

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 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21700411

研究課題名（和文） Semaphorin3A シグナルの細胞内伝播機構の解明

研究課題名（英文） The propagation mechanism of Semaphorin3A signaling in neurons

研究代表者

山下 直也 (YAMASHITA NAOYA)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：40508793

研究成果の概要（和文）：神経細胞は、細胞体、軸索、樹状突起と呼ばれる特徴的な細胞区画を有する細胞である。これらは常に相互に情報交換をしており、例えば軸索先端で感知された情報を、他の細胞区画まで伝える必要がある。本申請課題では、軸索の伸長制御に関与する分子の情報が、軸索だけでなく細胞体や樹状突起まで伝わることを明らかにした。さらにこのように伝えられた情報を介して、樹状突起の発育や成熟が制御されることが分かり、実際に神経発生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Neurons are highly polarized cells with axon, dendrites, and cell body. These subcellular compartments need to communicate with each other. For example, signals received in distal axon travel long distances to reach the cell body and/or dendrites. In present study, I identified novel mechanism that the signal elicited by axon guidance molecule which is received at axonal growth cone, is transmitted towards cell body and dendrites. I further found that this novel signaling mediates dendritic morphology and maturation. Therefore I propose the model that the axon guidance signal which is received at distal axon simultaneously regulates dendritic development by this novel signal propagation mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2011年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：セマフォリン、神経栄養因子、シグナル伝播

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は、樹状突起・細胞体と軸索という高度に極性化した構造を有し、各々情報の

入力系および出力系を形成している。しかしながら最近では、出力系である軸索からの逆行性シグナルが、樹状突起の成熟を制御する

機構の存在が明らかにされ、その分子機構の解明が求められている。本研究では、軸索ガイド分子の1つである **Semaphorin3A (Sema3A)**の作用点が軸索成長末端の成長円錐に限局するという作用様式に着目し、局所からの逆行性シグナルが細胞内をどのように伝播し、その結果どのような作用を發揮するかの解明を目的とした。本研究の追究を通じて、**Sema3A** に対する神経細胞の応答の全容を明らかにするとともに、逆行性シグナルの伝播機構における新たな分子機構を提唱できると考えられる。

2. 研究の目的

本課題の開始に先立って、申請者は **Sema3A** の受容体である **PlexinA** が、神経栄養因子受容体である **Trk** 受容体と相互作用することを突き止めた。興味深いことに、神経栄養因子と **Trk** 受容体の神経細胞内情報伝達過程において、軸索先端からの入力シグナルが、**Trk** 受容体の逆行性軸索輸送を介して細胞体方向へと伝搬する、逆行性シグナルの存在が提唱されている。従って、**Sema3A-PlexinA** によるシグナル伝達経路において、逆行性シグナルが存在するのであれば、**Trk** 受容体を介して **PlexinA** が逆行性に軸索内を輸送されるのではないかと考えられた。そこで本課題では、**Sema3A** シグナルが軸索先端の成長円錐から入り、**Trk** 受容体との相互作用を介した軸索内輸送により逆行性に伝播する機構を証明することを目的とした。また、逆行性シグナルの存在が証明された際に、その生理学的意義についても検討する必要がある。**Sema3A** および神経栄養因子は、共に樹状突起の発育および成熟を制御することから、**Sema3A** による軸索先端からの逆行性シグナルが、樹状突起の発育および成熟にも関与するかを検討することも視野に入れた実験計画を立案した。

3. 研究の方法

(1) Sema3A-PlexinA シグナルの逆行性伝播機構の解明

Sema3A-PlexinA シグナルが、**Trk** 受容体を介して逆行性に伝搬することを明らかにするため以下の実験手法により解析を行った。

- ① 培養脊髄後根神経節ニューロンを用いた免疫組織学的解析
- ② 培養脊髄後根節ニューロンを用いたタイムラプスイメージング
- ③ 培養海馬ニューロンにおける RNA 干渉法を用いた分子細胞生物学的ならびに生化学的解析

(2) Sema3A による逆行性シグナルを介した樹状突起発育・成熟機構の解明

(1)の研究計画から明らかにした、**Sema3A-PlexinA** を介した軸索からの逆行性シグナルが、樹状突起の発育や成熟を制御することを明らかにするため以下の実験手法により解析を行った。

- ① **PlexinA** と **Trk** 受容体の相互作用部位の生化学的解析
- ② 逆行性シグナルの伝搬において、**PlexinA** と **Trk** 受容体の作用点の細胞生物学的解析
- ③ 逆行性シグナルの特異的阻害を介した細胞生物学的解析

4. 研究成果

(1) Sema3A-PlexinA シグナルの逆行性伝播機構の解明

まず、**Sema3A** 刺激により **PlexinA** や **Trk** 受容体が逆行性に輸送されるかを明らかにするため、これらに蛍光タンパク質を融合させたものを培養脊髄後根神経節ニューロンに発現させ、その挙動をタイムラプスイメージング法にて観察した。その結果、**PlexinA** と **Trk** 受容体が逆行性に輸送される輸送速度が、**Sema3A** 刺激により上昇することが分かった。従って、これらの分子が **Sema3A** シグナルの下流で逆行性に軸索輸送される可能性が示唆された。

