

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06782

研究課題名(和文) 成長円錐伸展時の膜輸送を制御する3つのG蛋白質の時空間活性制御ネットワークの解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular network regulating spatiotemporal activities of three G proteins that control membrane traffic during outgrowth of growth cones

研究代表者

中村 岳史 (NAKAMURA, Takeshi)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：60362604

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)：神経細胞株ではcAMP-PKA-STEF-Rac1-p190Bという経路でTC10とRhoAの不活性化が誘導され、膜付加と神経骨格の再編成を介して神経突起伸展を起こす。TC10のKOマウスでは発生期の神経突起成長は野生型とKOの間に顕著な差はないが、成体KOの軸索再生能は野生型に比べ有意に低下した。Rab11センサーのデザイン構造をより広く探索し、約40%のダイナミックレンジを持つセンサーを作って神経突起を移動する小胞のRab11活性を検討した。ダイナミックレンジ50%程度のRab35センサーを作製してNGFによるPC12応答の系などで検討を行い、センサーがほぼ所定の機能を持つことを確認した。

研究成果の概要(英文)：In neuronal cells, down-regulation of TC10 and RhoA activities is executed by cAMP-PKA-STEF-Rac1-p190B pathway and leads to neurite outgrowth through membrane addition and cytoskeletal reorganization. In TC10 KO mice, neurite outgrowth during development was not largely different between wild type and KO mice,; however, axon regeneration capability of adult KO mice was significantly lower than that of wild type ones. My group searched the design structure of Rab11 sensor more widely and developed the sensor with dynamic range of about 40%. We investigated Rab11 activity on vesicles that move in neurites. We fabricated the Rab35 sensor having dynamic range of about 50%, examined it in the PC12 response to NGF etc, and confirmed that the sensor has nearly the prescribed function.

研究分野：分子・細胞神経科学

キーワード：FRET Rab GTPase Rho GTPase neurite outgrowth regeneration sensor membrane traffic

### 1. 研究開始当初の背景

神経細胞が特定の相手と機能的な結合をして精妙な神経回路を作り上げる過程で、局所的なガイダンスキューに应答する成長円錐の伸展制御が中心的な役割を果たしている。この伸展制御の実体は、細胞骨格の再編成と小胞輸送による膜の付加・取込みである。前者を制御する Rho ファミリー G 蛋白質とイノシトールリン脂質の分子機構はかなりの深さまで理解が進み、個体での生理機能との結びつきについても明らかにされつつある。研究代表者は幾つかの神経突起伸展の系で FRET センサーによる Rho ファミリー G 蛋白質の活性可視化を使った分子機構の解析を行い、突起先端部での Rac1 と Cdc42 の局所活性化が神経突起伸展の基本要素であること、及びその局所活性化がそれぞれの系に特異的な形で実現されていることを示してきた。一方で、成長円錐伸展過程での小胞輸送による膜制御についても、他の分野での細胞生物学的アプローチの進展に後押しされる形でその重要性が広く認識されつつある。そうした膜制御マシナリーの中心として働くリサイクリング経路による細胞膜への膜付加についても、Rab11 や Rab35 といったキーとなる G 蛋白質の関与が具体的に示されており、G 蛋白質と活性依存的に結合する多様なエフェクターの同定が進んでいる。しかしながら、適切な解析ツールがないために、運動している成長円錐でそれらの G 蛋白質がいつどこで活性化されているか、局所で活性化された G 蛋白質がどのエフェクターと相互作用しているのかといった点がほとんど明らかになっておらず、そのため、正確な分子機能の理解に届いていない。また、シグナル経路のどこかで細胞骨格と膜との協調的制御が行われていると予想されているが、その実体はほとんどわかっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、成長円錐の伸展制御におけるブラックボックスとなっている膜の輸送・付加の制御機構に焦点を当て、そのキー分子の活性動態を可視化し、「成長円錐における膜制御のコアマシナリー」の実体を明らかにすることを目指す。神経突起の伸展過程、及びガイダンス制御を受けて運動している成長円錐について、Rab11 と Rab35 の活性変化を可視化し、その変化と連動するエフェクターの同定、新規修飾部位の機能解析などの結果を集約して、成長円錐伸展における分子機能を明らかにする。TC10 ノックアウトマウスを用いて軸索走行、軸索ガイダンスおよび軸索再生能の異常を解析し、発達個体と成体の脳神経系における生理的役割を解明する。

