

## 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 6月15日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650084

研究課題名（和文） 光ガイドによる神経突起伸長制御を目指して

研究課題名（英文） Exploring Optical Navigation of Neurite Outgrowth

研究代表者

中村 史雄（NAKAMURA FUMIO）

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：10262023

研究成果の概要（和文）：

神経回路の再生を大きな目標として神経突起の光制御を検討した。土壌細菌の光活性化アデニル酸シクラーゼ(bPAC)、あるいは光受容体Xと神経栄養因子受容体 TrkB の融合蛋白質 (X-Trk) を培養細胞に発現させて光刺激を加え、受容体及び細胞内情報伝達の活性化を評価した。bPAC は光照射に伴いAキナーゼを活性化した。X-Trk も光照射に伴う自己リン酸化と MAP キナーゼの活性化上昇を示した。さらに X-Trk を発現させた神経細胞への光照射は突起伸長を促進した。光刺激をリン酸化チロシン情報伝達に変換させる X-Trk を用いた神経突起の光制御は、神経回路の再生や解析の新たな手法になるであろう。

研究成果の概要（英文）：

To explore the optical navigation of neurite outgrowth, I utilized two photoreceptors: bacterial photoactivated adenylyl cyclase (bPAC) and an anonymous photoreceptor X. Transient expression of bPAC in cultured cells showed A-kinase activation upon light stimulation. I designed a fusion protein X-Trk, X-photoreceptor connected with the kinase domain of TrkB. Photostimulation upon the cells expressing X-Trk induced autophosphorylation of X-Trk and MAP kinase activation. Ectopic expression of X-Trk in chick embryonic dorsal root ganglion neurons facilitated the neurite outgrowth upon light stimulation. Enabling the optical navigation of neurite outgrowth with X-Trk may open new avenue to regenerate and analyze neural circuits.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	270,000	2,870,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：融合基盤脳科学

キーワード：光脳科学、神経突起、神経再生

## 1. 研究開始当初の背景

神経回路の形成において、神経成長・栄養因子や神経ガイド分子は成長円錐の受容体

を介して神経軸索を伸長あるいは退縮させる(Huber, 2003)。それでは外傷や疾患による神経損傷後の再生についてこれらの知識は

どのように適応されるのであろうか。神経伸長の抑制性分子に対する拮抗薬などは、抑制性分子が局所で強く発現して神経伸長を妨げている状況には有効であろう。一方、神経回路の形成が起こる胎生期や生後初期に比べ、成体動物の個体は数倍以上大きくなる。例えば大脳皮質運動神経の軸索長は成人において1 mに達する。このような神経軸索の再伸長を考えると、胎生期と同様に神経ガイド分子を標的器官に提示するだけでは不十分で、どのように神経伸長を制御するかを問題にする必要がある。

そこで神経成長円錐に光感受分子を発現させ、光による突起伸長促進やガイドを行う方法を考察した。生後の神経において細胞内のcAMP濃度上昇により、神経突起伸長が促進される (Neumann, 2002)。また神経成長・栄養因子や神経ガイド分子の受容体は細胞内情報伝達を活性化する代謝型の分子が多い。従ってcAMP合成や神経成長・栄養因子受容体の活性制御を光刺激によって行うことができれば、より神経突起の伸長や方向制御の自由度が増すと考えられる。

様々な光感受性受容体のうち植物のフォトトロピン (和田, 2001)は、植物の光源側に曲がる、正の光屈性を担う青色光受容体であり、2つの光受容領域とセリン・スレオニンキナーゼで構成される。さらに光刺激によりキナーゼが自己リン酸化により活性化し、細胞内情報伝達を引き起こす (Christie, 2007)。またフォトトロピンのキナーゼはAキナーゼ基質に似たモチーフをリン酸化する。一方、神経成長・栄養因子受容体 Trk ファミリーは NGF や BDNF のリガンド刺激に伴い、細胞内チロシンキナーゼの自己リン酸化により活性化する (Huber, 2003)。

これら2つの分子の活性化機構に類似性が認められることから、研究開始時はフォトトロピンの光受容領域と Trk キナーゼ領域を組み合わせて、光刺激に伴い活性化され、神経突起伸長や中枢神経の生存維持作用を示す融合分子の実現化を目指した。

