

## 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 4 月 25 日現在

機関番号：83902

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790300

研究課題名（和文） ホスホリパーゼ C デルタ 3 が制御する神経突起形成メカニズムの解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of neurite outgrowth regulated by PLCdelta3

研究代表者

河内 全（KOUCHI ZEN ）

愛知県心身障害者コロニー 発達障害研究所・病理学部・研究員

研究者番号：70322485

研究成果の概要（和文）：ホスホリパーゼ C $\delta$ 3（PLC $\delta$ 3）はホスファチジルイノシトール二リン酸（PIP<sub>2</sub>）を分解して二種の主要なセカンドメッセンジャー（IP<sub>3</sub>, DAG）を産生する酵素であり、神経組織に発現が多く見られる。子宮内エレクトポレーションによりマウス胚にて大脳皮質の PLC $\delta$ 3 の発現をノックダウンすると皮質板形成時に見られる神経細胞の移動が阻害された。更に大脳皮質ニューロンや小脳顆粒細胞及び Neuro2a 細胞の分化過程で PLC $\delta$ 3 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 C $\delta$ 3（PLC $\delta$ 3）, which is highly expressed in neuronal tissues, hydrolyzes phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) and generates two second messengers, *i.e.* IP<sub>3</sub> and DAG. PLC $\delta$ 3 knockdown in cerebral cortex of E14 embryo by *in utero* electroporation caused the migratory inhibition of cortical neurons in developing cerebral cortical plate. Furthermore, we demonstrated that neuronal outgrowth was inhibited in cerebral neurons, cerebellar granule cells, or Neuro2a cells when PLC $\delta$ 3 was transiently knocked down during differentiation.

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	510,000	2,210,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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 はホスファチジルイノシトール二リン酸（PIP<sub>2</sub>）を分解して 2 種の主要なセカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロール（DAG）やイノシトール 3 リン酸（IP<sub>3</sub>）を産生する酵素であるが、 $\delta$ 型アイソザイムは酵素活性に必須なドメインや PIP<sub>2</sub> に特異的

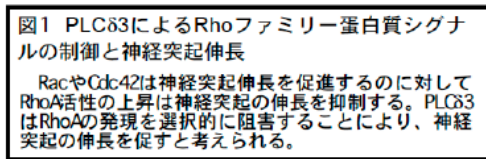
結合を示す PH ドメイン以外に特徴的な構造を持たないために活性制御に重要なメカニズムやその生理機能について明らかにされていない点が多い。PLC $\delta$ 3 は皮膚や精巣等にも存在するが、発達期の脳皮質や小脳等の神経組織にも多く存在する。PLC $\delta$ 3 ノックアウトマウスは顕著な表現型の異常を示さず、

その機能は長らく不明であった。本研究では子宮内エレクトロポレーションや初代培養細胞系を用いて PLCδ3 を一過性にノックダウンすることにより、神経機能における PLCδ3 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 PLCδ3 の機能を明らかにする。また PLCδ3 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



PLCδ3 は大脳皮質や小脳等の神経組織や神経芽腫細胞に多く存在する。(1) E14 胚において子宮内エレクトロポレーション法にて脳室下帯の PLCδ3 をノックダウンし、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) E14 胚より大脳皮質ニューロンを調製し、エレクトロポレーション法にて PLCδ3 をノックダウンすることにより初代培養にて軸索の伸長や樹状突起の形成過程に及ぼす影響を解析した。(3) 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 PLCδ3 を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。(4) 神経芽腫細胞 Neuro2a を血清除去により分化誘導した系を用いて PLCδ3 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 (5) PLCδ3 の活性変異体や他の PLCδ アイソザイムを導入することにより神経突起形成に PLCδ3 活性が重要であるか否かについて解析した。更に (6) 血清除去による Neuro2a 細胞の分化モデルをもとに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、PLCδ3 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、

PLCδ3 による Rho/Rho キナーゼ活性の抑制が神経突起形成に関与することを明らかにした (図 1)。また (7) PLC 下流のシグナルとして 2 種のセカンドメッセンジャーのうちどちらが重要であるかをイオノマイシンや PMA 等の PKC 活性化試薬を用いて検討した。

## 4. 研究成果

(研究の主な成果)

