

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 5月28日現在

機関番号：24303
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790215
 研究課題名（和文） クロライドイオンによる G タンパク質シグナルの制御を介した神経突起伸長のメカニズム
 研究課題名（英文） Mechanism of neurite outgrowth through chloride ion dependent regulation of G protein signaling
 研究代表者
 中島 謙一 (NAKAJIMA KEN-ICHI)
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：40398392

研究成果の概要（和文）：ラット副腎由来 PC12D 細胞を低 Cl⁻濃度の培養液中で NGF 処理すると神経突起の伸長は有意に抑制されるが、低分子量 G タンパク質 RhoA の下流エフェクター分子である Rho kinase の特異的阻害剤 Y-27632 を加えると、低 Cl⁻による抑制はレスキューされた。しかし、親株の PC12 細胞では、低 Cl⁻による神経突起伸長の抑制は見られたが、Y-27632 によるレスキューは見られなかった。両細胞における RhoA の発現を調べたところ、PC12D 細胞の方が PC12 細胞よりも 10 倍近く発現量が多かった。PC12D 細胞と PC12 細胞において Rho タンパク質の発現量が異なることにより、Rho kinase 阻害剤への反応性が異なることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In rat pheochromocytoma PC12D cells, NGF-induced neurite outgrowth was inhibited in low Cl⁻ condition. This inhibition was partially rescued by the treatment of cells with Rho kinase inhibitor Y-27632. In parental PC12 cells, NGF-induced neurite outgrowth was also inhibited by in low Cl⁻ condition. However, in PC12 cells, inhibition of neurite outgrowth in the low Cl⁻ condition was not rescued by Y-27632 treatment. The protein expression level of RhoA in PC12D cells was higher than that in PC12 cells. These observations suggest that difference of protein expression level in both cells might cause different sensitivity to Rho kinase inhibitor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：細胞生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：低分子量 G タンパク質・クロライドイオン・神経突起伸長

1. 研究開始当初の背景
 低分子量 G タンパク質 (Ras スーパーファミリー) は、サブユニット構成を持たない低分

子量 (分子量 20000-30000 程度) の G タンパク質であり、Ras、Rho、Rab、Ran、Arf/Sar の 5 つのファミリーに分類される。低分子量

Gタンパク質は様々な細胞機能を担っている。このうち Rho ファミリーは、主として Rho、Rac、Cdc42 サブファミリーにより構成されている。これまで Rho ファミリーは、アクチン骨格の制御を介した細胞運動、細胞形態の制御に関してよく研究されてきたが、近年、微小管の動態制御にも深く関与していることが明らかとなってきた。細胞内において、微小管は細胞分裂・細胞内小胞輸送・細胞運動・細胞極性の形成・神経細胞における神経突起伸長の促進など、様々な役割を担っていることが知られている。Rho を始めとする低分子量 G タンパク質は GTP を結合した状態が活性型であり、低分子量 G タンパク質自体がもつ GTPase 活性により結合した GTP が加水分解され GDP 結合型になることにより不活性型となる。活性型の Rho ファミリーGタンパク質は、その下流の様々なエフェクター分子を介し、細胞骨格の動態を直接的、間接的に制御する。神経細胞における神経突起の伸長の際、突起内部に含まれる細胞骨格系（アクチン骨格系および微小管）の再編成が大きく関与する。このときの細胞骨格系の再編成にも Rho ファミリーGタンパク質が関与しており、Rac と Cdc42 は伸長を促進し、Rho は伸長を阻害することが知られている。Rho はエフェクターの 1 つである Rho kinase の活性化を介し、その下流にある微小管の動態を制御する分子をコントロールすることで神経突起伸長を抑制すると考えられている。

