

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700456

研究課題名(和文)cAMP/cGMPによる微小管動態の拮抗制御とその機能的意義

研究課題名(英文)Functional significance of microtubuledynamics controlled counteractively by cAMP and cGMP

研究代表者

秋山 博紀(Akiyama, Hiroki)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：40568854

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文):発生期,神経細胞は軸索突起を伸長させ,定められた標的と連絡構造を形成する。この軸索投射の正確性は,軸索進路上に存在するガイダンス因子とその情報に基づいた進路転換を担う成長円錐(軸索先端部に存在し,軸索を牽引する器官)に依存している。成長円錐の進路転換を引き起こす細胞内メカニズムを解明することは,神経回路網構築原理を理解する上で非常に重要である。本研究では,ガイダンス因子受容により産生される細胞内セカンドメッセンジャーである環状ヌクレオチドが,成長円錐内の微小管および細胞内膜小胞動態を制御することで軸索の進路転換を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文):During development, neurons extend axons to make connections with the targets. The growth cone at the tip of the elongating axon senses guidance cues in the extracellular environment and thus plays a central role in establishing the proper connections. Elucidating intracellular events mediating growth cone steering is essential for understanding the basis of neuronal circuit assembly. In this project, I showed that cyclic nucleotides mediate axon guidance by regulating microtubule-dependent vesicle transport in the growth cones.

研究分野:総合領域

科研費の分科・細目:脳神経科学,神経化学・神経薬理学

キーワード:軸索ガイダンス 成長円錐 cAMP cGMP 微小管

1. 研究開始当初の背景

複雑かつ精巧な神経回路網が構築されるには、膨大な数の神経細胞が正しく配線される必要がある。発生期、伸長中の軸索先端部に現れる成長円錐は、外環境中に提示される様々な軸索ガイダンス因子から情報を受け取り、正しい標的まで軸索を牽引する。成長円錐は複数種の因子に同時に遭遇するため、それらの情報を統合し、進路を決定すると考えられる。しかしながら、情報統合が細胞内シグナルのどの段階で行われているかは不明である。

成長円錐が進路転換をするには、成長円錐を構成する膜成分や細胞骨格(微小管やアクチンフィラメントなど)の再構成が必要不可欠である。例えば、微小管のダイナミクスを阻害すると、反発因子に遭遇してもそれを回避できなくなってしまう。また、これらの構成成分の動態を成長円錐の左右で非対称化させることで軸索の進路を転換させることが可能である。すなわち、ガイダンス因子は細胞内シグナル経路を介してこれらの構成成分の動態を左右非対称に制御することで成長円錐の進路を決定していると考えられる。多くの誘引性因子は cAMP の、反発性因子は cGMP の上昇を促すことから、これらのシグナルによって構成成分動態が拮抗的に制御される可能性が考えられる。しかしながら、ガイダンス因子により惹起される cAMP・cGMP シグナルの成長円錐における時空間分布を解析した研究はなされていない。故に環状ヌクレオチドが実際に進路方向決定シグナルとして働くか否かは不明である。さらに、環状ヌクレオチドシグナルによる成長円錐の進路転換誘発メカニズムは全く解明されていない。

研究代表者らの予備実験により、成長円錐周辺部への微小管の張り出しが、cAMP によって促進され、cGMP によって抑制されることを示唆する結果を得ている。

2. 研究の目的

本研究課題は、環状ヌクレオチドによる成長円錐進路転換誘発メカニズムを解明することを目的とした。具体的な作業仮説として、「cAMP と cGMP による微小管動態の拮抗的制御によって、成長円錐の進路が決定される」を立て、これを検証するため以下を行うこととした。

(1) 成長円錐片側での cAMP・cGMP 濃度上昇の成長円錐進路への影響の解析

(2) 成長円錐片側での cAMP・cGMP 濃度上昇時の微小管動態の解析

(3) 微小管動態制御の下流で成長円錐進路の決定に関与する機構の解明

(4) 生理的軸索ガイダンス因子による誘導に上記(3)までに明らかにした機構が関与することの証明

3. 研究の方法

本研究課題では、胚生 9 - 10 日のニワトリ胚から調整した脊髄後根神経節(DRG)細胞の分散培養系を用いた。

(1) 成長円錐片側で人為的に cAMP・cGMP 濃度を上昇させるため、ケージド cAMP およびケージド cGMP と紫外レーザー光による光解離システムを用いた。ケージド化合物は、光分解性保護基を付加した生理活性物質であり、脱保護光照射により活性化される。ケージド cAMP およびケージド cGMP を導入した成長円錐の片側に直径約 1 μm の紫外レーザー光を照射し、60 分後の成長円錐の位置から進路転換の角度を定量した。