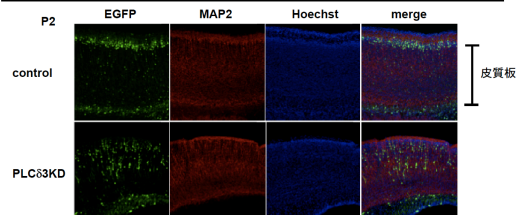
(1) E14 の ICR マウスの大脳皮質において PLCδ3 をノックダウンした結果、生後 2 日目において本来大脳皮質上層部に位置するニューロンの放射状移動が顕著に阻害された (図 2)。このときの神経細胞の配向性はノックダウンによる影響を受けなかったが、先導突起の形成が阻害されていた。このことから PLCδ3 は先導突起の伸長を制御することにより大脳皮質ニューロンの移動を制御することが示唆された。

(2) 大脳皮質ニューロンを E14 胚より調製し、エレクトロポレーションにより shRNA ベクターを導入することにより PLCδ3 をノックダウンした後に 3, 7 日間培養することにより軸索伸長及び樹状突起の形成に及ぼす影響を解析した。その結果、軸索の形成や伸長及び樹状突起の形成がノックダウン細胞では阻害されることを明らかにした。

(3) 小脳顆粒細胞を生後 2 日目のマウスより単離し、PLCδ3 を一過性にノックダウンした後に分化誘導した結果、ノックダウン細胞では神経突起の形成が顕著に阻害された。

(4) Neuro2a 細胞において PLCδ3 を一過性にノックダウンした後に血清除去により分化

**図2 PLCδ3ノックダウンによる大脳皮質神経細胞移動の阻害**  
E14胚の大脳皮質脳室帯にコントロール及びPLCδ3shRNAベクターをEGFPベクターと共に注入し、生後2日目におけるGFP陽性細胞の局在を解析した。コントロールの神経細胞は"inside out"の移動則に従い、大脳皮質板 (MAP2陽性部位) 上部まで移動するが、PLCδ3KD細胞では移動が顕著に阻害されていることがわかる。



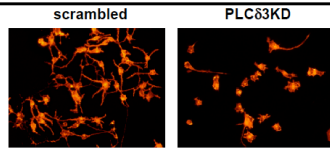
誘導した結果、神経突起の形成率が顕著に低下した (図 3)。また GFP-PLCδ3 を PLCδ3 ノックダウン (KD) 細胞に導入したところ、神経突起形成が回復した。

(5) PLCδ3 恒常的活性化変異体を Neuro2a や大脳皮質ニューロンに導入した結果、神経突起の伸長が促進された。また Neuro2a に活性変異体 H393A を導入すると神経突起形成の阻害が見られた。また PLCδ1 は PLCδ3 のノックダウンによる神経突起形成の阻害をレスキ

ューできな  
 かった。こ  
 れらの結  
 果より PLCδ3  
 活性が正常  
 な神経突起  
 形成に必要  
 であること  
 が示された。  
 (6) PLCδ3  
 ノックダウ  
 ン細胞に

図3 分化後のNeuro2a細胞における  
 PLCδ3による突起伸長

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  
 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。



Rhoファミリー蛋白質 (Cdc42, Rac1, RhoA)を  
 導入し、血清除去による神経突起形成率に及  
 ぼす影響を解析した結果、ドミナントネガテ  
 イブ型 RhoA (DNRhoA) を導入した PLCδ3KD 細  
 胞でコントロールレベルとほぼ同程度にま  
 で神経突起形成の回復が見られた。血清除去  
 をしない場合は DNRhoA を導入した細胞でも  
 突起形成が誘導されず、分化刺激に伴う  
 PLCδ3 の活性化が必要であることが示唆され  
 た。また Rho キナーゼ阻害剤 (Y-27632) を  
 PLCδ3 ノックダウン細胞に投与した結果、ノ  
 ックダウンにより阻害された突起形成が回  
 復することを見出した。分化誘導後のコント  
 ロール細胞では分化前と比べて活性化型  
 RhoA 及びその発現量が mRNA レベルで減少し  
 ていたが、PLCδ3KD 細胞では分化前後におい  
 て RhoA 発現量や活性に変化が見られなかつ  
 た (図4)。

(7) PLCδ3 下流のシグナル経路で神経突起形  
 成に重要な経路を明らかにする目的で PMA や  
 イオノマイシン及び thapsigargin が RhoA の  
 発現レベルに及ぼす影響を解析した。その結  
 果、コントロール及び PLCδ3 ノックダウン細  
 胞において3種全ての試薬で処理した細胞に  
 ついて無処理時に比べて RhoA の発現が低下

