

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25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790302

研究課題名（和文）：

新規リゾリン脂質が制御する神経回路形成及び神経回路再生の分子機構の解明

研究課題名（英文）：

Functional analyses of novel lysophospholipids that controls neuronal circuit formation and regeneration

研究代表者：

森 達也（MORI TATSUYA）

独立行政法人理化学研究所・神経成長機構研究チーム・研究員

研究者番号：70469922

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、新規リゾリン脂質 Lyso-PtdGlc が軸索突起の伸長方向を制御する分子メカニズムの解明を目指し、Lyso-PtdGlc 受容体候補遺伝子を同定した。さらに、その候補受容体遺伝子のノックアウトマウスから調製した神経細胞を用いて、培養系における LysoPtdGlc による軸索反発に同定した受容体が重要であることを明らかにした。また、受容体に共役する G タンパク質のサブタイプを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To understand molecular mechanisms as to how the novel lysophospholipid, lyso-PtdGlc, regulates the direction of axon elongation, first we identified a candidate gene of G protein coupled receptors which is activated by lyso-PtdGlc. Furthermore, using the DRG neurons derived from the receptor knock-out mice, we revealed that the receptor is necessary for growth cone repulsion induced by lyso-PtdGlc. In addition, we also identified the subtype of Galpha subunits which couples to the receptor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：①軸索ガイダンス ②成長円錐 ③リゾリン脂質 ④GPCR
 ⑤神経軸索 ⑥神経回路形成

1. 研究開始当初の背景

神経回路網は神経細胞から伸長した軸索突

起が標的となる細胞へと投射しシナプスを形成することで構築される。軸索ガイダンス

因子は軸索突起に対し誘因または反発作用を示し、軸索が正しい標的部位へと投射するための道標として機能することで、神経回路網の構築過程に重要な役割を担っている。過去 15 年間の軸索ガイダンスに関わる研究の中で、複数のタンパク性軸索ガイダンス因子とその受容体が同定され、細胞内シグナル伝達経路などの分子作用機構も明らかにされてきている。その一方、脂質などの非タンパク性分子については軸索ガイダンスにおける機能解析例は極めて少なく、その生理機能も明らかにされていない。特に脂質は細胞膜を構成する主要な構成成分であり細胞間情報伝達の媒体となりうるが、分子生物学および生化学的な解析が困難であることから、神経回路網形成での解析が立ち遅れてきた。近年我々は所属機関内の異分野連携研究をサポートする競争的研究費の成果として、グリッド細胞膜から細胞外に放出されたリゾリン脂質、Lysophosphatidylglucoside (Lyso-PtdGlc) が軸索の伸長方向を制御することを見出し、タンパク性因子のみでは説明が困難な軸索ガイダンス機構の存在を示唆する実験結果を得た。培養系において、軸索の成長円錐近傍に Lyso-PtdGlc の濃度勾配を作成すると、成長円錐は Lyso-PtdGlc を避ける方向に旋回した。本実験系での成長円錐近傍の Lyso-PtdGlc の濃度は約 100 pico-M であり、Lyso-PtdGlc が極めて低濃度で作用する軸索伸長阻害/反発性ガイダンス分子であることが示唆された。さらに、Lyso-PtdGlc が発生段階での脊髄感覚神経回路の構築に関与することを示唆する実験結果も得られた。一方、発生段階に対し成体の中枢神経組織では Lyso-PtdGlc の前駆体である Phosphatidylglucoside (PtdGlc) の発現量が顕著に減少するが、人為的に外傷が加わると損傷部位近傍での PtdGlc の発現量が上昇した。このことから、PtdGlc や Lyso-PtdGlc が成体中枢神経回路の再生阻害因子となることが予想された。

2. 研究の目的

本研究では、Lyso-PtdGlc が軸索の伸長方向を制御する分子メカニズムを明らかにし、非タンパク性軸索ガイダンス因子による神経回路網形成の分子機構の解明を目的とした。具体的には、新規リゾリン脂質である Lyso-PtdGlc の受容体を同定し、成長円錐が細胞外の Lyso-PtdGlc を検出する分子機序を明らかにすること、また、Lyso-PtdGlc 受容体下流の分子シグナル経路を明らかにし、Lyso-PtdGlc が誘導する軸索反発の細胞内シグナル伝達経路を解明することを目的とし

た。以上により、非タンパク性分子による軸索ガイダンスという神経回路網構築の新領域を開拓し、神経科学領域の更なる発展への貢献を目指した。

3. 研究の方法

(1) Lyso-PtdGlc 受容体の同定

我々の予備実験において、NGF 依存性 DRG 神経細胞 (温痛覚を担う TrkA 陽性細胞) の軸索は Lyso-PtdGlc により反発されるが、NT3 陽性 DRG 神経細胞 (固有知覚を担う TrkC 陽性細胞) の軸索は Lyso-PtdGlc により反発されなかった。このことから、「TrkC 陽性 DRG 神経細胞に対し TrkA 陽性 DRG 神経細胞では Lyso-PtdGlc 受容体が多く、あるいは特異的に発現している」という仮説を立てた。また、同様に行った予備実験において、TrkA 陽性 DRG 神経細胞を百日咳毒素で処理すると Lyso-PtdGlc の軸索反発活性は消失した。また、3 量体 G タンパク質 α サブユニットの一つである $G_{\alpha i}$ の C 末端ペプチドを導入した TrkA 陽性 DRG 神経細胞においても Lyso-PtdGlc の軸索反発活性は消失した。この結果から、Lyso-PtdGlc 受容体は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、特に $G_{\alpha i}$ サブファミリーと共役することが示唆された。

そこで、まずマウスから回収した DRG 神経細胞を NGF あるいは NT-3 存在下で培養し、それぞれを TrkA 陽性 DRG 神経細胞群、TrkC 陽性 DRG 神経細胞群とした。4 日間培養後、TrkA 陽性 DRG 神経細胞群、TrkC 陽性 DRG 神経細胞群それぞれから mRNA を回収し、約 380 種の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のプライマーカセットを用いて定量的リアルタイム PCR を行った。以上により、TrkA 陽性 DRG 神経細胞と TrkC 陽性 DRG 神経細胞における GPCR の発現量を比較し、TrkA 陽性 DRG 神経細胞において有意に発現量の多い GPCR を検出した。

(2) Lyso-PtdGlc 候補受容体安定発現細胞株の作製

リアルタイム PCR により同定した GPCR の遺伝子を HEK293T 細胞に導入し、薬剤耐性によるスクリーニングを行った。2 週間後、生存している細胞をコロニー分離法により単一細胞クローンに分け、得られた細胞クローンについて、受容体に付加したタグに対する抗体を用いてウェスタンブロット及び免疫抗体染色を行い、目的受容体を安定的に発現していることを確認した。目的受容体の発現が良好なクローンを選抜し、Lyso-PtdGlc 依存的に受容体下流の細胞内シグナルの活性化を MAP キナーゼのリン酸化、または細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を指標に検証し

た。
MAP キナーゼのリン酸化は、Lyso-PtdGlc を添加した細胞群から調製したタンパク質抽出液を、抗 MAP キナーゼリン酸化抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した。カルシウムイオン濃度は、安定発現細胞株にカルシウムインディケーターを導入し、蛍光顕微鏡下で細胞培養液に Lyso-PtdGlc を添加した際の蛍光強度変化をタイムラプスイメージングにより検出した。

(3) 軸索ガイダンスアッセイ

生後 1 日目 (P1) マウスから回収した DRG 神経細胞を接着基質でコートしたガラスディッシュ上で培養した。伸長中の神経軸索の先端にある成長円錐に対し、伸長方向の前方斜め 45 度、100 マイクロメートルの距離に Lyso-PtdGlc または他の軸索ガイダンス因子を充填したガラスピペットの先端をセットし、軸索ガイダンス因子をパルス状に放出することで成長円錐の周囲に軸索ガイダンス因子の濃度勾配を形成した。軸索ガイダンス因子を放出し始めてから 60 分後の成長円錐の位置をプロットし、放出前の軸索突起の伸長方向に対する角度を測定し Lyso-PtdGlc の軸索反発活性を定量化した。

(4) タンパク質分泌を指標とした

Lyso-PtdGlc 受容体の探索

様々なオーファン G タンパク質共役型受容体の発現スクリーニング法を用いて、Lyso-PtdGlc 受容体の探索を行った。具体的には、オーファン G タンパク質共役型受容体と G タンパク質 α サブユニットを共発現する細胞に Lyso-PtdGlc を添加し、刺激依存的に培養液中に分泌されるタンパク質を生化学的に解析し、受容体の Lyso-PtdGlc に対する応答性を検証した。
また、受容体と共発現させる G タンパク質 α サブユニットについて、様々なサブファミリーの受容体結合部位と Gq ファミリーのエフェクター結合領域のキメラタンパク質を導入し、目的とする受容体に共役する G タンパク質 α サブユニットのサブファミリーについて検証した。

4. 研究成果

(1) リアルタイム PCR による TrkA 陽性 DRG 神経細胞特異的 GPCR の探索

TrkA 陽性および TrkC 陽性マウス DRG 神経細胞から mRNA を抽出し、約 380 種のプライマーセットを用いて、それぞれの細胞群に発現する GPCR を定量的リアルタイム PCR により解析した。その結果、TrkC 陽性 DRG 神経細胞に比べ、TrkA 陽性 DRG 神経細胞で有意に発現量が高い GPCR 遺伝子を複数個同定した。