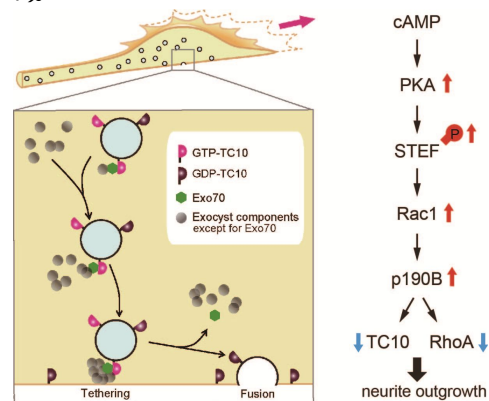
### 3. 研究の方法

神経突起伸展や軸索ガイダンスでの膜付加で主要な役割を果たす TC10、Rab11、Rab35 の活性変化を FRET センサーにより可視化し、その変化と連動するエフェクターの同定、新規修飾部位の機能解析などの結果を集約することで新たな知見を得ることを目指す。

### 4. 研究成果

cAMP 投与による神経突起伸展時の TC10 の活性変化とその制御機構の解析

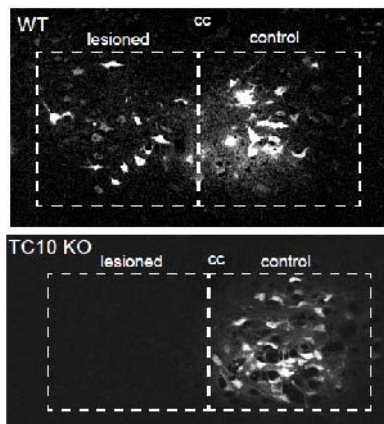
TC10 は小胞の細胞膜への輸送に関与することが知られている。また活性型 TC10 は、小胞の繫留に働くエクソシスト複合体のコンポーネントである Exo70 に結合する。最近、研究代表者を含めた複数のグループが TC10 と Exo70 が神経突起伸展に関わることを報告している。その働きは膜の付加を介することが想定される。研究代表者は、主に神経成長因子による突起伸展の系を使って、「小胞上の TC10 活性低下による繫留複合体の崩壊がその小胞の膜融合を開始する」というモデルを提案している。本研究により、cAMP 処理で PC12 の神経突起伸展が誘導される系では、cAMP-PKA-STEFG-Rac1-p190B というシグナル経路により TC10 と RhoA の不活性化が誘導され、それらが膜付加と神経骨格の再編成の 2 つの実行装置を介して神経突起伸展を起こしていることを明らかにした(下図)。



Hypothetical roles of TC10 in neurite outgrowth and signaling cascade from cAMP to TC10 inactivation

#### 個体レベルでの TC10 の機能の解析

損傷軸索の再生や軸索ガイダンスに関する TC10 の働きを個体レベルで解析するために、ノックアウトマウスを作出した。発生期に起きる神経突起成長には野生型と TC10 KO の間に顕著な差がないのとは対照的に、成体での軸索再生能は野生型に比べて TC10 KO では顕著に低下した。末梢神経損傷モデルである舌下神経で検討したところ、TC10 KO での再生は野生型のそれに比べて明確に低下した(下図)。



逆行トレーサーでの再生能の検討

哺乳類成体の中枢神経軸索は本来再生しないが、様々な操作を人工的に組み合わせることにより、ある程度まで再生し投射するようにできる。軽度の視神経再生を誘導する系で検討したところ、末梢神経での差ほど顕著ではないが、中枢神経に属する視神経でも、損傷からの再生能には野生型と TC10 KO の間に有意な違いが認められた。以上より TC10 は成体マウスの神経再生で重要な役割を果たしている」と結論できた。