図4 分化後のNeuro2a細胞における  
 PLCδ3によるRhoA発現量の抑制

Neuro2a細胞においてPLCδ3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PLCδ3KD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PLCδ3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PLCδ3 (GFP-CA) をコン  
 トロール細胞またはPLCδ3KD細胞に発現させ  
 ると、GFP-CA発現細胞では野生型PLCδ3発  
 現細胞 (GFP-WT) に比べてRhoA発現量の低  
 下が見られた (右図)。



することを明らかにした。

以上の結果より PLCδ3 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、突起  
 伸長に関与することを明らかにした。また  
 PLCδ3 による神経突起伸長の制御には PLC 活  
 性が重要であり、PIP<sub>2</sub> の分解により生じる 2  
 種のセカンドメッセンジャー、IP<sub>3</sub> 及び DAG  
 の両方が重要であることを示した。PLCδ3 に  
 よる RhoA 発現レベルの低下による活性の制

御は分化刺激依存的であり、PLCδ3 特有の活  
 性化調節機構の存在が示唆された。

(得られた成果の国内外における位置づけ)

シナプスの形成等の神経機能に種々のイ  
 ノシトールリン脂質代謝酵素が関与するこ  
 とは様々なノックアウトマウスを用いた解  
 析により明らかにされているが、PLCδ3 のノ  
 ックダウンによる大脳皮質板形成における  
 細胞移動の阻害と種々の神経細胞でみられ  
 る神経突起形成の異常は PLCδ3 が他のイノ  
 シトールリン脂質代謝関連酵素とは異なる機  
 能を持つことを示す。PLCδ3 が制御する神経  
 突起伸長には Ca<sup>2+</sup>シグナルと DAG による PKC  
 活性化の二つのプロセスが関与することが  
 示唆されたが、両方とも神経突起伸長に伴う  
 RhoA の発現を抑制し、且つ PLCδ1 では PLCδ3  
 の持つ機能がレスキューされないことから  
 PLCδ3 特有の機能的差異が PLCδファミリー間  
 でも存在する点が注目される。滑脳症等の脳  
 機能発達異常では大脳皮質発生時の神経細  
 胞移動の異常が見られ、Ca<sup>2+</sup>シグナルが重要  
 であることが知られている。PLCδ3 下流のシ  
 グナルの詳細な解析により脳機能疾患との  
 関連性が明らかになることが期待される。

(今後の展望)

マウス胚発生時の大脳皮質ニューロンで  
 は分化や皮質板形成時に Rho の発現や活性が  
 低下することが知られている。RhoA プロモ  
 ーター活性を制御する可能性のある転写因子  
 について網羅的解析により PLCδ3 との関連を  
 明らかにすることで PLCδ3 と RhoA/Rho キ  
 ナーゼシグナルの抑制機構を繋ぐ新たなシ  
 グナル経路が見出されることが期待される。  
 また Rho の活性異常は種々の精神疾患を引き  
 起こすことが知られているが、PLCδ3 による  
 転写レベルでの RhoA 活性の制御は Rho 活  
 性による他の多くの調節機構とは異なる点で  
 ユニークである。Ca<sup>2+</sup>シグナルが関わる精  
 神疾患との関連も考慮して両者の違いを生  
 み出す詳細な分子機構が PLCδ3 による Rho  
 シグナルの制御を解析することにより明らか  
 にすることができれば、脳発達障害の治療に  
 有効な新たな分子標的が明らかになること  
 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kouchi, Z., Igarashi, T., Shibayama, N.,  
 Inanobe, S., Sakurai, K., Yamaguchi, H.,  
 Fukuda, T., Yanagi, S., Nakamura, Y. and  
 Fukami, K. (2011) Phospholipase Cδ3  
 regulates RhoA/Rho kinase signaling and  
 neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **286**:

8459-8471. (査読有)

DOI:10.1074/jbc.M110.171223

- ② Kouchi, Z., Fujiwara, Y., Yamaguchi, H., Nakamura, Y. and Fukami, K. (2011) Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type II beta is required for vitamin D receptor-dependent E-cadherin expression in SW480 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**: 523-529. (査読有)  
DOI:10.1016/j.bbrc.2011.04.045

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河内 全 (KOUCHI ZEN)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・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 :