経突起伸展であり、その促進にはリサイクリング経路による膜の付加が必要であることがわかっている。そこで、神経突起伸展時の膜制御において Rab11 が組み込まれているマシナリーがどう働いているかを明らかにするために、Rab11 の時空間的な活性変化を可視化する FRET センサーの作製を行い、ダイナミックレンジが最も大きいものとして Raichu-A658 センサーを得た。Raichu-A658 センサーを神経細胞株 N1E-115 に発現させて、神経細胞株の突起上を移動する小胞での Rab11 活性を検討した。停止している小胞上の Rab11 活性の方が移動している小胞上の活性よりも高い傾向があるという結果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kunida Katsuyuki, Takagi Nobuhiro, Aoki Kazuhiro, Ikeda Kazushi, Nakamura Takeshi, Sakumura Yuichi	4. 巻 42
2. 論文標題 Decoding cellular deformation from pseudo-simultaneously observed Rho GTPase activities	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112071 ~ 112071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 須田亮、中村岳史	4. 巻 55
2. 論文標題 蛍光タンパク質の光明滅・光褪色機構	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 67-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeshi Nakamura and Shingo Koinuma	4. 巻 17
2. 論文標題 TC10 as an essential molecule in axon regeneration through membrane supply and microtubule stabilization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 87-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.314297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koinuma Shingo, Negishi Ryota, Nomura Riko, Sato Kazuki, Kojima Takuya, Segi Nishida Eri, Goitsuka Ryo, Iwakura Yoichiro, Wada Naoyuki, Koriyama Yoshiki, Kiryu Seo Sumiko, Kiyama Hiroshi, Nakamura Takeshi	4. 巻 157
2. 論文標題 TC10, a Rho family GTPase, is required for efficient axon regeneration in a neuron autonomous manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 1196 ~ 1206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shingo Koinuma, Misa Miyaji, Akira Hoshina, So Maezono, Naoyuki Wada, Hiroshi Takemura, Yoshiki Koriyama, Sumiko Kiryu-Seo, Hiroshi Kiyama, Michihiro Igarashi, Takeshi Nakamura
2. 発表標題 Active TC10 on vesicles promotes axon outgrowth by stabilizing microtubules through the specific phosphorylation pathway
3. 学会等名 第45回神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮地美沙、鯉沼真吾、秋山涼風、保科光、和田直之、竹村裕、郡山恵樹、桐生寿美子、木山博資、五十嵐道弘、中村岳史
2. 発表標題 軸索再生促進因子TC10はPAK2-JNKを介して微小管を安定化して軸索伸長に働く
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古澤絵菜、間裕太郎、宮地美沙、鯉沼真吾、宮地美沙、福田光則、中村岳史
2. 発表標題 神経系で高発現するRab39Bの細胞内活性分布と分子機能の検討
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳澤利賢、浅岡拳斗、坂下美咲、中村岳史、鯉沼真吾、和田直之
2. 発表標題 ブラフィッシュ rhoq遺伝子変異体におけるヒレ鱗条形成の異常
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鯉沼真吾、間裕太郎、和田直之、福田光則、中村岳史
2. 発表標題 複数の神経・精神疾患に関わるRab39BのFRETバイオセンサーの開発
3. 学会等名 第30回日本バイオイメーjing学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮地美沙、間裕太郎、鯉沼真吾、中村岳史
2. 発表標題 複数の精神・神経疾患に関わるRab39Bの細胞内局在の解析
3. 学会等名 第30回日本バイオイメーjing学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鯉沼真吾、宮地美沙、保科光、前澤創、和田直之、郡山恵樹、桐生寿美子、木山博資、中村岳史
2. 発表標題 TC10は微小管の安定性と小胞輸送を制御することで軸索伸長と軸索再生を促進する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 間裕太郎、古澤絵菜、宮地美沙、和田直之、鯉沼真吾、福田光則、中村岳史
2. 発表標題 複数の神経・精神疾患に関わるRab39BのFRETバイオセンサーの開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鯉沼真吾、下澤律浩、保富康宏、中村岳史、木村展之
2. 発表標題 オートファジーはエクソソームを介してAbの細胞外放出を制御する
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金光明音、鯉沼真吾、中村岳史
2. 発表標題 分解経路で働くRab7の細胞内局在についての4状態遷移モデル
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 一分子型FRETバイオセンサー、及びRab39Bの活性を制御する薬剤のスクリーニング方法	発明者 中村岳史、松井真優、 鯉沼真吾	権利者 東京理科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-137389	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
英国	University College London		