

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780098

研究課題名（和文） 神経細胞における cGMP シグナルの機能解析

研究課題名（英文） Studies of cGMP signaling in neurons.

研究代表者

湯浅 恵造 (YUASA KEIZO)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号：70363132

研究成果の概要（和文）：

神経細胞における cGMP/cGK シグナリングの未だ不明確な情報伝達系の解明を試み、以下の成果を得た。

1. cGK Iは細胞内cGMPの上昇に伴って rhotekin をリン酸化し、リン酸化された rhotekin はcGK Iから解離し、神経突起の形成に重要な役割を担うことが示された。
2. cGK Iは TRPC7 と特異的に相互作用することにより、一酸化窒素やナトリウム利尿ペプチドといった刺激に対して迅速かつ正確に TRPC7 をリン酸化することにより、細胞内カルシウム濃度を制御していることが推測された。

研究成果の概要（英文）：

1. Rho effector, rhotekin, was phosphorylated by cGK I. Phosphorylated rhotekin was disassociated from cGK I, and significantly suppressed lysophosphatidic acid- and rho- induced neurite retraction in Neuro2A cells.
2. cGK I interacted with and phosphorylated transient receptor potential channel subfamily C member 7 (TRPC7), contributing to the quick and accurate regulation of calcium influx and CREB phosphorylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：情報伝達

1. 研究開始当初の背景

細胞内セカンドメッセンジャーの一つである cGMP は、一酸化窒素 (NO) およびナトリウム利尿ペプチドによって産生され、主に cGK の活性化を介してそのシグナルを伝達し、種々の生理機能において重要な役割を果たしている。cGK には、選択的スプライシングに

よって N 末端のみが異なる cGK Ia、cGK Ib の 2 つのスプライシングバリエントと別の遺伝子にコードされる cGK II の計 3 種類が存在し、それらは細胞や組織によって、また、時期によって異なる発現パターンおよび細胞内局在を示し、これにより様々な生理機能に対応している。

神経系においてもcGMPシグナリングが重要な役割を担っていることが報告されている。脳の働きの一つである記憶・学習の素過程であるシナプスの伝達効率の変化（シナプス可塑性）にcGMPが深く関与している。また、cGMPはシナプス可塑性以外にcGKIを介して神経回路網の形成にも関与している。神経回路網の形成は、神経細胞の分化、移動、軸索伸長、シナプス形成といった複数の段階を経て成り立っている。cGKIはその欠損マウスの解析から末梢感覚神経細胞の軸索伸長に必須であり、また、軸索ガイダンス因子セマフォリン3による成長円錐の退縮を抑制することが報告されている。さらに、神経成長因子によって軸索伸長するラット副腎髄質褐色細胞腫由来PC12h細胞において、cGMP/cGKIシグナルが神経突起の伸長に必須であることがcGKI阻害剤によって明らかとなっている。しかしながら、未だ神経系におけるcGKIの下流シグナル経路は明らかとされていない。

このような背景を踏まえて、神経細胞におけるcGMP/cGKIを介した新しい情報伝達系の解明を目的とした本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

(1) 神経突起伸長におけるcGKIおよびcGKI結合タンパク質 rhotekin の機能解析

研究代表者は、これまでに神経細胞におけるcGKIの細胞内シグナル伝達機構の解明に向け、cGKIと相互作用するタンパク質を酵母two-hybrid法を用いて探索し、Rho結合タンパク質であるrhotekinを同定した。rhotekinは、活性型RhoAと特異的に結合することが明らかとなっているが、その生理機能については未だ解明されていない。そこで本研究では、神経細胞におけるcGKIとrhotekinの相互作用の生理的意義の解明を行う。

(2) 神経細胞におけるcGKIの新規基質の同定およびその機能解析

非選択的なカチオンチャンネルであるtransient receptor potential channel subfamily C (TRPC) には7つのアイソフォーム (TRPC1-7) が存在し、これらは活性化機構やアミノ酸の相同性に基づいて4つのサブファミリー (TRPC1、TRPC2、TRPC3/6/7、TRPC4/5) に分類される。これらの多くは、リン酸化などの翻訳後修飾によって活性制御を受けることが報告されている。TRPC3およびTRPC6はcGKIによってリン酸化され、そのチャンネル活性が低下することが示されている。一方、TRPC4はcGKIによってリン酸化されたvasodilator-stimulated phosphoprotein

(VASP) と相互作用を示し、これによりチャンネル活性が制御されている。しかしながら、TRPC7に関して、リン酸化などの翻訳後修飾による活性制御に関する報告は未だなされていない。そこで、TRPC7のcGKIによるリン酸化について検討するとともに、その生理的意義および詳細なシグナル伝達機構の解明を試みる。

研究の方法

(1) 神経突起伸長におけるcGKIおよびcGKI結合タンパク質 rhotekin の機能解析

①COS-7細胞にFLAGタグcGKI α あるいはcGKI β をGST融合rhotekinとともに遺伝子導入し、GSTプルダウンアッセイを行った。また、細胞膜透過性cGMPである8-CPT-cGMPによりcGKIを活性化させ、相互作用に及ぼす影響を調べた。さらに、cGKIはrhotekinの93番目Serをリン酸化することから、非リン酸化型変異体 (S93A 変異体) および擬似リン酸化型変異体 (S93D 変異体) をそれぞれ作製し、これらを用いてGSTプルダウンアッセイを行った。

②マウス神経芽腫細胞株Neuro2A細胞にcGKIおよびrhotekinを遺伝子導入し、免疫蛍光細胞染色によって細胞内局在を調べた。また、レチノイン酸により神経突起の伸長を誘導したNeuro2A細胞における細胞内局在についても同様に検討した。さらに、細胞膜透過性cGMP処理による細胞内局在変動についても解析した。

③Neuro2A細胞に野生型rhotekinあるいは擬似リン酸化型変異体 (S93D 変異体) をGFPとともに遺伝子導入した。レチノイン酸により神経突起を伸長させた後、リゾフォスファチジン酸 (LPA) を添加し、神経突起の退縮を促した。細胞固定後、蛍光顕微鏡下で、GFP陽性細胞の神経突起の長さを計測した。また、LPA刺激の代わりに、活性型RhoA (RhoA G14V) およびRho-kinase (ROCK) を遺伝子導入し、神経突起の退縮を引き起こした細胞における野生型rhotekinあるいはS93D変異体の効果についても同様に解析した。

(2) 神経細胞におけるcGKIの新規基質の同定およびその機能解析

①COS-7細胞にFLAGタグを付加したcGKI α とマウスTRPC3あるいはTRPC7を共発現させ、*in vitro* キナーゼアッセイおよびcGKIのリン酸化コンセンサス配列を認識するリン酸化部位特異的抗体 (抗phospho-RRXS*/T*抗体) を用いたイムノプロットング解析によるリン酸化実験を行った。また、cGKIによるリン

酸化部位を決定するために、非リン酸化型変異体 (T15A、T211A、T267A) を作製し、これらを用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行った。②HEK293T細胞を用いて、FLAGタグを付加した野生型TRPC7および擬似リン酸化変異体T15Dを安定発現する細胞を樹立した。これらの細胞をカルバコールで刺激し、細胞内Ca²⁺流入をカルシウム蛍光指示薬Fluo 4を用いて測定した。

また、細胞内Ca²⁺濃度の上昇に伴って転写因子CREB (cAMP response element binding protein) が活性化 (リン酸化) されることから、抗リン酸化CREB抗体を用いたイムノプロテオミクス解析を行った。TRPC7の活性化には、DAGアナログであるOAGを用いた。野生型TRPC7に加えて、擬似リン酸化変異体 (T15D、S211D、S267D) を過剰発現したCOS-7細胞におけるCREBの活性化についても同様に解析した。

4. 研究成果

(1) 神経突起伸長におけるcGK IおよびcGK I結合タンパク質 rhotekin の機能解析

cGK Iは、N末端にあるcGMP結合領域にcGMPが結合することによって立体構造が変化し、その結果として活性を持つとされている。そこで、この活性化が rhotekin との相互作用に影響を及ぼすのか検討した。その結果、cGK I α 、cGK I β ともにcGMPによる活性化によって rhotekin から解離することが明らかになった。次に、cGK Iによるリン酸化部位である93番目Serの変異体 (S93AとS93D) との相互作用について検討した。93番目のSerをAlaに変異したS93A変異体 (非リン酸化型変異体) では、野生型で認められたcGK Iの活性化による解離は認められなかった。これに対して、cGK Iによるリン酸化をミミクしたS93D変異体 (擬似リン酸化変異体) ではcGMP有無にかかわらず弱い結合しか認められなかった。これらの結果より、cGK Iは細胞内cGMP上昇に伴って rhotekin をリン酸化し、その結果、rhotekin から解離することが示唆された。

次に、cGK I α と rhotekin の細胞内局在について検討した。神経突起形成前のNeuro2A細胞では、cGK I α と rhotekin は共に細胞質全体に広く分布した。これに対して、レチノイン酸処理により神経突起を伸長したNeuro2A細胞では、細胞膜や神経突起の先端に共局在した。また、cGK Iの活性化に伴って、rhotekin は細胞膜や神経突起の先端から細胞質に移行した。このとき、cGK Iの細胞内局在に変化は認められなかった。これらの結果から、

Neuro2A細胞においてcGK I α と rhotekin は共局在し、神経突起形成の前後で異なる細胞内局在を示すこと、また、cGK Iの活性化によって、rhotekin はcGK Iから解離し、細胞膜や神経突起の先端から細胞質へ移行することが明らかとなった。

rhotekinは活性型Rhoと特異的に結合することが明らかとなっている。Rhoは、神経細胞において、ROCKを活性化させ、神経突起の退縮を引き起こす。そこで、Rho/ROCKシグナルによる神経突起退縮に及ぼすrhotekinの影響を調べた。まず、レチノイン酸によって神経突起伸長を促したNeuro2A細胞をRho/ROCKシグナルの活性化因子であるリゾホスファチジン酸 (LPA) で処理し、そのときの神経突起の長さを計測した。Neuro2A細胞はレチノイン酸に反応して神経突起を伸長させたが、LPA処理によってその伸長が抑制された。この細胞に野生型rhotekinを発現させるとLPAによる神経突起の退縮が抑制され、伸長傾向が認められた。さらに、S93D変異体の発現では神経突起が有意に伸長することが示された。続いて、Neuro2A細胞に活性型RhoA (RhoA G14V) およびROCKを遺伝子導入し、rhotekinの神経突起退縮作用について検討した。RhoA G14VとROCKを発現させた細胞では、既に報告されているようにレチノイン酸による神経突起の伸長が阻害された。この細胞に野生型rhotekinを共発現させると神経突起伸長の阻害が減少し、S93D変異体では野生型より強い退縮阻害効果を示した。以上の結果より、rhotekinはRhoA/ROCKシグナルによる神経突起退縮を調節し、その調節にcGK Iによるリン酸化が関与する可能性が考えられた。

(2) 神経細胞におけるcGK Iの新規基質の同定およびその機能解析

初めに、TRPC3とTRPC7がcGK Iによってリン酸化されるかどうか*in vitro* キナーゼアッセイにより検討した。TRPC7はcGMP/cGK I α によってリン酸化されたのに対して、TRPC3は弱いリン酸化のみが認められた。また、細胞膜透過性のcGMPである8-CPT-cGMPで処理を行い、リン酸化の検出にanti-phospho RRXS/Tを用いた*in vivo* キナーゼアッセイにおいては、TRPC7のみcGMP/cGK I α 依存的なリン酸化が検出された。さらに、NO供与体であるSNAP処理によりTRPC7はリン酸化され、このリン酸化はcGK阻害剤であるRp-8-CPT-cGMPの前処理により阻害された。これらの結果から、TRPC7はcGK Iの基質であることが示唆された。

TRPC7には、cGKのリン酸化モチーフ配列(R-R/K-X-S/T)が3箇所存在するため、ThrあるいはSerをAlaに置換した変異体(T15A、S211A、S267A)をそれぞれ作製し、どの部位がcGKIによってリン酸化されるのか検討した。*in vitro* キナーゼアッセイの結果、cGKIはTRPC7の15番目のThrをリン酸化することが明らかになった。

TRPC7はCa²⁺、Na⁺といったイオンを細胞内へ透過する役割を果たしている。そこで、cGKIによるリン酸化がTRPC7を介したCa²⁺流入に及ぼす影響を検討した。カルバコール刺激により細胞内Ca²⁺濃度の上昇が認められたが、野生型TRPC7安定発現株と比較して、擬似リン酸化型変異体であるTRPC7 T15D安定発現株においてCa²⁺流入が有意に抑制された。

さらに、CREBのリン酸化に及ぼす影響についても検討した。未処理細胞と比較してOAG処理細胞では、TRPC7依存的にCREBのリン酸化が促進されたが、cGMP前処理によりそのリン酸化が抑制された。また、擬似リン酸化型変異体(T15D、S211D、S267D)を遺伝子導入し、OAG刺激によるCREBのリン酸化を調べた結果、S211D、S267D変異体ではCREBリン酸化に変化が認められなかったのに対して、T15D変異体ではCREBのリン酸化が抑制されることが明らかになった。さらに、非リン酸化型変異体(T15A)とcGKIαを共発現させた細胞では、cGMP処理によるCREBリン酸化の抑制は認められなかった。これらの結果から、cGKIは15番目Thrのリン酸化を介してTRPC7の機能を負に制御することが考えられた。

免疫細胞染色により、TRPC7およびcGKIの細胞内局在を調べた。GFP-cGKIαを単独で発現させると細胞質に局在したが、FLAG-TRPC7と共発現させるとcGKIαは細胞質から細胞膜へ移行してTRPC7と共局在した。これらのことから、cGKIαはTRPC7と相互作用する可能性が考えられた。そこで、cGKIとTRPC7の相互作用について検討した。免疫沈降法によってcGKIαとTRPC7は相互作用することが明らかとなった。また、TRPC7はcGKIβとも相互作用したが、PKA-RIIとは相互作用しなかった。これらの結果より、TRPC7はcGKIと特異的に相互作用することが明らかとなり、この相互作用を介してcGKIはNOやナトリウム利尿ペプチドといった刺激に対して迅速かつ正確にTRPC7をリン酸化し、細胞内Ca²⁺濃度を制御していることが推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計1件)

① Keizo Yuasa, Taito Matsuda, Akihiko Tsuji: Functional regulation of transient receptor potential canonical 7 by cGMP-dependent protein kinase Iα. *Cell. Signal.* 23, 1179-1187 (2011) 査読有

〔学会発表〕 (計7件)

① 湯浅恵造, 松田泰斗, 辻明彦: cGMP依存性プロテインキナーゼによる非選択的カチオンチャンネルTRPC7の活性制御機構の解析, 日本農芸化学会2011年度大会講演要旨集, 2011年3月5日発行(京都市)

② 湯浅恵造, 長目健, 土肥真, 柳田弥生, 長浜正巳, 辻明彦: cGMP-dependent protein kinase/rhotekinによる神経突起形成の制御, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 2010年12月10日(神戸市)

③ 松田泰斗, 湯浅恵造, 辻明彦: cGMP依存性プロテインキナーゼによる非選択的カチオンチャンネルTRPC7の活性制御機構の解析, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 2010年12月10日(神戸市)

④ 湯浅恵造, 長目健, 柳田弥生, 長浜正巳, 辻明彦: 神経突起形成におけるcGMP依存性プロテインキナーゼの機能解析, 日本農芸化学会2010年度大会, 2010年3月29日(東京)

⑤ 松田泰斗, 湯浅恵造, 北清水百合花, 辻明彦: cGKIαによるTRPC7の調節機構, 日本農芸化学会2010年度大会, 2010年3月29日(東京)

⑥ 松田泰斗, 湯浅恵造, 辻明彦: cGMP依存性プロテインキナーゼ(cGKI)の新規基質の同定およびその機能解析, 第82回日本生化学会大会, 2009年10月24日(神戸市)

⑦ 湯浅恵造, 長目健, 山上真, 長浜正巳, 辻明彦: cGMP依存性プロテインキナーゼとRhoエフェクターrhotekinとの相互作用の解析, 第82回日本生化学会大会, 2009年10月24日(神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯浅 恵造 (YUASA KEIZO)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号: 70363132

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号：