次に、すでにこれらの分子が相互作用することを強制発現系の実験により明らかにしていたことから、培養脊髄後根神経節ニューロンにおける内因性のタンパク質の挙動を免疫細胞化学的に検討した。その結果、**PlexinA** と **Trk** 受容体は、**Sema3A** 刺激により、まず軸索先端の成長円錐で共局在した。**Sema3A** 刺激からの時間を振って挙動の観察をした結果、共局在シグナルが観察される細胞区画が、細胞体方向へ移行することが分かった。従って、これらの分子が協調して逆行性に輸送される可能性が示唆された。そこで、実際に協調して輸送されるかを、**PlexinA** と **Trk** 受容体を共発現させた培養脊髄後根節ニューロンを調整し、タイムラプスイメージング法にて観察した。その結果、**Sema3A** 刺激により、軸索先端の成長円錐において、これらの分子が共局在するようになり、この共局在を契機に細胞体方向へ輸送されることを見出した。さらにこのような **Sema3A** 刺激による挙動変化は、**Trk** 受容体の酵素活性を欠損した変異体や、軸索輸送に関与するモータータンパクとの結合活性を欠損した変異体においては見出されないことが分かった、これらの結果から、**Sema3A-PlexinA** シグナルが、**Trk** 受容体を介して逆行性に伝搬することが

示唆された。

以上の実験は培養脊髄後根神経節ニューロンを用いて行ってきたが、これらの実験から見出した軸索からの逆行性シグナルが、樹状突起まで伝播するかを明らかにするため、樹状突起区画を有する高度に極性化した神経細胞での研究を行うため、培養海馬ニューロンにおける実験も行った。本課題と並行して、研究代表者は、軸索先端からの Sema3A により惹起されたシグナルが、樹状突起における AMPA 型グルタミン酸受容体の局在変化を惹起させることを見出した（学会発表参照）。そこでこの現象に着目し、Trk 受容体が関与するかを検討することを介し、培養脊髄後根神経節ニューロンで見出された事象が、培養海馬ニューロンにおいても起こり得るかを検討した。Trk 受容体には複数のサブファミリーが存在することから、これらのうちのどの Trk 受容体が関与するかを明らかにするため、これらの発現抑制を RNA 干渉法にて行った。その結果、Sema3A による AMPA 型グルタミン酸受容体の局在変化に関与する Trk 受容体の同定に成功した。

Trk 受容体を介したシグナルは、複数の経路を介して細胞内へ伝達される。これらのうちのどの経路が Sema3A を介した情報伝達経路に関与するかを明らかにするかを生化学的に検証した。その結果、下流シグナルの同定に成功した。そこで、同定されたシグナルに対する阻害剤と、Sema3A の軸索先端領域、あるいは樹状突起・細胞体領域における局所投与実験を行った。その結果、阻害剤を軸索先端に局所投与したときのみ、Sema3A による応答が抑制された。以上の結果から、Sema3A による、Trk 受容体を介したシグナルは軸索先端で惹起され、樹状突起まで伝搬することが分かった。

(2) Sema3A による逆行性シグナルを介した樹状突起発育・成熟機構の解明

(1)の実験から、Trk 受容体を介した逆行性シグナルの存在が示唆された。興味深いことに、このシグナルは Sema3A の軸索伸長に対する作用には関与しないことが分かった。従って、PlexinA と Trk 受容体の相互作用を抑制することにより、本課題により見出された逆行性シグナルを、Sema3A の軸索への作用を変化させずに抑制することが可能であると考えられた。そこで、Trk 受容体側の相互作用部位の同定を試みた結果、神経栄養因子の結合部位とは異なる部位が相互作用部位であることが分かった。このことは、RNA 干渉法による発現抑制実験では、神経栄養因子によるシグナルも阻害するが、見出された相互作用部位の強制発現は、Sema3A による逆行性シグナルを特異的に阻害することが可能で

あることを意味すると考えられる。以上の結果を踏まえ、Trk 受容体側の部分ペプチドを作製し、その局所投与実験を行った。その結果、このペプチドを軸索先端に局所投与したときのみ、Sema3A による応答が抑制された。この結果は (1) において、阻害剤を用いた実験結果と一致したことから、Sema3A による逆行性シグナルを阻害する因子として有用であることが示唆された。

つぎにここまでで見出された逆行性シグナルが、実際に樹状突起の発達や成熟に関与するかを明らかにするため、Sema3A による樹状突起への作用として、分枝形成の促進作用に着目した。Trk 受容体側の部分ペプチドを前投与した海馬培養ニューロンに、Sema3A を投与したところ、分枝形成の促進が抑制された。従って、本課題で見出された逆行性シグナルが、実際に樹状突起の発育・成熟制御という、神経発生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。現在は生体レベルでの実験を遂行中である。

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 9 件)