## 2. 研究の目的

神経突起伸長の光制御を行うため、光受容蛋白質と神経成長・栄養因子受容体 Trk ファミリーの融合蛋白質を作成し、光刺激により神経突起伸長作用を持つ分子を創出する。

また細胞内情報伝達分子 cAMP は神経突起伸長を促進すること (Neumann, 2002) から、光受容に伴い cAMP を産生する光活性化アデニルシクラーゼ PAC (Iseki, 2002) を神経細胞に発現させ、光刺激に伴う神経突起伸長作用を検討する。

## 3. 研究の方法

ミドリムシ及び土壌細菌の光感受性アデ

ニルシクラーゼは、全長のN末端に細胞膜局在シグナル、C末端に Myc エピトープを付加した発現ベクターを作成した。植物・真菌由来の様々な光受容体と TrkB チロシンキナーゼ領域のキメラ蛋白質発現ベクターを作成した。キメラ蛋白質もN末端細胞膜局在シグナル、C末端 Myc エピトープを付加した。

COS-7 あるいは HEK293T 細胞にベクターを導入し組み換え蛋白質を発現させる。光受容体の補酵素結合部位に変異を導入した光受容能を持たない変異体も作成し、野生型との比較対照とした。

光刺激 (光強度  $40\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ , 30min) を加え、細胞を可溶化した。可溶化物のリン酸化特異抗体による免疫プロットを行い、細胞内情報伝達の活性化を評価した。cAMP 産生能はAキナーゼ基質のリン酸化抗体、Trk の活性化は Trk 自己リン酸化抗体及び下流シグナルの MAP キナーゼリン酸化抗体を用いた。

ニワトリ 15~16 日胚由来の脊髄後根神経節 (DRG) 初代培養神経細胞に、ヘルペスウイルス発現系を用いて融合蛋白質を発現させた。10分照明・10分消灯周期の光照射を2日間加え、チュブリンと Myc 抗体で細胞を染色した。各条件で20個前後の神経細胞を撮影し、神経突起長の総計を ImageJ により計測した。

## 4. 研究成果

### (1) フォトトロピンを用いた検討

実験当初は計画に記したシロイヌナズナのフォトトロピン (Phot-1, Phot-2) を検討した。Phot-1, Phot-2 を大阪府立大学・徳富教授より供与頂いた。Phot-1 全長は COS-7 細胞内において、光刺激に伴う自己リン酸化の上昇を示した。しかしAキナーゼの基質となる他の分子はリン酸化しなかった。また Phot-1 と Src あるいは TrkB との融合蛋白質を作成して光活性化能を検討した。しかしこれらの融合蛋白質は光刺激に伴う自己リン酸化や他分子のチロシンリン酸化上昇を示さなかった。これらの結果からフォトトロピンを用いた神経突起伸長制御は難しいと考え、(2)、(3) の実験へ移行した。

### (2) 光活性化アデニルシクラーゼ PAC の検討

cAMP は神経突起伸長を促す細胞内情報伝達分子である。光刺激により活性化するアデニルシクラーゼ (PAC) をミドリムシ (Iseki, 2002) や土壌細菌 *Beggiatoa* (Stierl, 2011) は保持する。そこで PAC を用いた神経突起伸長能を検討した。ミドリムシ PAC 及び土壌細菌 PAC (bPAC) の cDNA を東邦大学・伊関准教授より供与頂き、細胞膜局在シグナルと Myc エピトープを付加して HEK293T 細胞に導入した。ミドリムシ PAC はほとんど発現しなかったが

bPAC は効率よく発現した。さらに bPAC は光刺激に伴う A キナーゼの活性化を示した (図 1 A)。

bPAC を初代培養神経細胞に導入した。bPAC は神経細胞体及び神経突起に局在した。予備的な実験では突起伸長が光刺激により促進される傾向が得られた (図 1 B, C)。統計学的有意差はまだ得られていない。これらの結果は、bPAC を用いた神経突起伸長の光制御の可能性を示唆した。