(2) cAMP・cGMP シグナルが成長円錐内の微小管動態に及ぼす影響を解析するための指標として、微小管先端部が成長円錐先端部に接触する頻度を定量した。微小管先端部は、伸長中の微小管先端部に集積する end binding protein 1 に EGFP 標識を施したものを、形質膜は mCherry に K-Ras の C 末端配列(CAAX 配列)を付加した融合タンパク質を DRG 細胞に発現させることで可視化した。ケージド化合物の光解離には、ピンホールにより焦点面における照射範囲を直径約 10 μm に絞ったキセノン光源由来の紫外光を用いた。

(3) 成長円錐内での vesicle-associated membrane protein (VAMP)7 の動態を可視化するため、mRFP または mCherry 標識した VAMP7 を発現させた。VAMP7 動態は、成長円錐中心部から周辺部へ向かって移動する VAMP7 の頻度を指標として解析した。

(4) 生理的ガイダンス因子として pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) を用いた。先端部直径約 1 μm のガラスピペットに 5 μM の PACAP を充填し、成長円錐からの距離 50 - 100 μm の位置に置いた。ガラスピペットに間欠的に空気圧(4 psi, 20 ms duration, 2Hz)を与えることで、培養液中に PACAP の濃度勾配を生成した。PACAP 濃度勾配の軸索誘引活性は、濃度勾配負荷開始から 60 分後の成長円錐の位置を基に進路転換の角度を定量し、解析した。PACAP 濃度勾配存在下での成長円錐内の cAMP 濃度変動は、cAMP 結合の有無によって Förster resonance energy transfer (FRET) 効率が変化するように設計されたセンサー、Epac2-camps (Nikolaev et al., *J Biol Chem* 279(36):37215 - 37218) に CAAX 配列を付加したものをを用いて解析した。微小管および VAMP7 動態は、上記(2)および(3)に記した方法で解析した。

4. 研究成果

(1) ケージド cAMP および cGMP を導入した成長円錐の片側に紫外レーザー光を照射し、局所的にケージド化合物を光解離したところ、cAMP 濃度上昇に対しては誘引応答を、cGMP 濃度上昇に対しては反発応答を示した。また、cAMP による誘引は、微小管動態の薬理

学的阻害によって消失した。これらの結果は、環状ヌクレオチドが進路方向指示シグナルとして機能すること、さらに、この進路転換には微小管動態の制御が関与することを示唆している。

(2) ケージド cAMP および cGMP を成長円錐片側で光解離し、それによる微小管動態の変化を解析した。微小管が先導端に接触する頻度は cAMP 濃度上昇によって増加し、反対に cGMP 濃度上昇によって減少した。この結果は、上記(1)で得た結果とよく一致する。さらに、微小管の接触により先導端が突出することを見出した。cAMP 上昇側では先導端突出頻度が増加し、cGMP 上昇側では減少することになるため、これが進路転換を引き起こす機構であると考えられる。

(3) 微小管の接触による先導端突出をもたらす機構として、小胞輸送の可能性を検討した。VAMP7 は軸索伸長を正に制御することが報告されていたため (Martinez-Arca et al., *J Cell Biol* 149(4):889-900), 環状ヌクレオチド濃度上昇による VAMP7 陽性小胞動態の変化を解析した。VAMP7 小胞の成長円錐周辺部への飛び出し頻度は、cAMP 濃度上昇によって増加し、cGMP 濃度上昇によって減少した。また、VAMP7 小胞の接触によって先導端が突出すること、および、成長円錐周辺部への微小管の張り出しと VAMP7 小胞の飛び出し頻度に正の相関を見出した。さらに、VAMP7 の自己抑制領域である longin domain (LD) の発現によって、微小管接触による先導端突出が抑制され、ケージド cAMP・cGMP に対する成長円錐の進路転換応答も消失した。これらの結果から、環状ヌクレオチドは微小管動態の制御を介して VAMP7 小胞動態を変化させ、成長円錐の進路を決定していると考えられる。

(4) 上記(3)までに明らかにした機構が、生理的軸索ガイダンス因子による軸索誘導にも関与するかを検討するため、cAMP 濃度を上昇させることが知られている PACAP による軸索誘引をモデル系として用いた。PACAP 濃度勾配存在下での成長円錐内における cAMP 濃度変動を Epac2-camps-CAAX を用いて解析したところ、より高濃度の PACAP に曝された側でより大きな FRET 効率の変化が観察された。この変化が Gs の阻害剤である NF-449 添加によって消失したことから、成長円錐内で非対称的な cAMP 濃度上昇が起こっていると考えられる。続いて、PACAP 濃度勾配存在下における微小管および VAMP7 小胞動態を解析した。微小管先端部が成長円錐先導端に接触する頻度、および VAMP7 小胞が先導端へ向かって移動する頻度は、より大きく cAMP 濃度が上昇した側で増加した。さらに、PACAP による軸索誘引が、微小管動態の阻害、および LD の発現により消失したことから、生理的ガイダンス因子による軸索誘導にも、環状ヌクレオチドによる微小管および VAMP7 小胞動態の制御機構が関与していると考えられる。

本研究により、環状ヌクレオチドが軸索進

路決定シグナルとして機能すること、さらに進路転換をもたらす細胞内メカニズムが明らかとなった。これまでの多くの研究はカルシウムイオンによる軸索誘導メカニズム着目してきた。今回、環状ヌクレオチドによる誘導メカニズムに関する知見を得たことで、異なるセカンドメッセンジャー経路の比較が可能となった。これは、軸索の経路選択の細胞内過程を統合的に理解する上で非常に有用である。また、環状ヌクレオチドシグナルは神経細胞の極性化(樹状突起・軸索の獲得)を引き起こすことが知られていることから、本研究の成果は、神経細胞極性化の細胞内メカニズムの解明にも貢献するものと考えられる。さらに、脊髄損傷後の神経軸索再生不全は cAMP シグナルの活性化によって克服可能との報告もあり、本研究は軸索再生医療へも重要な基礎的知見を与えるものである。

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)

秋山 博紀, 戸島 拓郎, 上口 裕之, 神経軸索突起の進路決定メカニズム, 生化学, 査読無, 84, 2012, pp. 848 - 853, http://www.jbsoc.or.jp/back_no/84-10

戸島 拓郎, 秋山 博紀, 上口 裕之, 神経軸索突起をターゲットへ導く細胞内メカニズム, 生物物理, 査読無, 51, 2011, pp. 214 - 217, https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/51/5/_contents/-char/ja/

[学会発表](計 6件)

秋山 博紀, 福田 徹子, 戸島 拓郎, 上口 裕之, カルシウムおよびサイクリックヌクレオチドはそれぞれ異なる v-SNARE を介して成長円錐の進路を決定する, 第36回日本神経科学大会, 2013年6月20日~2013年6月23日, 国立京都国際会館(京都)

チャン カルメン, 秋山 博紀, 御子柴 克彦, 上口 裕之, IP3 receptor/channel and axon guidance, 第36回日本神経科学大会, 2013年6月20日~2013年6月23日, 国立京都国際会館(京都)

寺崎 朝子, 兼子 純平, 角田 大朗, 中山 綾子, 秋山 博紀, 上口 裕之, Iasp-2 の発現抑制時におけるニワトリ DRG 神経細胞の運動解析, 第65回日本細胞生物学会, 2013年6月19日~2013年6月21日, ウィンクあいち(愛知)

秋山 博紀, 福田 徹子, 戸島 拓郎, 上口 裕之, cAMP/cGMPによる微小管依存的な小胞輸送の拮抗制御の成長円錐ガイダンスにおける役割, 第35回日本神経科学大会, 2012年9月18日~2012年9月21日,

Hiroki Akiyama, Takuro Tojima,
Hiroyuki Kamiguchi, Attractive axon
guidance requires
phosphatidylinositol
3-kinase-dependent membrane
trafficking in the growth cone, 8th
IBRO World Congress of Neuroscience,
July 14th, 2011 - July 18th, 2011,
Fortezza da Basso, Florence, Italy
秋山 博紀, 神経成長因子による神経成
長円錐ガイダンスの分子機構, 第9回糖
鎖科学コンソーシアムシンポジウム,
2011年11月24日~2011年11月25日, 名古
屋大学豊田講堂, 愛知

〔図書〕(計 1件)

Hiroki Akiyama and Hiroyuki Kamiguchi,
Springer, Axon Growth and
Regeneration (Methods in Molecular
Biology series), Chapter2: Analysis
of calcium signals in steering
neuronal growth cones in vitro, 2014,
in press

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 博紀 (AKIYAMA, Hiroki)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研
究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号: 40568854

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者