- ① Yamane M, Yamashita N, Yamamoto H, Iizuka A, Shouji M, Usui H, Goshima Y: Semaphorin3A facilitates axonal transport through a local calcium signaling and tetrodotoxin-sensitive voltage-gated sodium channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 422(2):333-38. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.05.003
- ② Yamashita N, Goshima Y: Collapsin Response Mediator Proteins Regulate Neuronal Development and Plasticity by Switching Their Phosphorylation Status. *Molecular Neurobiology*, 2012, 45(2):234-46. DOI: 10.1007/s12035-012-8242-4
- ③ Yamashita N, Ohshima T, Nakamura F, Kolattukudy P, Honnorat J, Mikoshiba K, Goshima Y: Phosphorylation of CRMP2 (Collapsin Response Mediator Protein 2) Is Involved in Proper Dendritic Field Organization. *Journal of Neuroscience*, 2011, 32(4):1360-65. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5563-11.2012
- ④ Yamashita N, Mosinger B, Roy A, Miyazaki M, Ugajin K, Nakamura F, Sasaki Y, Yamaguchi K, Kolattukudy P, Goshima Y: CRMP5 (collapsin response mediator protein 5) regulates

dendritic development and synaptic plasticity in the cerebellar Purkinje cells. *Journal of Neuroscience*, 2011, 31(5):1773-79.

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5337-10.2011

- ⑤ Nishiyama M, Togashi K, von Schimmelmann MJ, Lim CS, Maeda S, Yamashita N, Goshima Y, Ishii S, Hong K: Semaphorin 3A induces CaV2.3 channel-dependent conversion of axons to dendrites. *Nature Neuroscience*, 2011, 13(6):676-85
DOI: 10.1038/ncb2255
- ⑥ Nogi T, Yasui N, Mihara E, Matsunaga Y, Noda M, Yamashita N, Toyofuku T, Uchiyama S, Goshima Y, Kumanogoh A, Takagi J: Structural basis for semaphorin signalling through the plexin receptor. *Nature*, 2010, 467(7319):1123-7.
DOI: 10.1038/nature09473
- ⑦ Goshima Y, Usui H, Shiozawa T, Hida T, Kuraoka S, Takeshita S, Yamashita N, Ichikawa Y, Kamiya Y, Gotoh T, Gotoh T: Computational analysis of the effects of antineoplastic agents on axonal transport. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2010, 114(2):168-79.
DOI: 10.1254/jphs.09352FP
- ⑧ Uchida Y, Ohshima T, Yamashita N, Ogawara M, Sasaki Y, Nakamura F, Goshima Y: Semaphorin3A signaling mediated by Fyn-dependent tyrosine phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 at tyrosine 32. *J Biol Chem*, 2009, 284(40): 27393-401.
DOI: 10.1074/jbc.M109.000240
- ⑨ Nakamura F, Ugajin K, Yamashita N, Okada T, Uchida Y, Taniguchi M, Ohshima T, Goshima Y: Increased proximal bifurcation of CA1 pyramidal apical dendrites in sema3A mutant mice. *J Comp Neurol*, 2009, 516(5): 360-75.
DOI: 10.1002/cne.22125

[学会発表] (計 6 件)

- ① Yamashita N, Chen S, Goshima Y: Semaphorin3A drives AMPA receptor subunit GluR2 to dendrites by a retrograde transport of PlexinA4 along axon. 第 34 回日本神経科学大会, パシフィコ横浜, 2011, 9.15
- ② Yamane M, Yamashita N, Sasaki Y, Nakamura F, Goshima Y: Semaphorin3A

facilitates the axonal transport of PlexinA4 through interaction of PlexinA4 with TrkA. 第 34 回日本神経科学大会, パシフィコ横浜, 2011, 9.15

- ③ Yamane M, Yamashita N, Goshima Y: Evidence for cross-talk between Semaphorin3A and NGF signaling. 第 84 回日本薬理学会年会, パシフィコ横浜, 2011, 3.23
- ④ Yamashita N, Usui H, Chen S, Goshima Y: Semaphorin3A drives AMPA receptor subunit GluR2 to dendrites. *Neuro2010*, 神戸国際会議場, 2010, 9.2
- ⑤ Yamashita N, Usui H, Chen S, Goshima Y: Semaphorin3A drives AMPA receptor subunit GluR2 to dendrites. 第 32 回日本神経科学大会, 名古屋国際会議場, 2009, 9.16
- ⑥ Yamashita N, Takao K, Miyakawa T, Goshima Y: Comprehensive behavioral analysis of the *crmp1* knockout mice. Japan-United States Joint Seminar/2nd Cdk5 International Symposium, 首都大学東京, 2009, 6.26

[図書] (計 1 件)

- ① 山下直也, 中村史雄, 五嶋良郎: 軸索ガイダンスおよびシナプス形成と Cdk5. 蛋白質・核酸・酵素, 54(7), 総ページ数 5 ページ(802-807), 2009 年, 共立出版.

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~pharmac/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 直也 (YAMASHITA NAOYA)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号: 40508793

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

山根 昌之 (YAMANE MASAYUKI)

横浜市立大学・医学研究科・大学院生