

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830045

研究課題名(和文) 神経細胞の極性形成を制御する新規シグナル伝達経路の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms underlying neuronal polarization

## 研究代表者

高野 哲也 (Tetsuya, Takano)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00725541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞は高度に極性化した細胞であり、1本の軸索と複数の樹状突起を形成する。しかしながら、神経細胞がいかにして極性を獲得し維持するか、その分子機序は未だ限定的なものであった。我々は、神経栄養因子NT-3の局所活性に反応して、軸索から長距離Ca<sup>2+</sup>伝播が引き起こされ、CaMKIが活性化することを見出した。さらに、リン酸化プロテオミクスによりCaMKIの新規基質としてRhoAの活性化因子RhoGEFを同定した。以上の結果より、長距離Ca<sup>2+</sup>伝播を介してCaMKI/Rho GEF/RhoA/Rho-kinase経路が複数の軸索形成を抑制することで樹状突起への運命決定を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neurons are highly polarized cells, which have two structurally and functionally distinct compartments, i.e., axons and dendrites. Neuronal polarization is precisely established by local activation signal and long-range inhibitory signaling (Takano et al., 2015, Development). However, the long-range inhibitory signaling that prevents multiple axonal formation remains largely unknown.

In this year, we found that local application of NT-3 to axon induced a long-range Ca<sup>2+</sup> propagation that led to activate RhoA in the cell body through CaMKI. The local inhibition of Rho-kinase in the minor neurites induced neurite elongation and subsequently formed multiple axons. We performed phospho-proteomic analysis (the KISS method) to identify novel substrates for CaMKI. We found that CaMKI phosphorylated a RhoGEF, and enhanced its GEF activity. Together, long-range signaling of Ca<sup>2+</sup>/CaMKI/RhoGEF/RhoA/Rho-kinase might be a novel inhibitory pathway responsible for neuronal polarization.

研究分野：神経化学

キーワード：Neuronal polarity RhoA Rho-kinase CaMKI

### 1. 研究開始当初の背景

神経細胞は外界からの情報に応答して極性を獲得し、軸索と樹状突起が正確な位置に配置されることにより精巧な神経回路網を構築する。しかしながら、神経細胞がいかにして極性を獲得し維持するか、その分子機序の理解は未だ限定的なものであった。これまでの知見より、軸索も樹状突起も共通の未成熟な神経突起から形成されることが明らかになっている。しかしながら、どのようにして未成熟な神経突起のうち一本のみが軸索となり、他の未成熟な突起の軸索への分化が抑制されるのか未だに判っていない。そこで本研究では、一本のみの軸索が形成される分子機序を解明することを目的とする。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、一本のみの軸索形成を制御する分子機序を細胞外環境から細胞内への一連のシグナル伝達経路まで包括的に解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

マイクロピペットを用いて単一の神経突起のみに刺激する局所刺激法やリン酸化プロテオミクス解析を行うことで、神経細胞の極性形成を制御する細胞外から細胞内への一連のシグナルネットワークの解明を図った。

(1) 神経栄養因子による軸索からのネガティブシグナルの増強: 伸長中の軸索では、NT-3 や BDNF などの神経栄養因子が自己増幅することで細胞内シグナルを介して他の未成熟な突起の軸索への分化を抑制していると考えられる。そこで、長距離ネガティブシグナルの有無を検証するために、単一の突起のみに刺激する局所刺激法を用いて軸索のみに神経栄養因子 NT-3 や BDNF を刺激した際

の、未成熟な突起の伸長を観察した。

(2) 軸索から未成熟な突起へと伝わる誘導因子の同定: 近年、我々は NT-3 によって  $Ca^{2+}$  の流入が誘導されることを明らかにしていた(中牟田ら., *Sci Signal*, 2011)。そこで、軸索から未成熟な突起への誘導因子として  $Ca^{2+}$  伝搬が関与しているか検証するために、NT-3 を用いた軸索での局所刺激の系と  $Ca^{2+}$  イメージングを併せた解析を行った。

(3) 神経細胞での CaMKI の基質の網羅的同定: 近年、我々は新たなリン酸化プロテオミクス技術を開発した(天野ら., *JCB*, 2015)。このプロテオミクス技術を用いて、長距離  $Ca^{2+}$  伝搬の下流で活性化する CaMKI の基質を網羅的に同定した。

(4) 未成熟な突起で複数の軸索形成を抑制する分子の同定: 各種阻害剤を用いた局所刺激法によって、未成熟な突起にて複数の軸索形成を抑制する分子を同定した。

### 4. 研究成果

(1) これまでに我々は、神経栄養因子である NT-3 や BDNF が伸長中の軸索で自己増幅していること、またその受容体 Trks が軸索末端に濃縮することを明らかにしていた(有村ら., *Dev Cell*, 2009; 中牟田ら., *Sci Signal*, 2011)。これらの結果から、神経栄養因子の局所活性によって生じる軸索からの何らかの細胞内シグナルが他の未成熟な突起の伸長を抑制することで軸索への分化を阻害することが考えられた。そこで、この仮説を検証するために、単一の突起のみに刺激する局所刺激法を用いて神経栄養因子である NT-3 や BDNF を軸索のみに刺激した。その結果、NT-3 や BDNF の刺激によって軸索伸長が優位に増加した。さらに、予想していたように軸索での NT-3、BDNF の局所刺激に応答して、他の未成熟な突起が急速に退縮する様子を

観察した。

(2) これまでに我々は、NT-3 によって  $Ca^{2+}$  流入が起こり、さらにその下流で CaMKK/CaMKI 経路が活性化することで軸索の運命決定が誘導されることを明らかにした(中牟田ら., *Sci Signal*, 2011)。この結果から、形成中の軸索から未成熟な突起へと伝わる誘導因子として  $Ca^{2+}$  が関与している可能性が考えられた。そこで、局所刺激法で軸索のみに NT-3 を刺激した際の、 $Ca^{2+}$  の時空間的動態を検討した。その結果、軸索への NT-3 の局所刺激によって、軸索から細胞体にかけて長距離の  $Ca^{2+}$  伝搬が観察された。さらに、この軸索からの長距離  $Ca^{2+}$  伝搬によって、細胞体で CaMKK/CaMKI 経路が活性化していることを免疫染色法により明らかとなった。

(3) 先行研究により、CaMKI が神経細胞の極性形成に関与していることは報告されているが、CaMKI がどのような基質を介して極性形成を制御しているのかについては未だに判っていなかった。そこで、神経細胞での CaMKI の基質を網羅的に同定することで、CaMKI による神経細胞の極性形成における分子機序の解明を試みた。近年、我々は新たなリン酸化プロテオミクス技術 (Kinase-interacting substrate screening (KISS)法)を開発した(天野ら., *JCB*, 2015)。我々は、この KISS 法を用いて CaMKI の基質を網羅的に同定した。その結果、498 つのリン酸化タンパク質と 1142 箇所のリン酸化サイトが同定された。その中には、細胞骨格系のタンパク質、リン酸化酵素、膜タンパク質、転写因子や低分子量 G タンパク質の活性化因子 Rho GEF が数多く含まれていた。

(4) 低分子量 G タンパク質 Rho family (Rac1, Cdc42, RhoA) は細胞の極性形成において極めて重要な役割を担っていることが知られている。その中でも、RhoA はエフェクター分子 Rho-kinase を介して突起伸長を抑制していることが明らかとなっている(Conde et al.,

*J Neurosci*, 2010; Da Silva et al., *JCB*, 2003; Gonzalez-Billault et al., *Cytoskeleton*, 2012)。近年、我々は RhoA/Rho-kinase 経路が生体内において軸索形成を抑制することで樹状突起形成を制御していることを明らかにしていた (Xu et al., *J Neurosci*, 2015)。これらの結果から、RhoA/Rho-kinase 経路が未成熟な突起において、その突起伸長を抑制することで複数の軸索形成を抑制している可能性が考えられた。そこで、この仮説を検証するために、局所刺激法を用いて Rho-kinase の阻害剤 (Y27632) を未成熟な突起のみに刺激を行った。その結果、Rho-kinase の阻害剤によって未成熟な突起が急速に伸長することが判った。また、RhoA の阻害剤や、Rho-kinase の下流で働くミオシン II の阻害剤でも同様の効果が認められた。さらに、軸索形成後の神経細胞にこれらの阻害剤を処理すると、複数の軸索が形成されることが免疫染色法により明らかとなった。これらの結果から RhoA/Rho-kinase 経路が未成熟な突起において複数の軸索形成を抑制していることが示唆された (図 1)。

以上の結果より、軸索での細胞外因子 NT-3 の増幅によって、長距離の  $Ca^{2+}$  伝搬を介して CaMKI/Rho GEF/RhoA/Rho-kinase 経路が複数の軸索形成を抑制することで樹状突起への運命決定を担っていることが示唆された (図 1)。

## 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)

(1) Takano T, Xu C, Funahashi Y, Namba T, Kaibuchi K. Neuronal polarization, *Development at Glance*, 2015, 142: 2088-2093 (査読あり)

〔学会発表〕(計 8 件)

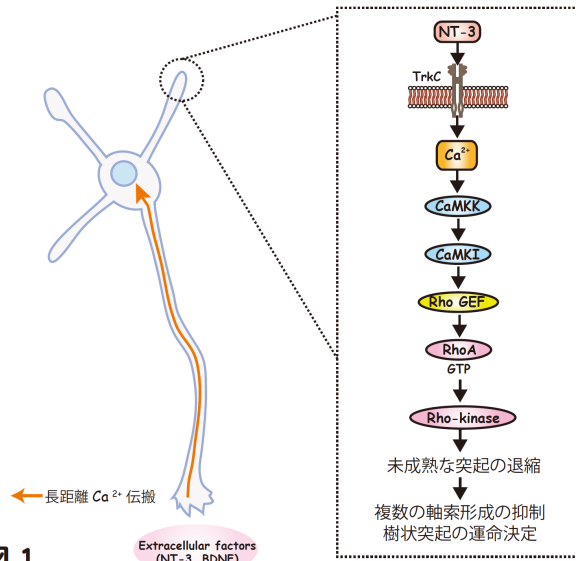


図 1

- (1) Tetsuya Takano, Shinichi Nakamuta, Chundi Xu, Takashi Namba, Mutsuki Amano and Kozo Kaibuchi., Long-range Ca<sup>2+</sup> signaling regulates neuronal polarization via Rho-kinase in a CaMKI-dependent manner. 第 57 回日本神経化学学会大会 (2014.9.29) 奈良県文化会館、奈良県新公会堂 (奈良県奈良市)
- (2) Tetsuya Takano, Shinichi Nakamuta, Chundi Xu, Takashi Namba, Mutsuki Amano and Kozo Kaibuchi., Long-range Ca<sup>2+</sup> signaling regulates neuronal polarization via Rho-kinase in a CaMKI-dependent manner. Emerging concepts of the neuronal cytoskeleton (2015.3.22) Puerto Varas, Chile
- (3) Tetsuya Takano, Shinichi Nakamuta, Mengya Wu, Naruki Ishizawa, Chundi Xu, Takashi Namba, Mutsuki Amano and Kozo Kaibuchi., Long-range Ca<sup>2+</sup> signaling regulates neuronal polarization via Rho-kinase in a CaMKI-dependent manner. Developmental Neurobiology Course 2015 (2015.7.12) 沖縄科学技術大学院大学 OIST (沖縄恩納村)
- (4) 高野 哲也, 中牟田 信一, 石澤 成樹, Chundi Xu, 難波 隆志, 天野 睦紀, 貝淵 弘三., Long-range Ca<sup>2+</sup> signaling regulates neuronal polarization via Rho-kinase in a CaMKI-dependent

manner. 第 38 回日本神経科学会 (2015.7.29) 神戸国際会議場、コンベンションセンター (兵庫県神戸市)

- (5) Takano Tetsuya, Nakamuta Shinichi, Wu Mengya, Ishizawa Naruki, Xu Chundi, Namba Takashi, Amano Mutsuki, Kaibuchi Kozo., Activation of RhoA/Rho-kinase by CaMKI-mediated phosphorylation of GEF-H1 regulates neuronal polarization. 第 58 回日本神経化学大会 (2015.9.11) 大宮ソニックシティー (埼玉県大宮市)
- (6) Ishizawa, Takano, Wu, Nakamuta, Xu, Namba, Amano, Kaibuchi., Long range Ca<sup>2+</sup> signaling regulates neuronal polarization via Rho kinase in a CaMKI dependent manner. ASCB 2015 (2015.12.12) San Diego, USA
- (7) 貝淵 弘三、Xu Chundi1、高野 哲也., Extracellular and intracellular signaling for neuronal polarity. 第 3 回国際シンポジウム Neocortical organization (2016.2.11) 東京大学小柴ホール (東京都文京区)
- (8) Tetsuya Takano, Mengya Wu, Naruki Ishizawa, Shinichi Nakamuta, Naoki Honda, Takashi Namba, Takashi Watanabe, Chundi Xu, Tomonari Hamaguchi, Yoshimitsu Yura, Mutsuki Amano, Shin Ishii, Klaus M. Hahn and Kozo Kaibuchi., Long range Ca<sup>2+</sup> signaling regulates neuronal polarization via Rho kinase in a CaMKI dependent manner. 第 3 回国際シンポジウム Neocortical organization (2016.2.11) 東京大学小柴ホール (東京都文京区)

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/Yakuri/index.htm>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高野 哲也 (TAKANO, TETSUYA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特別研究員 (PD)

研究者番号 : 00725541

(2)研究分担者

研究分担者なし