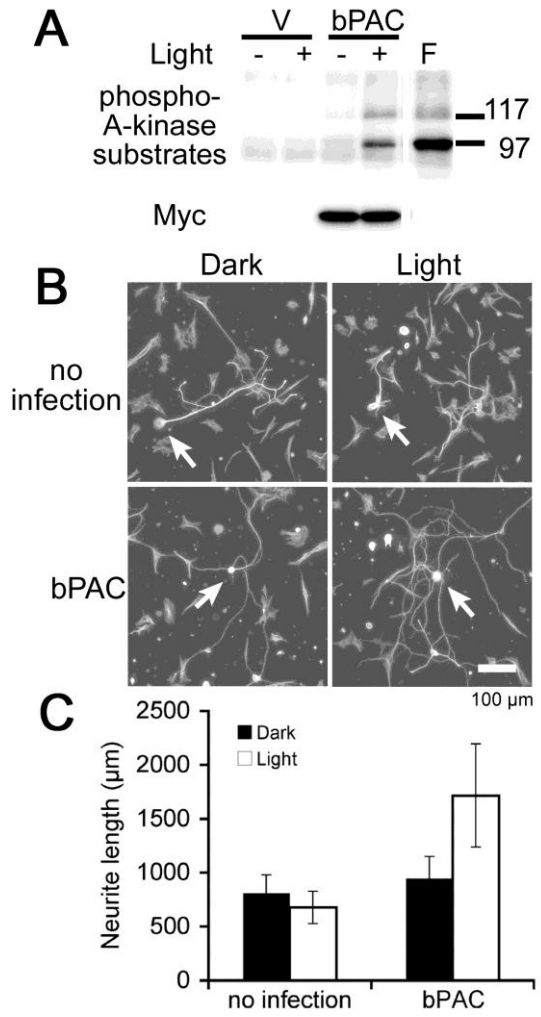


図 1 bPAC の機能評価

A) 光照射による A キナーゼの活性化。bPAC を HEK293T に発現させ光刺激した。bPAC 発現細胞において光照射に伴う A キナーゼ基質のリン酸化が上昇する。これは cAMP の産生増加を示唆する。F はフォルスコリン・IBMX 処理により cAMP を増加させた陽性対照。bPAC の発現を Myc プロットで示す。B) ニワトリ 16 日胚 DRG における bPAC の神経突起伸長。神経突起をチュブリン染色した。矢印は細胞体。細胞体から神経突起が伸長する。C) 神経突起長の定量。bPAC の光照射による突起伸長促進傾向が見られるが、統計学的有意差は得られていない。

### (3) 光受容体 X を用いた検討

(1) のフォトトロピンを用いた融合蛋白質では目的とするものが得られなかったため、別種の光受容体 X を検討した。なお特許申請予定のため、光受容体 X と記す。

光受容体 X に細胞膜局在シグナル、TrkB 細胞内領域、Myc エピトープを融合させた分子 X-Trk (図 2 A) を作成し、COS-7 細胞に発現させた。青色光 30 分照射後に可溶化し、抗 myc 抗体による免疫沈降を行い、リン酸化チロシン抗体プロットによる自己リン酸化の上昇を測定した。その結果、X-Trk は光照射により約 70% の自己リン酸化の上昇を示した (図 2 B, C)。光受容体を欠いた X 変異体-Trk では減弱した (図 2 B)。また細胞可溶化物のリン酸化 Trk 特異抗体 (pY706/7 TrkB) によるプロットでも、X-Trk のリン酸化上昇をみた (図 2 D)。この部位のリン酸化は Trk チロシンキナーゼ活性を上昇させる。

次に Trk 下流の細胞内情報伝達の活性化を検討した。Trk のリガンド刺激は MAP キナーゼのリン酸化と活性化を引き起こす。X-Trk を導入した細胞では光照射に伴いリン酸化 MAP キナーゼが増加した (図 2 E)。なおこの増加は X 変異体-Trk では認められなかった。これらの事実から X-Trk は光照射に伴い自己リン酸化し活性化され、下流の細胞内情報伝達機構を活性化すると考えられた。