(2) Lyso-PtdGlc 受容体候補遺伝子の安定発現細胞株の作製

(1) により同定した Lyso-PtdGlc 受容体候補遺伝子が Lyso-PtdGlc により活性化されることを検証するため、受容体候補遺伝子を HEK293T 細胞に一過的に発現させた。免疫抗体染色法により受容体の細胞膜への局在を確認したところ、多くの細胞で核周辺部での凝集が認められ、Lyso-PtdGlc による活性化を評価することが出来なかった。

次に、同定した候補遺伝子を安定発現する HEK293T 細胞クローンの単離を試みた。薬剤耐性による選抜とコロニー分離法による細胞クローン化を行い、得られた細胞クローンについて免疫抗体染色法により受容体の局在を確認したところ、複数の細胞クローンにおいて導入した受容体が細胞膜に局在していることが確認された。一方、一部の受容体については、遺伝子導入により細胞の生存率が極端に低下し、安定発現株得ることができなかった。

作製した安定発現細胞株の中で、リガンドが既知の受容体を発現するクローンについて、リガンド依存的な MAP キナーゼの活性化をウェスタンブロットにより検証したところ、コントロールの細胞群に対し、受容体安定発現細胞群で有意に MAP キナーゼのリン酸化レベルの昂進が認められた。また、コントロール細胞株では特定のリガンドを添加してもカルシウムイオン濃度の上昇が認められないのに対し、特定の受容体安定発現細胞株ではカルシウムイオン濃度の上昇が認められた。このことから作製した受容体候補遺伝子を安定発現する細胞株は Lyso-PtdGlc 受容体の探索に有効なツールであることが示唆された。

続いて、作製した受容体安定発現細胞クローンを用いて Lyso-PtdGlc による細胞内シグナルの活性化を上記の MAP キナーゼの活性化と細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を指標に検証した。しかしながら、作製した細胞クローンにおいて、Lyso-PtdGlc 依存的な細胞内シグナル伝達経路の活性化は認められなかった。

(3) タンパク質分泌を指標とした Lyso-PtdGlc 受容体候補遺伝子の探索

定量的リアルタイム PCR により同定した受容体について、Lyso-PtdGlc 依存的に活性化するものを検出できなかったため、新たな手法により Lyso-PtdGlc 受容体の探索を行った。東北大学との共同研究により、様々なオーファン G タンパク質共役型受容体の発現スクリーニング法を用いて、Lyso-PtdGlc 受容体の探索を行った。具体的には、オーファン G タンパク質共役型受容体と G タンパク質 α サブユニットを共発現する細胞に Lyso-PtdGlc を

添加し、刺激依存的に培養液中に分泌されるタンパク質を生化学的に解析し、受容体の Lyso-PtdGlc に対する応答性を検証した。その結果、一つの受容体を発現させた細胞において、コントロールの細胞に対して Lyso-PtdGlc 依存的にタンパク質分泌が有意に促進され、その受容体が Lyso-PtdGlc 受容体であることが示唆された。

(4) Lyso-PtdGlc 受容体候補遺伝子ノックアウトマウスを用いた軸索ガイダンスアッセイ

(3) の手法により同定した Lyso-PtdGlc 受容体候補遺伝子のノックアウトマウスを海外の研究機関より入手した。生後直後 (P1) のノックアウトマウスから回収した TrkA 陽性 DRG 神経細胞を用いて Lyso-PtdGlc に対する軸索ガイダンスアッセイを行った結果、野生型 TrkA 陽性 DRG 神経細胞の軸索突起は Lyso-PtdGlc により反発されたのに対し、ノックアウトマウス由来の DRG 神経細胞の軸索突起は Lyso-PtdGlc により反発されなかった。また、Sema3A 等、他の反発性軸索ガイダンス因子の濃度勾配に対する反発性応答は、野生型およびノックアウトマウス由来の DRG 神経細胞で認められた。以上の結果から、同定した受容体候補遺伝子は Lyso-PtdGlc に依存した軸索反発シグナルを成長円錐内に媒介する上で重要な分子であることが示唆された。

(5) Lyso-PtdGlc 受容体下流シグナル経路の探索

(3) のタンパク質分泌を指標としたアッセイ系を用いて、受容体に共役する G α サブユニットのサブタイプの同定を試みた。その結果、HEK293 細胞内においては Lyso-PtdGlc 受容体には G α 12/13 ファミリーのサブタイプが特異的に共役し、Lyso-PtdGlc 依存的に受容体下流シグナルを活性化した。以上の結果から、TrkA 陽性 DRG 神経細胞の軸索において、G α i のみでなく、G α 12/13 ファミリーも Lyso-PtdGlc による軸索反発シグナルに関与す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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

森 達也 (MORI TATSUYA)

独立行政法人理化学研究所・神経成長機構

研究チーム・研究員

研究者番号：70469922

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし