

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 2 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：8 2 6 4 8

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：2 3 6 5 7 0 5 2

研究課題名（和文） 神経シナプス機能の基盤となるスパイン形態の解析

研究課題名（英文） Regulation of the morphology of neuronal dendritic spines involved in synaptic function

研究代表者

椎名 伸之（SHIINA NOBUYUKI）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：3 0 3 3 2 1 7 5

研究成果の概要（和文）：

Rho ファミリー-GEF を光刺激依存的に活性化させ、繊維芽培養細胞および神経初代培養細胞スパイン（後シナプス）の形態変化の解析をおこなった。繊維芽細胞では、RacGEF はラメリポディアの発達を、RhoGEF はストレスファイバーの発達を、それぞれ誘導した。さらに神経細胞では、RacGEF はスパイン数の増加を、RhoGEF はスパインサイズの減少をそれぞれ誘導した。以上の結果から、Rho ファミリーの人為的な活性化によって、スパインの変化を操作できることが示された。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed changes in the morphology of cultured fibroblasts and postsynaptic spines in cultured neurons induced by activation of Rho family proteins. The activation of Rho family proteins was artificially triggered by photoactivation-dependent translocation of Rho family GEFs to the plasma membrane. In fibroblasts, RacGEF induced the formation of lamellipodia, and RhoGEF induced the formation of stress fibers. In neurons, RacGEF increased the number of spines, and RhoGEF reduced the size of spines. The changes in fibroblasts and synaptic spines were consistent with previous reports. These results show that synaptic spines can be manipulated by artificial activation of Rho family proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：微細構造・神経細胞・Rho ファミリー-GEF・スパイン・光刺激

## 1. 研究開始当初の背景

神経細胞はシナプスでつながり、興奮性および抑制性の神経伝達物質によって次の神経細胞へ信号を伝える。信号を受け取る部位は後シナプスと呼ばれ、特に興奮性信号を受け取る後シナプスは「スパイン」と呼ばれる突起構造になっている。スパインは、シナプス形成初期には filopodia 様の細長い突起であるが、成熟するに従って mushroom 型に膨

らみ、さらに長期増強によってそのサイズが増大する。このような可塑性を持つことから、スパインは脳における情報の処理と保存の鍵を握ると考えられている。スパインの形態変化の過程でスパイン内でのアクチン線維の再編成が起こり、アクチン重合が促進されることが必須である。

アクチン線維の重合や再編成は、Rho ファミリー-GTPase（Rho, Rac, cdc42）によって

制御されることが知られている。例えば繊維芽細胞の移動において Rac, cdc42 は先端でのアクチン重合を介してそれぞれラメリポディア、フィロポディアの形成を促進し、細胞移動に主要な役割を果たす。また、Rho は移動細胞の後部でアクチン線維の収縮を促進することによって細胞の形態を変える他、ストレスファイバー形成の促進に関与する。

2009 年に、Rho ファミリータンパク質の GDP/GTP 交換因子 (GEF) を人為的に細胞膜へ移動させ、Rho ファミリータンパク質の活性化を誘導する手法が開発された (Levskaya, A et al, *Nature* 461, 997-1001, 2009)。この方法は phytochrome B (PhyB) と phytochrome interaction factor 6 (PIF6) との結合および解離を 650 nm および 750 nm の光照射で自由に制御できる系を応用したもので、Rho ファミリータンパク質の活性の ON/OFF を光照射によって自由に制御することができる。この手法を用いると、繊維芽細胞にラメリポディア形成を誘導し、その形態を操作できることが示された。本研究ではこの技術を神経細胞のスパインに応用し、その形態を人為的に操作することにチャレンジする。

## 2. 研究の目的

これまでの研究によって、興奮性シナプスの形成とスパイン形態には密接な関連があることが明らかにされてきた。しかし、スパインの形態がシナプスの機能を規定できるかどうかについては未知である。また、興奮性のシナプス刺激だけではなく、抑制性のシナプス刺激もスパインの形態との関連性があるかどうかについても未知の部分が多い。

本研究では、スパインの形態を操作することによってシナプス形成および機能に影響を与えることができるか否かに挑戦する。そのために、Rho ファミリータンパク質である Rho, Rac, cdc42 の活性を光刺激で操作することによって、アクチンダイナミクス、さらにスパイン形態を変化させることに挑む。

また、興奮性 / 抑制性の刺激を調節することによって、Rho, Rac, cdc42 の活性、スパインのアクチンダイナミクス、さらにスパインの形態がどのように変化するかを解析する。

以上の当初の研究目的を遂行する上で、Rho, Rac, cdc42 の活性を光刺激で操作する実験系の確立と確認が必要であった。そのため、繊維芽培養細胞 A6 を用い、その形態変

化を観察することによって実験系の有効性を確認することも本研究の主要な目的である。

## 3. 研究の方法

PhyB および PIF6 が培養細胞内で 650 nm の光刺激依存的に結合するか否かを確認するために、A6 細胞に PhyB-mCherry-CAAX および mYFP-PIF6 をリポフェクション法により遺伝子導入した。PhyB は CAAX により膜局在し、mCherry によってその局在を可視化することができる。PhyB が PIF6 と結合するためには、PhyB に phycocyanobilin (PCB) が結合していることが必要なため、精製 PCB を最終濃度 5  $\mu$ M で細胞培養液に添加した。なお、この添加に先立ち、細胞培養液は 10% FBS in L-15 培地から 1% BSA in L-15 培地に置換し、6 時間以上の培養をおこなった。PCB 添加後 30 分インキュベーションした後、細胞に赤色光 (約 650 nm) を当て、mYFP-PIF6 の細胞質から細胞膜への移行を蛍光顕微鏡で可視化することによって、PhyB と PIF6 の結合の誘導を確認した。なお、PCB 添加以降の操作はすべて暗所でおこなった。

次に、PhyB-PIF6 の結合を利用して、Rho ファミリータンパク質 GEF の膜結合を誘導し、活性化させる実験をおこなった。実際には、A6 細胞に PhyB-mCherry-CAAX および GEF-mYFP-PIF6 遺伝子を導入した。GEF として RacGEF である Tiam, cdc42GEF である intersectin, および RhoGEF である Tim の 3 種類を用いた。mCherry の蛍光観察によって細胞形態を可視化し、光照射の前後で細胞形態の変化の比較をおこなった。

さらに、同様の方法を用いて、神経初代培養細胞で Rho ファミリータンパク質 GEF の膜結合を誘導し、活性化させる実験をおこなった。神経細胞は、胎生 17 日目のマウス胎仔 大脳由来の分散培養細胞を用い、培養 7 日目に PhyB-mCherry-CAAX および GEF-mYFP-PIF6 をリン酸カルシウム法により遺伝子導入した。その 24 時間後に培地を B-27 in Neurobasal-A 培地から 1% BSA in Neurobasal-A 培地に置換し、1 時間培養した後に PCB を添加し、30 分のインキュベーションをおこなった。その後、A6 細胞の場合と同様に光刺激と蛍光観察をおこなった。

## 4. 研究成果

(1) 赤色光照射による PhyB と PIF6 の結合の誘導

A6 細胞に PhyB-mCherry-CAAX および mYFP-PIF6 を発現し、PhyB-mCherry-CAAX が細胞膜局在することを確認した (図 1)。また、赤色光照射前には mYFP-PIF6 の細胞局在は主に核内と細胞質であり、細胞膜に局在する様子は観察されなかった (図 1、上段)。一方、細胞に赤色光照射をおこなったところ、mYFP-PIF6 の細胞膜への集積が観察された (図 1、下段)。以上の結果から、赤色光照射により PhyB と PIF6 の結合が誘導され、PIF6 の細胞膜移行が起こることが示された。

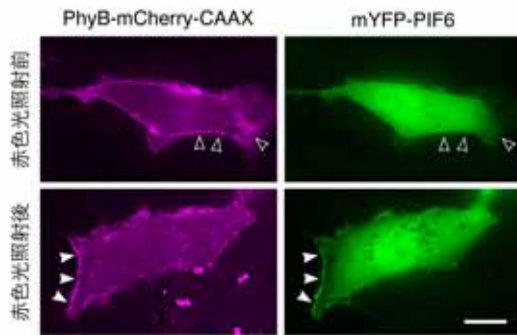


図 1 . 赤色光照射による PIF6 の膜移行。

A6 細胞に PhyB-mCherry-CAAX および mYFP-PIF6 を発現させ、赤色光照射前 (上段) および照射 10 分後 (下段) のそれぞれの局在を蛍光可視化した。照射前は PIF6 の膜局在は認められないが (黒矢頭)、照射後に PIF6 の膜局在が増加した (白矢頭)。スケールバー、10  $\mu\text{m}$ 。

### (2) Rho ファミリータンパク質 GEF を発現した細胞の赤色光照射による形態変化

A6 細胞に PhyB-mCherry-CAAX および GEF-mYFP-PIF6 を発現し、赤色光照射による細胞形態の変化を観察した。GEF として RacGEF である Tiam を導入したところ、赤色光照射後にラメリポディアが発達する様子が観察された (図 2、A)。Levskeya らの 2009 年の論文で、RacGEF-mYFP-PIF6 発現細胞の赤色光照射によって同様の結果が報告されており、我々の結果は、今回用いた実験系が有効であることを示している。さらに、GEF として RhoGEF である Tim を導入した実験では、赤色光照射後に細胞が角張った形態へ変化するという新知見を得た (図 2、B)。また、GEF として cdc42GEF である intersectin を導入した実験では、目立った形態変化は認められなかった。

過去の報告では、Rac の活性化はラメリポディアの、Rho の活性化はストレスファイバーの発達をそれぞれ促進することが明らかにされている (Hall, A, *Science* 279, 509-514, 1998; Ridley, AJ and Hall, A, *Cell* 70, 389-399, 1992)。本研究の結果はこれら

の報告に良く対応しており、赤色光照射により GEF が細胞膜へ移行することによって、Rho ファミリータンパク質が活性化されたことが強く示唆される。

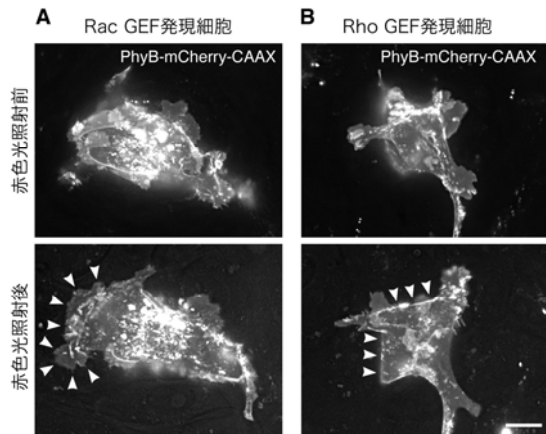


図 2 . Rho ファミリータンパク質 GEF 発現細胞の赤色光照射による形態変化。

RacGEF-mYFP-PIF6 発現 A6 細胞 (A) および RhoGEF-mYFP-PIF6 発現 A6 細胞 (B) の形態を、PhyB-mCherry-CAAX の蛍光により観察した。光照射前後で同一細胞を観察している。RacGEF 発現細胞では、赤色光照射 20 分後にラメリポディアの発達が見られた (A、矢頭)。また、RhoGEF 発現細胞では、赤色光照射 20 分後に細胞が角張った形態へと変化した (B、矢頭)。スケールバー、10  $\mu\text{m}$ 。

### (3) Rho ファミリータンパク質 GEF を発現した神経細胞スパインの赤色光照射による変化

マウス大脳皮質由来神経培養細胞に PhyB-mCherry-CAAX を発現し、これが A6 細胞の場合と同様に細胞膜に局在することを確認した (図 3)。また、GFP の発現によって樹

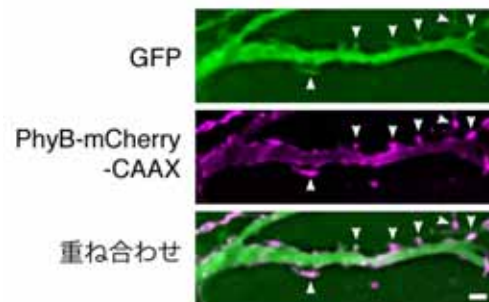


図 3 . 神経細胞スパインの PhyB-mCherry-CAAX による可視化。

マウス大脳皮質由来神経培養細胞に GFP および PhyB-mCherry-CAAX を発現させた。写真は樹状突起の一部を示す。矢頭はスパインを示し、PhyB-mCherry-CAAX が強く濃縮した。スケールバー、1  $\mu\text{m}$ 。

樹状突起上の棘状突起としてスパインを可視化することができるが、そのスパインに PhyB-mCherry-CAAX が強く濃縮することがわかった(図3)。そこで本研究では、以降、PhyB-mCherry-CAAX の蛍光によってスパインの可視化をおこなった。

Rho ファミリータンパク質の活性化がスパインの形態・形成に及ぼす影響を調べる目的で、神経培養細胞に PhyB-mCherry-CAAX および GEF-mYFP-PIF6 を発現し、赤色光照射をおこなった。GEF として RacGEF である Tiam を導入したところ、赤色光照射後にスパインの増加が観察された(図4、A)。これとは逆に、GEF として RhoGEF である Tim を導入した実験では、赤色光照射後にスパインの減弱が認められた(図4、B)。また、GEF として cdc42GEF である intersectin を導入した実験では、スパインの目立った変化は認められなかった。

過去の報告では、Rac の活性化はスパイン形成を促進し、逆に Rho の活性化はスパインの減少を引き起こすと考えられている(Govek, E et al, *Genes Dev* 19, 1-49, 2005)。我々の結果はこれらの報告と一致しており、本研究で用いた実験系の有効性を示すと

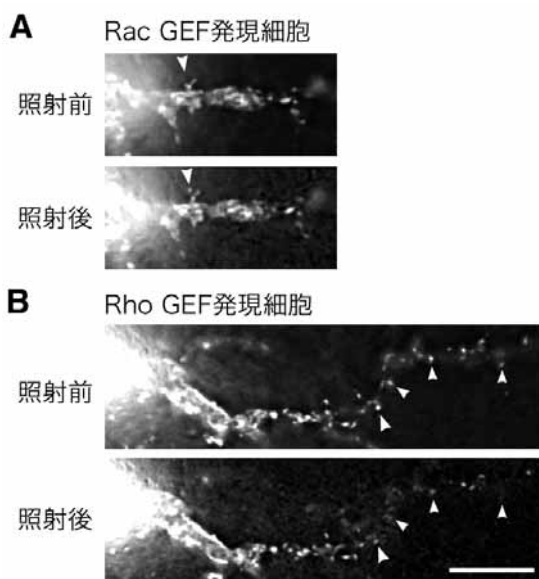


図4 .Rho ファミリータンパク質 GEF を発現した神経細胞スパインの赤色光照射による変化。

RacGEF-mYFP-PIF6 発現神経細胞 (A) および RhoGEF-mYFP-PIF6 発現神経細胞 (B) を、共発現した PhyB-mCherry-CAAX の蛍光により観察した。写真は、細胞体およびそこから伸びた樹状突起の一部を示す。赤色光照射前後で同一細胞を観察している。RacGEF 発現細胞では、赤色光照射 30 分後にスパインの増加が観察された(A, 矢頭)。また、RhoGEF 発現細胞では、赤色光照射 30 分後にスパインにおける蛍光シグナルの減弱が認められた(B, 矢頭)。スケールバー、10  $\mu$ m。

時に、スパインの形態・数を人為的に任意のタイミングで操作できることを示した。

PhyB-PIF6 を用いた Levskaya らの実験では、PhyB と PIF6 の結合が 650 nm の光照射で誘導できることに加えて、750 nm の光照射で解離を促進できることが示されている。今回の我々の研究においては、顕微鏡に 750 nm の光源を設置できていないことから、解離促進の実験は今後の課題として残されている。また、光照射を限定された範囲に絞ることによって、PhyB-PIF6 の結合・解離を細胞の局所に限定するという課題も残されている。将来、このような課題を解決することによって、個々のスパインにおける Rho ファミリータンパク質の活性の ON/OFF、ひいては個々のスパイン形成の人為的操作を可能にすることが期待できる。

## 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1件)

椎名伸之、RNA granule による樹状突起への mRNA 輸送と局所的タンパク質合成、細胞工学、査読無、31 巻、2012、655-659

〔学会発表〕(計4件)

椎名伸之、mRNA 輸送・翻訳制御粒子の形成・解体メカニズム、第3回神経科学と構造生物学の融合研究会、2012年10月5日、大阪

椎名伸之、Dendritic mRNA transport and local translation are responsible for the formation of neuronal networks、第34回日本神経科学大会、2011年9月16日、横浜

椎名伸之、mRNA transport and local translation in neuronal dendrites、名古屋大学グローバルCOE第5回リトリート、2011年9月5日、長浜

椎名伸之、神経 mRNA 輸送による樹状突起・神経ネットワーク形成、第63回日本細胞生物学会大会、2011年6月28日、札幌

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/neurocel/>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

椎名 伸之 (SHIINA NOBUYUKI)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：30332175

(2)研究分担者

(3)連携研究者

中山 啓 (NAKAYAMA KEI)  
大学共同利用機関法人自然科学研究機構  
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイ  
エンスセンター・助教  
研究者番号：40553590