さらに X-Trk の神経突起伸長能を検討した。ニワトリ胚 DRG 由来の神経細胞に導入した X-Trk は神経細胞体、軸索や先端にも局在した。また X-Trk を導入した神経細胞は、光照射に伴い神経突起の伸長を増加させた (図 3 A, B)。X 変異体-Trk では光依存性の伸長増加は認められなかった。光刺激と X-Trk 発現による神経突起伸長効果は独立した 3 回の実験で確認した。

### (4) 展望

bPAC や X-Trk を神経細胞に発現させ光照射を加えることで神経突起の伸長促進や誘引ができると予想される。今後は X-Trk を中心にその神経突起伸長能を詳細に検証する。光制御による神経伸長の基盤を確立し、神経軸索再生や新たな神経回路の機能解析方法論へと発展させたい。

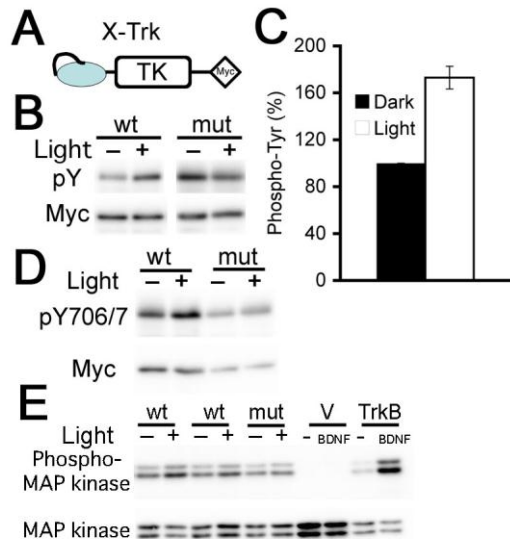
### (5) 参考文献

Christie JM. *Annu Rev Plant Biol* 58:21-45, 2007.  
 Huber AB et al *Annu Rev Neurosci* 26:509-563, 2003.  
 Iseki M et al *Nature* 415:1047-51, 2002.

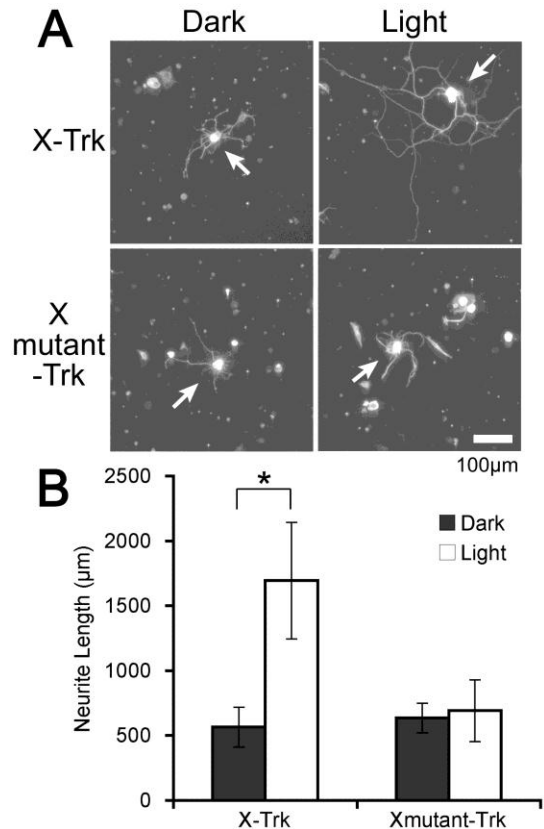
Neumann S et al Neuron 34:886-93, 2002.

Stierl M et al J Biol Chem 286:1181-8, 2011.

和田正三、徳富哲、長谷あきら、長谷部光泰、  
監修 植物の光センシング 植物細胞工学  
シリーズ16 秀潤社(東京)、2001.



**図2 培養細胞におけるX-Trkの機能評価** A) X-Trk 模式図 XとTrkB細胞内領域(TK)を融合させC末にMycエピトープを付加した。図には示していないがN末には細胞膜局在シグナルを付加した。B) X-Trkの光依存性自己リン酸化 COS-7細胞にX-Trk発現ベクターを導入し、室温で2日培養し、光刺激を30分加えた。細胞を可溶化しMyc免疫沈降を行い、リン酸化チロシン抗体(pY)あるいはMyc抗体にてブロットした。野生型(wt)のX-Trkでは光刺激に伴い自己リン酸化が上昇する。一方、光受容能を欠くX変異体-Trk(mut)では光刺激に伴うリン酸化上昇がみえない。C) X-Trk自己リン酸化の定量 X-Trkのリン酸化は光刺激により70%増加した。6サンプルの平均±標準誤差を示す。D) 細胞可溶化物をリン酸化Trk特異抗体(pY706/7)あるいはMyc抗体でブロットした。X-Trk野生型(wt)のpY706/7の増加はキナーゼ活性の上昇を示唆する。E) X-Trkを発現させたHEK293T細胞可溶化物をリン酸化MAPキナーゼ特異抗体(Phospho-MAP kinase)あるいはMAPキナーゼ抗体(MAP kinase)でブロットした。光刺激を加えたX-Trk野生型(wt)はリン酸化MAPキナーゼが上昇するが、変異体(mut)では上昇しない。陰性対照として空ベクター(V)のブロットを、陽性対照としてTrkB全長を発現したHEK293TのBDNF(10ng/ml, 30min)刺激によるMAPキナーゼリン酸化上昇を示す。



**図3 初代培養神経細胞におけるX-Trkの神経突起伸長作用** A) ニワトリ15日胚DRG由来の培養神経細胞にX-Trk野生型、光受容能を欠く変異型(X mutant-Trk)を導入した。光照明10分、消灯10分の条件で2日培養し、神経をチュブリン及びmyc染色した。野生型では光刺激に応じて神経突起伸長が促進された。矢印は神経細胞体。細胞体から神経突起が伸長する。B) 個々の神経の神経突起長合計を、それぞれの条件で17~21個の細胞について計測し、その平均±標準誤差をグラフ化した。野生型(X-Trk)では光刺激による促進が認められるが、変異型(X mutant-Trk)では認められない。\*, p<0.05, Student T-test.

### 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3件)

① Kou K, Nakamura F, Aihara M, Chen H, Seto K, Komori JY, Kambara T, Nagashima Y, Goshima Y, Ikezawa Z. Decreased Expression of Semaphorin-3A, a Neurite-Collapsing Factor, is Associated With Itch in Psoriatic Skin. Acta Derm Venereol 査読有, 2012 doi: 10.2340/00015555-1350

② Sato Y, Iketani M, Kurihara K, Yamaguchi M, Yamashita N, Nakamura F, Aire

Y, Kawasaki T, Hirata T, Abe T, Kiyonari H, Strittmatter SM, Goshima Y, Takei T  
Cartilage acidic protein-1B (LOTUS), an endogenous Nogo receptor antagonist for axon tract formation. Science 査読有 333 巻, 2011, 769-73.

③ Sawaki H, Nakamura F, Aihara M, Nagashima Y, Komori-Yamaguchi J, Yamashita Y, Nakazawa M, Goshima Y, Ikezawa Z. Intranasal administration of Semaphorin-3A alleviates sneezing and nasal rubbing in a murine model of allergic rhinitis. J Pharmacol Sci 査読有 117 巻, 2011, 34-44.

〔学会発表〕(計2件)

① 中村史雄、肥田友伸、村岡秀紀、小倉顕一、五嶋良郎 神経ガイドにおけるアクチン結合蛋白質 Filamin-A と CRMP 相互作用 第34回 日本神経科学大会 2011年9月16日 横浜・パシフィコ横浜

② 中村史雄、Stephen M Strittmatter、五嶋良郎 PTP  $\delta$  による c-Src の脱リン酸化と Sema3A 情報伝達 第33回 日本神経科学大会 2010年9月2日 神戸・神戸コンベンションセンター

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 史雄 (NAKAMURA FUMIO)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号：10262023

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

伊関 峰生 (ISEKI MINEO)  
東邦大学・薬学部・准教授  
研究者番号：60414009