代表者らは PC12 細胞およびその亜株 PC12D 細胞において、神経成長因子 NGF による神経突起伸長には $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体 (NKCC) が必須であることを明らかにした。また、我々の行った予備的な実験により、PC12D 細胞を低 Cl⁻濃度の培養液中で NGF 処理すると、神経突起の伸長が抑制されることが示唆された。これらは NKCC を介した Cl⁻の細胞内への取込みが、神経突起伸長に重要であることが考えられる。また、低 Cl⁻濃度による神経突起伸長の抑制が、Rho kinase 阻害剤で回復する傾向があることが示唆された。

上述したように、神経突起伸長には低分子量 G タンパク質が深く関与している。一方で、

三量体 G タンパク質の一種の GTPase 活性が Cl⁻により阻害されるという先行報告もあり。Cl⁻と GTPase との関連も示唆されている。これらの知見を踏まえ、神経突起伸長における低分子量 G タンパク質の役割、およびこれらへの Cl⁻の関与についてのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

神経突起伸長における低分子量 G タンパク質 RhoA およびそのエフェクター分子 Rho kinase の役割、ならびにこれらに対する Cl⁻の役割についてを明らかにする。

3. 研究の方法

ラット副腎髄質由来 PC12 細胞およびその亜株 PC12D 細胞を用いた。これらの細胞は神経成長因子 NGF 処理により、神経突起を伸長する。また、PC12D 細胞は親株 PC12 細胞に比べより敏速に神経突起を伸長する。これらの細胞を NGF 処理したのちホルムアルデヒドで固定し、顕微鏡下で神経突起の長さを計測した。RhoA の発現は Western blotting 法により検証した。

4. 研究成果

(1) PC12D 細胞における低 Cl⁻の神経突起伸長に対する影響について (図 1)

PC12D 細胞を低 Cl⁻濃度 (13 mM、60 mM、90 mM) および通常濃度 (125 mM) の培養液中で NGF 処理し、5 日後の神経突起の長さを顕微鏡で観察した。その結果、神経突起の伸長は低 Cl⁻濃度中で有意に抑制され、濃度依存的であった。

また、Rho kinase の特異的阻害剤である Y-27632 で処理すると、低 Cl⁻濃度による神経突起伸長の抑制は部分的にレスキューされた。

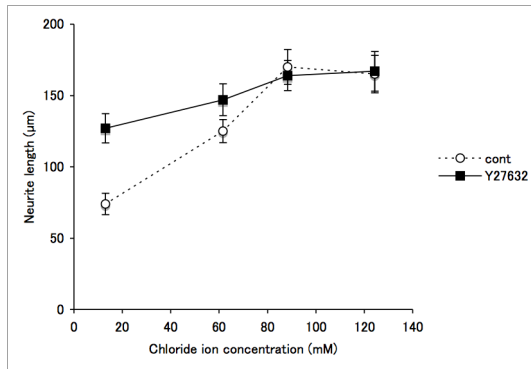


図1 PC12D 細胞における神経突起伸長

(2) PC12 細胞における低 Cl⁻の神経突起伸長に対する影響について (図2)

PC12 細胞を低 Cl⁻濃度 (13 mM、25 mM、45 mM、60 mM、90 mM) および通常濃度 (125 mM) の培養液中で NGF 処理し、5 日後の神経突起の長さを顕微鏡で観察した。その結果、神経突起の伸長は低 Cl⁻濃度中で有意に抑制され、濃度依存的であった。一方、Rho kinase の特異的阻害剤である Y-27632 で処理しても、低 Cl⁻濃度による神経突起伸長の抑制はレスキューされなかった。

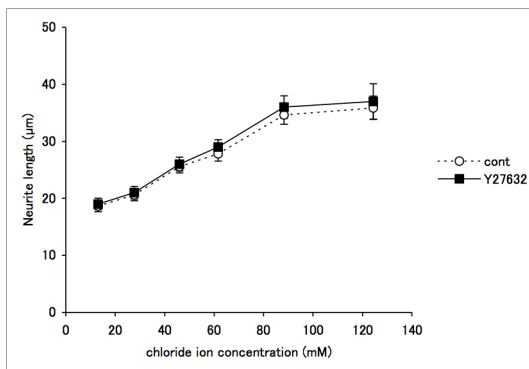


図2 PC12 細胞における神経突起伸長

(3) PC12 細胞および PC12D 細胞における RhoA の発現 (図3)

PC12 および PC12D 細胞における RhoA の発現量を Western blotting 法で調べたところ、PC12 細胞に比べ PC12D 細胞で RhoA

がより多く発現していることが分かった。また、両細胞において RhoA の発現は低 Cl⁻濃度 (13 mM) の培養液で処理しても変化しなかった。

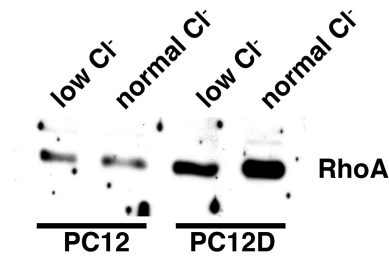


図3 PC12 および PC12D 細胞における RhoA の発現

ラット副腎由来 PC12D 細胞を低 Cl⁻濃度の培養液中で NGF 処理すると神経突起の伸長は有意に抑制されるが、低分子量 G タンパク質 RhoA の下流エフェクター分子である Rho kinase の特異的阻害剤 Y-27632 を加えると、低 Cl⁻による抑制はレスキューされた。しかし、親株の PC12 細胞では、低 Cl⁻による神経突起伸長の抑制は見られたが、Y-27632 によるレスキューは見られなかった。両細胞における RhoA の発現を調べたところ、PC12D 細胞の方が PC12 細胞よりも 10 倍近く発現量が多かった。PC12D 細胞と PC12 細胞において Rho タンパク質の発現量が異なることにより、Rho kinase 阻害剤への反応性が異なることが示唆された。

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

Nakajima K, Niisato N, Marunaka Y. Genistein enhances the NGF-induced neurite outgrowth. Biomed Res. 32:351-356 (2011) 査読有
<http://dx.doi.org/10.2220/biomedres.32.351>

②

Nakajima K, Niisato N, Marunaka Y. Quercetin stimulates NGF-induced neurite

outgrowth via activation of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter. *Cell Physiol. Biochem.* 28:147-156 (2011) 査読有
DOI:10.1159/000331723

③

Marunaka Y, Niisato N, Taruno A, Ohta M, Miyazaki H, Hosogi S, Nakajima K, Kusuzaki K, Ashihara E, Nishio K, Iwasaki Y, Nakahari T, Kubota T. Regulation of epithelial sodium transport via epithelial Na^+ channel. *J. Biomed. Biotechnol.* Article ID: 978196 (2011) 査読有
DOI:10.1155/2011/978196

[学会発表] (計6件)

①

中島謙一、新里直美、丸中良典. 分化中のPC12細胞における細胞内クロライドイオン濃度の測定. 第89回日本生理学会大会 2012年3月30日 松本.

②

中島謙一、永尾光、新里直美、久育男、丸中良典. 神経突起伸長における $\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体の役割. 第104回近畿生理学談話会 2011年10月1日 高槻.

③

中島謙一、永尾光、新里直美、久育男、丸中良典. 神経突起伸長における $\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体の役割. 第88回日本生理学会・第116回日本解剖学会合同大会 東日本大震災のため中止・誌上開催扱い.

④

Nakajima K, Niisato N, Marunaka Y. Flavonoids stimulate NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells via activation of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010) 2010年12月17日 Honolulu, USA.

⑤

中島謙一、新里直美、丸中良典. フラボノイドは $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体の活性化を介して神経突起伸長を促進する. 第15回日本フードファクター学会学術集会 2010年10月4日 仙台.

⑥

中島謙一、新里直美、丸中良典. フラボノイドは $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体の活性化を介して神経突起伸長を促進する. 第87回日本生理学会大会 2010年5月19日 盛岡.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 謙一 (NAKAJIMA KEN-ICHI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 40398392

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: