

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500444

研究課題名(和文) PlexinA4輸送複合体を介した樹状突起成熟機構の解明

研究課題名(英文) The role of the trafficking of PlexinA4-containing vesicles in dendritic development

研究代表者

山下 直也 (Yamashita, Naoya)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：40508793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

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。本研究では、海馬神経細胞において、軸索先端で受容されたSema3A (Semaphorin3A)シグナルが、PlexinA4受容体を介し、グルタミン酸受容体の樹状突起内輸送を亢進することを発見した。さらに、Sema3Aを介したグルタミン酸受容体の樹上突起内輸送の亢進が、樹状突起の正常な発達に重要なことが分かり、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 that the signal elicited by semaphorin3A (Sema3A), a repulsive axon guidance molecule, enhances dendritic transport of glutamate receptors in hippocampal neurons through PlexinA4, one of the receptor component of Sema3A. I further found that this novel Sema3A action that enhances glutamate receptor trafficking is also required for dendritic morphology and maturation. My findings therefore play an essential role in proper neuronal development.

研究分野：神経生物学

キーワード：セマフォリン プレキシン グルタミン酸受容体 樹状突起成熟

1. 研究開始当初の背景

軸索ガイダンス分子 Semaphorin3A (Sema3A)は、神経軸索の先端に形成される成長円錐を退縮させる、反発性軸索ガイダンス分子として同定された。一方申請者らは、Sema3A には、従来知られていた反発性分子としての作用のみならず、樹状突起において、分枝形成の促進、シナプス成熟の促進といった、樹状突起成熟を促進させる作用があることを明らかにしてきた。しかしながら、Sema3A が樹状突起成熟を促進する分子機構については不明な点が多い。本研究課題の開始に先立って、申請者は、Sema3A が樹状突起に作用するときの作用点が軸索先端の成長円錐にあることを見出した。従って、軸索先端において惹起された Sema3A シグナルが、どのように樹状突起まで伝播し、樹状突起の成熟を促進させるかについての分子機構を明らかにすることが望まれた。

2. 研究の目的

本研究に先立って、Sema3A が AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット・GluA2 の樹状突起内輸送を促進することを突き止めた。また、GluA2 の輸送亢進は、Sema3A を軸索先端に投与したときのみ認められ、細胞体・樹状突起領域に作用させた場合には認められなかったことから、Sema3A は軸索先端に作用し、惹起されたシグナルは樹上突起方向へ逆行性に伝播し、その後 GluA2 の樹状突起内輸送を更新することが示唆された。さらに申請者は、GluA2 が、Sema3A の受容体の一つである PlexinA4 (PlexA4)と相互作用することを見出した。そこで本研究は、Sema3A により活性化された PlexA4 以上の結果から、軸索先端で受容された Sema3A シグナルは、PlexA4 と GluA2 の樹状突起ない輸送亢進の関連、ならびに樹状突起に局在化された GluA2 と、Sema3A による樹状突起成熟促進作用の関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Sema3A シグナルが軸索先端から樹状突起方向へ逆行性に伝播する分子機構の解明

本研究に先立って、申請者は、Sema3A による GluA2 の樹上突起内輸送の亢進は、逆行性の軸索内輸送を阻害すると抑制されることを見出していた。前述のとおり、GluA2 の輸送亢進において PlexA4 が鍵分子になることが予想されたことから、Sema3A が軸索先端に作用すると、Sema3A ならびにその下流のシグナル分子群の逆行性軸索内輸送が惹起されるのではないかと考え、以下の実験を行った。

Sema3A の軸索内輸送の可視化
光褪色後蛍光回復法を用いた PlexA4 の
タイムラプスイメージング

免疫細胞染色による Sema3A 刺激による
PlexA4 の局在変化

(2) Sema3A シグナルが PlexA4 を介して
GluA2 の樹状突起内輸送を亢進する分子機構
の解明

前述のとおり、PlexA4 と GluA2 が相互作用
することを見出していたことから、神経細胞
内における PlexA4 と GluA2 が相互作用する
細胞区画の同定ならびにこの相互作用の生
理的意義を目的として以下の実験を行った。

in situ PLA 法を用いた PlexA4-GluA2
の相互作用解析
GluA2 と相互作用する PlexA4 の相互作
用部位の同定
同定した部位のみを有する欠失変異体
の *in vitro* ならびに *in vivo* レベルで
の強制発現実験

(3) Sema3A による樹状突起成熟促進作用と
GluA2 の樹状突起内輸送亢進との間の分子的
連関の解明

GluA2 の樹状突起への局在が促進されるこ
とと Sema3A による樹状突起成熟促進作用と
の分子的連関を明らかにするため以下の実
験を行った。

GluA2 の RNA ノックダウン実験
in vivo レベルでの樹状突起の形態観察

4. 研究成果

(1) Sema3A シグナルが軸索先端から樹状突
起方向へ逆行性に伝播する分子機構の解明

まず、培養海馬ニューロンを用い、蛍光タン
パク質 Venus を N 末に融合した
Sema3A (Venus-Sema3A) を、軸索先端へ局所投
与した。30 分後に細胞を固定し、投与した分
子の細胞内局在を検討した結果、
Venus-Sema3A のシグナルが、細胞体・樹状突
起領域まで到達することが分かった。従って、
Venus-Sema3A が、軸索先端から逆行性に輸送
されることが示唆された。

次に C 末に蛍光タンパク質 EGFP を融合し
た PlexA4-EGFP を培養海馬ニューロンに発現
させ、EGFP により可視化された PlexA4 の細
胞内輸送の様子を光褪色後蛍光回復法によ
り検討した。その結果、Sema3A 投与 1-5 分後
において、軸索における PlexA4-EGFP の輸送
が亢進された。一方この時間軸においては、
樹状突起のける PlexA4 の輸送は亢進されな
かった。次に、Sema3A 投与から 13-17 分後
における PlexA4 の細胞内輸送を観察した。そ
の結果、この時間軸では、樹状突起において
PlexA4-EGFP の輸送が亢進され、軸索では亢
進されなかった。このことから、PlexA4 は、
軸索 樹状突起という順番で輸送されるこ

とが示唆された。

さらに内因性の PlexA4 の細胞内における局在変化を検討した。その結果、Sema3A 未処理の培養海馬ニューロンでは、PlexA4 が軸索先端に強く局在することが分かった。一方、Sema3A 投与後は、まず軸索先端における PlexA4 の免疫染色シグナルが減少し、その分細胞体におけるシグナルが増加した。その後細胞体におけるシグナルが減少し、その分樹状突起におけるシグナルが増加した。以上の結果から、軸索先端に Sema3A を作用させると、Sema3A、PlexA4 を含むリガンド-受容体複合体は、まず逆行性軸索内輸送を介して細胞体まで輸送され、続いて細胞体から樹状突起へと順行性に輸送されることが分かった。本研究では、軸索先端から樹状突起まで輸送された Sema3A 受容体複合体が、樹状突起までシグナルを伝播させる本体であると考えさらなる実験を行った。

(2) Sema3A シグナルが PlexA4 を介して GluA2 の樹状突起内輸送を亢進する分子機構の解明

(1) の結果と PlexA4 と GluA2 が相互作用するという先行結果を、軸索先端から運ばれてきた PlexA4 が細胞体で GluA2 と相互作用し、続いてこれらの複合体が樹状突起まで輸送されるのではないかと考えた。この仮説を明らかにするため、まず *in situ* PLA 法という、二つの分子が相互作用したときのみシグナルを検出できる手法を用いて PlexA4 と GluA2 の培養海馬ニューロンにおける相互作用部位を検討した。その結果、PlexA4 と GluA2 の相互作用シグナルは、Sema3A 添加後、まず細胞体で検出され、遅れて樹状突起でも検出されるようになったことから、細胞体で相互作用後、相互作用を維持したまま樹状突起へ輸送されることが示唆された。

次に、GluA2 と相互作用する PlexA4 の相互作用部位の同定を試みたところ、IPT (immunoglobulin-like plexin transcription factor) ドメインを介して相互作用することが分かった。そこでこの部位を海馬培養ニューロンに強制発現させた結果、Sema3A による GluA2 と PlexA4 の相互作用は抑制された。さらに、IPT ドメインの強制発現は Sema3A による GluA2 の輸送も抑制したことから、PlexA4 が細胞体で GluA2 と相互作用し、続いて樹状突起へ輸送されるという、上記仮説を証明することに成功した。

以上の結果は、培養海馬ニューロンを用いた *in vitro* における検討であったため、*in vivo* レベルでの検討を試みた。子宮内電気穿孔法により IPT ドメインの強制発現を行ったところ、海馬 CA1 神経細胞における GluA2 の樹状突起への局在化が著しく抑制された。従って、*in vivo* レベルにおいても Sema3A を介した GluA2 の樹状突起への局在化機構が存在することが明らかになった。

(3) Sema3A による樹状突起成熟促進作用と GluA2 の樹状突起内輸送亢進との間の分子的連関の解明

培養ニューロンに Sema3A を添加すると樹状突起の分枝形成が促進される。また、*sema3A* 遺伝子欠損マウスの海馬神経細胞では、尖端樹状突起の形態異常が報告されている。そこでこれらの表現型を指標に、PlexA4 を介した GluA2 の樹状突起への局在化と Sema3A による樹状突起の形態制御との関連を検討した。まず培養海馬ニューロンにおいて GluA2 の RNA ノックダウンを行ったところ、Sema3A の樹状突起に対する分枝形成促進作用が著しく抑制された。GluA2 には、グルタミン酸受容体としての機能の他に、カドヘリンなどの細胞接着因子との相互作用を介した樹状突起成熟促進作用があることが知られている。従って、Sema3A は GluA2 の樹状突起輸送を促進することによって、樹状突起の成熟を促進することが分かった。

次に *in vivo* レベルでの検討を行った。Sema3A シグナルを介した GluA2 の樹状突起への局在化を抑制できる、IPT ドメインの強制発現を子宮内電気穿孔法により行ったところ、*sema3A* 遺伝子欠損マウスと類似した尖端樹状突起の形成不全を起こすことが分かった。従って、Sema3A を介した GluA2 の局在化が、Sema3A による樹状突起の形態制御に必要であることが *in vivo* レベルでも明らかになった。

以上から、Sema3A は軸索先端に作用し、軸索ガイダンス分子として働くのみならず、Sema3A ならびに PlexA4 を含む Sema3A シグナル分子群を軸索先端から樹状突起まで輸送することにより、自身のシグナルを樹状突起まで伝播することが分かった。この輸送過程において、PlexA4 は細胞体において GluA2 を複合体内に取り込み、GluA2 の樹状突起への局在化を促進し、この局在化の促進は、Sema3A による樹状突起の形態制御に必要であることが *in vitro* ならびに *in vivo* レベルにおいて明らかになった。これらの知見から、これまで不明であった Sema3A による樹状突起形態制御の詳細な分子機構が明らかになった。

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 9 件)

Yamashita N, Jitsuki-Takahashi A, Ogawara M, Ohkubo W, Araki T, Hotta C, Tamura T, Hashimoto SI, Yabuki T, Tsuji T, Sasakura Y, Okumura H, Takaiwa A,

Koyama C, Murakami K, Goshima Y.: Anti-Semaphorin 3A neutralization monoclonal antibody prevents sepsis development in lipopolysaccharide-treated mice. *Int Immunol*. 2015 *in press*. doi: 10.1093/intimm/dxv014 査読あり

Hida T, Nakamura F, Usui H, Takeuchi K, Yamashita N, Goshima Y.: Semaphorin3A-induced axonal transport mediated through phosphorylation of Axin-1 by GSK3 β . *Brain Res*. Vol. 1598:46-56, 2014. doi:10.1016/j.brainres.2014.12.028 査読あり

Yamashita N, Usui H, Nakamura F, Chen S, Sasaki Y, Hida T, Suto F, Taniguchi M, Takei K, Goshima Y.: Plexin-A4-dependent retrograde semaphorin 3A signalling regulates the dendritic localization of GluA2-containing AMPA receptors. *Nat Commun*. 2014. doi: 10.1038/ncomms4424 査読あり

Yamashita N, Takahashi A, Takao K, Yamamoto T, Kolattukudy P, Miyakawa T, Goshima Y: Mice lacking collapsin response mediator protein 1 manifest hyperactivity, impaired learning and memory, and impaired prepulse inhibition. *Front Behav Neurosci*. 2013. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00216 査読あり

Isono T*, Yamashita N*, Obara M, Araki T, Nakamura F, Kamiya Y, Alkam T, Nitta A, Nabeshima T, Mikoshiba K, Ohshima T, Goshima Y: Amyloid- β 25-35 induces impairment of cognitive function and long-term potentiation through phosphorylation of collapsin response mediator protein 2. *Neurosci Res*. Vol. 77(3):180-5, 2013. *Co-1st Authors doi:10.1016/j.neures.2013.08.005 査読

あり

Iwakura T, Sakoh M, Tsutiya A, Yamashita N, Ohtani A, Tsuda MC, Ogawa S, Tsukahara S, Nishihara M, Shiga T, Goshima Y, Kato T, Ohtani-Kaneko R: Collapsin response mediator protein 4 affects the number of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the sexually dimorphic nucleus in female mice. *Dev Neurobiol*. Vol. 73(7): 502-17, 2013. doi: 10.1002/dneu.22076 査読あり

Niisato E, Nagai J, Yamashita N, Nakamura F, Goshima Y, Ohshima T: Phosphorylation of CRMP2 is involved in proper bifurcation of the apical dendrite of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Dev Neurobiol*. Vol., 73(2): 142-51, 2013. doi: 10.1002/dneu.22048 査読あり

Hida T, Yamashita N, Usui H, Nakamura F, Sasaki Y, Kikuchi A, Goshima Y: GSK3 β /Axin-1/ β -catenin complex is involved in Semaphorin3A signaling. *J Neurosci*. Vol. 32(35): 11905-18, 2012. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6139-11.2012 査読あり

Goshima Y, Sasaki Y, Yamashita N, Nakamura F: Class 3 semaphorins as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*. Vol. 16(9): 933-44, 2012. doi:10.1517/14728222.2012.710201 査読あり

[学会発表](計 4 件)

山下 直也, 五嶋良郎: A retrograde axonal transport elicited by Semaphorin3A regulates dendritic arborization through localization of AMPA receptor subunit GluA2 in dendrites. **第 36 回日本神経科学大会** 国立京都国際会館(京都府京都市左京区、

2013年6月20-23日)

山下 直也, 五嶋良郎: A retrograde axonal transport elicited by Semaphorin3A drives AMPA receptor subunit GluA2 to dendrites. **第90会日本生理学会大会** タワーホール船堀 (東京都江戸川区、2013年3月27-29日)

Yamashita N, Goshima Y: A Retrograde axonal transport elicited by Semaphorin3A Drives AMPA Receptor Subunit GluA2 to Dendrites. **Keystone symposia "Cell Biology and Pathology of Axons"** Tahoe City, California, USA (2013年3月10-15日)

Yamashita N, Chen S, Goshima Y: Semaphorin3A drives AMPA Receptor Subunit GluA2 to dendrites by a retrograde signaling vis axonal transport. **Cold Spring Harbor laboratory meeting "Axon Guidance, Synapse Formation and regeneration"** New York, USA (2012年9月18-22日)

[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・医学研究科・客員講師

研究者番号: 40508793