Rab11 の FRET センサーの開発とその応用

これまで発表してきた Rab5 と Rab7 のセンサーのデザインに、さらに cp FRET 法を応用して、より広く最適構造を探索した。200 個程度の候補センサーを作り、40%程度のダイナミックレンジ(感度に相当する)を持つ Raichu-A760 を開発した。このセンサーを神経細胞株 N1E-115 に発現させて、神経細胞株の突起上を移動する小胞での Rab11 活性を検討した。予備的結果は得られているが、S/N が十分ではないため、n 数を増やす必要があり慎重に検討している。また、この FRET イメージングで得られる結果を検証するために、優勢劣性型 Rab11 を使用せずに Rab11 とリサイクリング小胞の輸送との関係を探ることができる局所操作の系を 2 つ構築した。Rab11 の GAP を使用する方法と SuperNova を使用する方法である。

3次元環境で伸展する神経突起成長円錐の形態変化の検討

2次元環境での成長円錐は末端に糸状仮足や葉状仮足が形成された複雑な構造をとり高い運動性を示すが、3次元環境での成長円錐はより単純な形態をとると考えられている。ただし、生体環境では質の高いデータを得るのが困難である。そこで、生体環境を模倣したゲルを用いて、3次元環境で神経細胞株の成長円錐の動的形態を観察し、2次元環境での動的形態と比較した細胞膜に緑色蛍光タンパク質を局在化させて PC12 細胞の形態を可視化し、共焦点画像データから 3次元画像を構築した。同様の実験を DRG の器官培養でも行った。3次元と2次元の環境下

での成長円錐の動的形態のさらに詳細なデータを取得、形態定量的な比較を行った。

Rab35 センサーの開発

ダイナミックレンジが 50%程度の Rab35 センサーを作製して、NGF による PC12 の応答などの系で検討を行った。Rab35 は細胞膜と小胞にあるので、共焦点顕微鏡を用いた FRET タイムラプス観察が必要だが、その方法を使うことで、この Rab35 センサーがほぼ所定の機能を持つことが確認できた。

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 3 件)

Sayaka Yasuda, So Morishita, Akane Fujita, Tomohisa Nanao, Naoyuki Wada, Satoshi Waguri, Giampietro Schiavo, Mitsunori Fukuda, and Takeshi Nakamura. 2016. Mon1-Ccz1 activates Rab7 only on late endosome and dissociates from lysosome in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 129, 329-340.

Shingo Koinuma, Kohei Takeuchi, Naoyuki Wada, and Takeshi Nakamura. 2017. cAMP-induced activation of protein kinase A and p190B RhoGAP mediates down-regulation of plasmalemmal TC10 GTPase activity and neurite outgrowth. *Genes Cells.* 22, 953-967.

Akane Kanemitsu-Fujita, So Morishita, Svend Kjaer, Mitsunori Fukuda, Giampietro Schiavo, and Takeshi Nakamura. 2018. Comparable affinity of RabGDI $\alpha$  for GTP- and GDP-bound forms of Rab7 supports a four-state transition model for Rab7 subcellular localization. *bioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/287516>.

[学会発表](計 18 件)

鯉沼真吾、野村理子、小島拓哉、根岸亮太、竹内公平、瀬木(西田)恵里、後飯塚僚、古市貞一、岩倉洋一郎、和田直之、高橋直樹、郡山恵樹、木山博資、中村岳史：膜輸送を介して突起伸展を促進する Rho ファミリー G タンパク質 TC10 は末梢神経の軸索再生に働く、第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会、神戸、2017.12.6-12.9 (poster)

森下宗、和田直之、福田光則、中村岳史：活性イメージングによるマクロピノサイトーシスでの Rab5 の活性制御の解析、第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会、神戸、2017.12.6-12.9 (poster)

竹内公平、杉澤元徳、田中響、須田亮、中村岳史：Optimization of biosensor and condition for FRET timelapse imaging under two-photon excitation systems. 日本バイオイメージング学会第 25 回学術集会、

東京、2017.9.16-9.17 (poster)

Ryota Negishi, Shingo Koinuma, Naoyuki Wada, and Takeshi Nakamura: Growth cones in 3D culture have different structural dynamics from those in 2D culture. 第60回日本神経化学大会、仙台、2017.9.7-9.9 (poster)

Kohei Takeuchi, Motonori Sugizawa, Kyo Tanaka, Akira Suda, and Takeshi Nakamura: Optimization of biosensor and condition for FRET timelapse imaging under two-photon excitation systems. International Symposium for Imaging Frontier 2017、東京、2017.7.8-7.9 (poster)

So Morishita, Naoyuki Wada, Mitsunori Fukuda, and Takeshi Nakamura: Mechanism of Rab5 activation/inactivation on EGF-induced macropinosome. International Symposium for Imaging Frontier 2017、東京、2017.7.8-7.9 (poster)

Shingo Koinuma, Kohei Takeuchi, Naoyuki Wada, and Takeshi Nakamura: Visualization of a pathway from cAMP to TC10 inactivation during neurite outgrowth. International Symposium for Imaging Frontier 2017、東京、2017.7.8-7.9 (poster)

Ryota Negishi, Shingo Koinuma, Naoyuki Wada, and Takeshi Nakamura: Growth cones in 3D culture have different structural dynamics from those in 2D culture. International Symposium for Imaging Frontier 2017、東京、2017.7.8-7.9 (poster)

Takeshi Nakamura, So Morishita, Sayaka Yasuda, Naoyuki Wada, and Mitsunori Fukuda: Visually dissecting Rab switch in macropinocytosis. International Symposium for Imaging Frontier 2017、東京、2017.7.8-7.9 (招待講演)

森下宗、和田直之、中村岳史: マクロピノソームでの Rab5 活性化 - 不活性化を制御するメカニズムの解析 第39回日本分子生物学会年会、神戸、2016.11.30-12.2 (ポスター)

Shingo Koinuma, Tomohisa Nanao, Naoyuki Wada, Takeshi Nakamura: cAMP-induced activation of PKA and p190B mediates down-regulation of plasmalemmal TC10 activity and neurite outgrowth. Society for Neuroscience 2016, San Diego, USA, 2016.11.12-11.16 (poster)

照井翔、石田彪馬、鯉沼真吾、和田直之、福田光則、中村岳史: FRET センサーを用いた Rab11 のリサイクリング経路制御機構の検討 第24回日本バイオイメーキング学会学術集会、名古屋、2016.9.26-9.28 (ポスター)

Shingo Koinuma, Tomohisa Nanao, Naoyuki Wada, and Takeshi Nakamura: cAMP-induced activation of PKA and

p190B mediates down-regulation of plasmalemmal TC10 activity and neurite outgrowth 第39回日本神経科学大会、横浜、2016.7.20-7.22 (口演)

Shingo Koinuma, Tomohisa Nanao, Naoyuki Wada, and Takeshi Nakamura: cAMP-induced activation of PKA and p190B mediates down-regulation of plasmalemmal TC10 activity and neurite outgrowth, Keystone Symposium Axons: From cell biology to pathology, Santa Fe 2016. 1.24-1.27 (poster)

森下宗、安田さや香、藤田明音、七尾友久、和田直之、和栗聡、Giampietro Schiavo、福田光則、中村岳史: Mon1-Ccz1 複合体は後期エンドソームでのみ Rab7 を活性化するがリソソームへの転換時にはそこから解離する、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会。神戸、2015.12.1-12.4 (ポスター)

田中響、安田さや香、須田亮、中村岳史: Green-Red FRET センサー構築の試み: 第24回日本バイオイメーキング学会学術集会、東京、2015.9.27-9.28 (ポスター)

照井翔、鯉沼真吾、石田彪馬、和田直之、福田光則、中村岳史: FRET センサーによる Rab11 のリサイクリング経路制御機構の解析、第24回日本バイオイメーキング学会学術集会、東京、2015.9.27-9.28 (ポスター)

安田さや香、森下宗、藤田明音、七尾友久、和田直之、和栗聡、Giampietro Schiavo、福田光則、中村岳史: Mon1-Ccz1 activates Rab7 only on late endosome and dissociates from lysosome in mammalian cells、第24回日本バイオイメーキング学会学術集会、東京、2015.9.27-9.28 (ポスター)

〔図書〕(計1件)

中村岳史、七尾友久 エクソサイトーシス生体の科学「細胞シグナル操作法」66: 484-485. (2015)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
研究室のホームページ  
<http://kir628906.kir.jp/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者  
中村 岳史 (NAKAMURA Takeshi)  
東京理科大学・生命医科学研究所・教授  
研究者番号：60362604

(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  
( )