

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17082006

研究課題名（和文）神経ガイダンス制御分子 CRMP による細胞内・外位置情報制御と組織構築

研究課題名（英文）The role of CRMP family proteins in the establishment of neural tissue architectures

研究代表者

五嶋 良郎 (GOSHIMA YOSHIO)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：00153750

研究成果の概要（和文）：脳の発達過程において軸索や樹状突起のガイダンス制御は、であるセマフォリン 3A やネトリンなどの反発性ないし誘引性の神経ガイダンス分子によって制御されている。コラプシン応答媒介タンパク質(CRMP)は Sema3A の応答を媒介する細胞内タンパク質として同定された。我々は、Sema3A が軸索内輸送を亢進し、それが海馬神経における AMPA 型グルタミン酸受容体の局在制御に関わることを見出した。CRMP タンパク質の生体内における役割を明らかとするため、*crmp1* を初めとする *crmp* ファミリー遺伝子の欠損マウスを作製し、その表現型を解析した。例えば *crmp1* 欠損マウスにおいて、胚初期の大脳皮質細胞の移動が遅延する。CRMP1 はリーリンシグナルのアダプタータンパク質である Dab1 と共局在するリーラーマウス脳においては、CRMP1 と Dab1 は高発現する一方、CRMP1 のチロシンリン酸化の水準は低下する。Dab1 ヘテロバックグラウンドにおける *crmp1* 欠損マウスにおいては、リーラーマウス同様に、海馬における細胞の層構造に乱れが生ずる。CRMP1 はまた Sema3A による AMPA 型グルタミン酸受容体の局在制御とスパインの成熟に関わる。培養皮質神経細胞において、Sema3A 適用はシナプス前・後のマーカータンパク質であるシナプシン I と PSD-95 タンパク質のクラスター形成を促進するが、*crmp1* 欠損神経細胞においては、この作用が著しく減少する。一方、我々は、ネトリンの局在異常とガイダンス異常を示す線虫変異体を単離した。これらの知見は、グルタミン酸受容体やガイダンス分子の局在制御が、細胞移動や神経回路形成にわたる様々な神経発生のプロセスにおいて重要な役割を果たすことを示す。

研究成果の概要（英文）：In developing brain, axon and dendritic guidance are regulated by repulsive and attractive axon guidance molecules such as semaphorin3A (Sema3A) and netrin. Collapsin response mediator protein (CRMP) has originally been identified as an intracellular protein that mediates Sema3A. We found that Sema3A elicits axoplasmic transport that may be involved in regulating the localization of AMPA type glutamate receptors in hippocampal neurons. To elucidate in vivo role of CRMPs, we generated several *crmp1* and other *crmp* family gene-deficient mice and performed phenotypic analysis of these mice. For instance, in *crmp1*-deficient mice, the cell migration of cortical neurons at early embryonic stages is retarded. CRMP1 is colocalized with disabled-1 (Dab1), an adaptor protein in Reelin signaling. In the Reelin/rl cortex, CRMP1 and Dab1 are expressed at a higher level, yet tyrosine phosphorylated at a lower level. Loss of *crmp1* in a *dab1* heterozygous background lead to the disruption of hippocampal lamination, a Reeler-like phenotype. CRMP1 is also involved in Sema3A-induced localization of AMPA receptors and spine development in the cerebral cortex. In the cultured cortical neurons from *crmp1* mice, Sema3A increases the density of clusters of synapsin I and postsynaptic density-95, but this increase is markedly attenuated in *crmp1*-deficient mice. In our study of *C. elegans*, we identified several mutant alleles which show aberrant localization of

netrin/UNC-6 and axon guidance defects. We therefore conclude that the regulation of the glutamate receptor and the axon guidance molecule localization may play an important role in a wide variety of developmental processes from cell migration to neural network formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	31,100,000	0	31,100,000
2006年度	19,000,000	0	19,000,000
2007年度	17,200,000	0	17,200,000
2008年度	17,000,000	0	17,000,000
2009年度	17,400,000	0	17,400,000
総計	101,700,000	0	101,700,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：CRMP セマフォリン プレキシシン 神経ガイダンス 組織構築

#### 1. 研究開始当初の背景

我々は、世界で始めてセマフォリン 3A (Sema3A) の情報伝達を媒介する分子 CRMP の同定に成功し、その後も、LIM キナーゼ、Fyn、Cdk5 の関与を明らかにするなど、当該分野における先駆的研究を展開してきた。神経軸索ガイダンス分子 Sema3A が NRP, Plexin 受容体複合体の順行性・逆行性の神経軸索内輸送を惹起し、この応答にある種のイオンチャネルと CRMP が関わることを世界に先駆けて報告した。本計画の当初における特色ある背景は、1) Sema3A 刺激が電位変化を伴う細胞内輸送を惹起する事の発見、2) CRMP の軸索ガイダンスシグナルを媒介する機構を確立、3) CRMP ノックアウトマウスの表現型の発見、4) Alzheimer 病との関連性を着想するに至った等の諸点にある。これらを基盤に、申請者らは、「CRMP は細胞外環境と細胞内機能因子との位置情報の機能連関に関わる」との作業仮説を提起した。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的は、期間内に、CRMP ファミリー分子 (CRMPs1-5) の組織構築における役割を軸索ガイド分子セマフォリン (semaphorin) および受容体のニューロピリン (NRP)、プレキシシン (Plexin) ファミリーとの分子間相互作用とその変異マウス表現型との対応を中心に細胞・個体レベルにおいて明らかとすることである。さらに、機能分子の局在制御の普遍的原理を明らかとするため、ネトリンおよびネトリン受容体分子の

局在異常を示す線虫変異体を単離、遺伝学的解析を行う。

#### 3. 研究の方法

- ①計画初年度より遺伝子改変マウスの作製を開始し、平成 21 年度まで継続する。CRMP 機能におけるリン酸化の意義を生体内において検証するため、非リン酸化型 CRMP ノックアウトマウスを作製する。
- ②Sema3A の細胞内 Ca<sup>2+</sup> に対する効果、および各イオンチャネル活性化に及ぼす効果を、新規申請の灌流装置ヒーターシステム、加温プレートを用いて解析する。Sema3A の下流にあって軸索輸送亢進に関わる分子を薬物阻害実験、ノックアウトマウス由来の神経細胞を用いて絞込み、当該申請の共焦点顕微鏡を用いて確立したアッセイ系に siRNA 法を適用することにより確定する。さらに遺伝子導入と同輸送応答のモニターリングを組み合わせて発見クローニングを計画・実施する。
- ③当該申請の共焦点顕微鏡を用いて細胞レベルにおいてガイダンス分子に対する応答性、軸索、樹状突起、細胞極性等の形態・機能解析を行う。
- ④特にガイダンス分子およびグルタミン酸受容体の局在に焦点をあて、CRMP1~5 ノックアウトマウスの表現型解析を行う。
- ⑥ガイダンス分子ネトリン/UNC-6 の局在に注目し、同分子の局在性に異常を示す線虫変異体を単離し、遺伝的解析を行う。

#### 4. 研究成果

①CRMPs ファミリー分子遺伝子欠損マウスの作製と表現型解析：すでに CRMP1, CRMP3, CRMP4, CRMP5 および CRMP2S522A ノックインマウスの作製および表現型解析に着手・成功し, 細胞極性, 細胞移動, 樹状突起の異常, スパイン成熟遅滞などの神経形態異常に加え, *crmp1* 欠損マウスにおいては, メタンフェタミンなどの薬物に対する過剰応答, プレパルスインヒビションテストの陽性などの行動異常を示すことを見出した. CRMP2S522A ノックインマウス (*crmp2ki*) において, 樹状突起のパターン形成に異常が認められた. しかしこの異常は, *crmp1* 遺伝子の単独欠損マウス *crmp1*<sup>-/-</sup> に比して軽微であった. *crmp1*<sup>-/-</sup>バックグラウンドに *crmp2ki* ホモマウスの表現型を観察したところ, 同マウスの第V層錐体細胞の樹状突起の伸長パターンは, basal dendrite の伸長方向が通常とは全く逆になるという特異な表現型を示すことが明らかとなった. これらの表現型異常の少なくとも一部に, ニューロトロフィン, セマフォリンおよびリーリンのシグナル伝達異常, およびそれらに関わる機能分子の局在異常が関与することを見出しつつある.

②Sema3A のシグナル伝達機構と機能分子の局在制御: Sema3A が樹状突起のパターン形成, スパインの成熟を, Cdk5 の活性化と, それにもとづく CRMP リン酸化のプロセスを介して促進することを明らかにした. 後根神経節細胞において, Sema3A が Fyn および Cdk5 を介して軸索輸送を亢進するとの現象を見出していたが, その生理学的役割は長らく不明であった. 後根節細胞同様, Sema3A に感受性を有する海馬培養細胞においては, Sema3A は軸索のみならず樹状突起輸送をも亢進すること, Sema3A の作用部位は軸索成長円錐に局限し, 成長円錐局所のシグナルが, イオンチャネルと逆行性軸索輸送の双方の連関によって樹状突起に伝搬されること, その輸送の積み荷は, PlexAs/GluR2 であることを明らかにした(投稿中). この事実は, Sema3A が GluR2 などのシグナル伝達分子の局在を制御することを示す.

③ネトリン/UNC-6 およびネトリン受容体/UNC-5 などのガイダンス分子ならびにその受容体の局在異常を示す線虫変異体の遺伝学的解析: 生体内における機能分子の位置情報が神経回路形成に必須であること, ならびにその分子機構を明らかにすることを目的として, UNC5::GFP, UNC-6::GFP を発現するトランスジェニック線虫を作製し, その局在に異常を示す変異体を単離した. この線虫変異体の原因遺伝子の特定を試み, 現在までに *unc-104*, *vab-8*, *unc-73*, *unc-14*, *unc-18* 等の分子を同定した.

## 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 31 件)

- ① Yamashita N, Uchida Y, Ohshima T, Hirai S, Nakamura F, Taniguchi M, Mikoshiba K, Honnorat J, Kolattukudy P, Thomasset N, Takei K, Takahashi T, Goshima Y. Collapsin Response Mediator Protein 1 Mediates Reelin Signaling in Cortical Neuronal Migration. *J. Neurosci.*, 26:13357-13362, 2006.
- ② Charrier E, Mosinger B, Meissirel C, Agueram, Rogemond V, Reibel S, Salin P, Chounlamountri N, Perrot V, Belin MF, Goshima Y, Honnorat J, Thomasset N, Kolattukudy P, Transient Alterations in granule cell proliferation, apoptosis and migration in post-natal developing cerebellum of CRMP1<sup>-/-</sup> mice. *Genes to Cells*, 11:1337-1352, 2006.
- ③ Ogura K, Goshima Y. The autophagy-related kinase UNC-51 and its binding partner UNC-14 regulate the subcellular localization of the Netrin receptor UNC-5 in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 133: 3441-3450, 2006.
- ④ Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Kishino A, Kikuchi K, Shibata S, Okano HJ, Ikegami T, Moriya A, Konishi O, Nakayama C, Kumagai K, Kimura T, Sato Y, Goshima Y, Taniguchi M, Ito M, He Z, Toyama Y, Okano H. A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med*, 12: 1380-1389, 2007.
- ⑤ Nakajima O, Nakamura F, Yamashita N, Tomita Y, Saito F, Okada T, Iwamatsu A, Kondo E, Fujisawa H, Takei K, Goshima Y: FKBP133, A novel mouse FK-506 binding protein homolog alters growth cone morphology. *Biochem Biophys. Res. Comm.*, 346:140-149, 2006.
- ⑥ Yamashita N, Morita A, Uchida Y, Nakamura F, Usui H, Ohshima T, Taniguchi M, Honnorat J, Thomasset N, Takei K, Takahashi T, Kolattukudy P, Goshima Y. Regulation of spine development by semaphorin3A through cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of collapsin response mediator protein 1. *J Neuroscience*, 27, 12546-1

- 2554, 2007.
- ⑦ Asakura T, Ogura K, Goshima Y. UNC-6 expression by the vulval precursor cells of *Caenorhabditis elegans* is required for the complex axon guidance of the HSN neurons. *Dev Biol*, 304: 800-810, 2007.
- ⑧ Watari-Goshima N, Ogura K, Wolf FW, Goshima Y, Garriga G. C. *elegans* VAB-8 and UNC-73 regulate the SAX-3 receptor to direct cell and growth-cone migrations. *Nat Neurosci*. 10:169-176, 2007.
- ⑨ Togashi K, von Schimmelmann MJ, Nishiyama M, Lim CS, Yoshida N, Yun B, Molday RS, Goshima Y, Hong K. Cyclic GMP-gated CNG channels function in *Sema3A*-induced growth cone repulsion. *Neuron*, 158, 694-707, 2008.
- ⑩ Yamaguchi J, Nakamura F, Aihara M, Yamashita N, Usui H, Hida T, Takei K, Nagashima Y, Ikezawa Z, Goshima Y. Semaphorin3A alleviates skin lesions and scratching behavior in NC/Nga mice, an atopic dermatitis model. *J Invest Dermatol*, 128: 2842-2849, 2008.
- ⑪ Fuchikawa T, Nakamura F, Fukuda N, Takei K, Goshima Y. Protein tyrosine phosphatase SHP2 is involved in Semaphorin 4D-induced axon repulsion. *Biochem Biophys Res Commun*. 385: 6-10, 2009.
- ⑫ 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*. 284(40):27393-27401, 2009.
- ⑬ 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*. 516:360-375, 2009.
- ⑭ Asakura T, Waga N, Ogura KI, Goshima Y. Genes Required for Cellular UNC-6/Netrin Localization in *Caenorhabditis elegans*. in press, 2010.
- ⑮ Ogura K, Okada T, Mitani S, Gengyo-Ando K, Baillie DL, Kohara Y, Goshima Y. Protein phosphatase 2A cooperates with the autophagy-related kinase UNC-51 to regulate axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Development*. 137:1657-1667, 2010.
- [学会発表] (計 17 件)
- ① Usui H, Yamamoto H, Iizuka A, Shouji M, Yamashita N, Taniguchi M, Nakamura F, Takei K, Goshima Y: *Sema3A* drives AMPA receptor subunit GluR2 to dendrite. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, 第 79 回日本生化学会 & 第 29 回日本分子生物学会合同国際大会, 2006 年 6 月, 京都.
- ② Ogura K, Goshima Y: The autophagy-related kinase UNC-51 and its binding partner UNC-14 regulate the subcellular localization of the netrin receptor UNC-5 in *C. elegans*. Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, 2006 年 9 月, New York.
- ③ Goshima Y: Axonal transport elicited by axon guidance molecules. 第 29 回神経科学会, シンポジウム「神経軸索の伸長とガイダンスメカニズム」招待講演, 2006 年 7 月, 京都.
- ④ Asakura T, Ogura K, Goshima Y: The vulval precursor cells of *C. elegans* supply Netrin/UNC-6 for the proper axon guidance of the HSN neurons. 第 29 回神経科学会, 京都, 2006 年 7 月, 京都.
- ⑤ 松岡宏, 小倉顕一, 五嶋良郎: *C. elegans* における軸索ガイダンス制御分子 *unc-51*, *unc-14* 変異体からの抑制変異体の分離. 第 79 回薬理学会年会, 2006 年 3 月, 横浜.
- ⑥ 山下直也, 後藤泰一郎, 臼井洋, 山本藍子, 佐々木幸生, 中村史雄, 竹居光太郎, 五嶋良郎: Semaphorin3A はシグナル伝達に関与する分子の軸索内輸送を選択的に亢進する. 第 79 回日本薬理学会年会, 2006 年 3 月, 横浜.
- ⑦ 朝倉太郎, 小倉顕一, 五嶋良郎: The vulval precursor cells of *C. elegans* supply Netrin/UNC-6 for the proper axon guidance of HSN neurons. 第 79 回薬理学会年会, 2006 年 3 月, 横浜.
- ⑧ 中島央美, 須藤文和, 岩松明彦, 近藤英作, 藤澤肇, 五嶋良郎, 中村史雄: Plexin-A4 と相互作用する新規 FK506 結合タンパク質の同定とその Semaphorin 情報伝達における役割. 第 79 回日本薬理学会年会, 2006 年 3 月, 横浜.
- ⑨ 五嶋良郎: 反発性ガイダンス分子による軸索伸長制御機構. 第 111 回日本解剖学会総会, 招待講演, 2006 年 3 月, 相模原.

- ⑩ Kumeta K, Nakayama Y, Kuramata E, Yamane M, Yamashita N, Uchida Y, Gengyo-Ando K, Mitani S, Ogura K, Nakamura F, Goshima Y, Filamin A, an actin-binding protein, participates in the Semaphorin3A signaling through the interaction with collapsing response mediator proteins, 52th Japan Neurochemical Society Meeting, 200年6月22日, 伊香保.
- ⑪ Goshima Y, Uchida Y, Yamashita N, Nakamura F, CRMPs and their phosphorylation by Cdk5 regulate dendritic field organization in the cerebral cortex, 2<sup>nd</sup> Cdk5 International Symposium, 2009年6月26日, 東京.
- ⑫ Goshima Y: CDK5 regulates axon guidance, synapse maturation and cell migration through phosphorylation of the CRMP family proteins. The Croucher Symposium, "The role of Cdk5 in Neuronal development, synaptic plasticity and neurodegenerative diseases", 2007年1月, Hong Kong.
- ⑬ Ogura K, Mitani S, Gengyo-Ando K, Baillie DL, Kohara Y, Goshima Y: LET-92, a catalytic subunit of protein phosphatase 2A negatively regulates the autophagy related kinase UNC-51 on axon guidance of DD/VD motor neurons. 16th International *C. elegans* Meeting, 2007年6月, Los Angeles.
- ⑭ Yamashita N, Morita A, Uchida Y, Ohshima T, Nakamura F, Usui H, Honnorat J, Kolattukudy P, Thomasset N, Goshima Y: CRMP1 regulates spine maturation through mediating Semaphorin3A signaling *in vivo*. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA, 2007年, 11月, San Diego, USA.
- ⑮ Goshima Y: CRMP family proteins that regulate axon guidance, synapse maturation and cell migration. 第30回日本神経科学会・第50回日本神経化学会・第17回日本神経回路学会合同大会, 2007年, 9月, 横浜.
- ⑯ Miyazaki M, Ugajin K, Yamashita N, Nakamura F, Kolattukudy P, Goshima Y: Phenotype analysis of *crmp5*-deficient mice. 第30回日本神経科学会・第50回日本神経化学会・第17回日本神経回路学会合同大会, 2007年, 9月, 横浜.
- ⑰ Goshima Y, Sema3A-induced axonal transport facilitates dendritic accumulation of glutamate receptor subunit GluR2/3, Annual meeting of Japan Neuroscience Society, 2008年7月11日, 東京.
- ⑱ Ito M, Miyazaki M, Ugajin K, Yamashita N, Nakamura F, Kolattukudy P, Goshima Y, Abnormal Purkinje cell dendrite development in collapsing response mediator protein 5-deficient mice, Annual meeting of Japan Neuroscience Society, 2008年7月9日, 東京.
- ⑲ Takeshita S, Shiozawa T, Usui H, Gotoh T, Goshima Y, An automated analysis of axonal transport, Annual meeting of Japan Neuroscience Society, 2008年7月10日, 東京.
- ⑳ Nakamura F, Ugajin K, Yamashita N, Taniguchi M, Goshima Y, Morphological analysis of hippocampal CA1 pyramidal neurons in Sema3A(-/-) mice, Annual meeting of Japan Neuroscience Society, 2008年7月10日, 東京.
- Kumeta K, Nakayama Y, Nakamura F, Goshima Y, The involvement of filamin in Sema3A signaling, Annual meeting of Japan Neuroscience Society, 2008年7月10日, 東京.
  - Obara M, Yamashita N, Uchida Y, Tursun A, Nitta A, Nakamura F, Nabeshima T, Goshima Y, The role of phosphorylated CRMP2 in the memory impairment induced by A $\beta$  (25-35), Annual meeting of Japan Neuroscience Society, 2008年7月11日, 東京.
  - Yamashita N, Takao K, Miyakawa T, Goshima Y, Comprehensive behavioral analysis of the *crmp1* knockout mice, 2<sup>nd</sup> Cdk5 International Symposium, 2009年6月26日, 東京.
  - Asakura T, Waga N, Ogura K, Goshima Y, Genes required for localization of UNC-6/Netrin and/or UNC-5 in *Caenorhabditis elegans*, 17<sup>th</sup> International *C. elegans* Meeting, 2009年6月27日, Los Angeles, USA.
  - 肥田友伸, 竹内寛, 臼井洋, 山下直也, 五嶋良郎, AxinはSemaphorin3Aシグナル伝達に関わる新たな分子である, 第120回日本薬理学会関東部会, 2009年7月11日, 東京.
  - 蔵岡聡, 肥田友伸, 臼井洋, 竹下紗由美, 塩澤孝仁, 後藤敏行, 五嶋良郎, 軸索輸送の自動解析系の確立と薬剤スクリーニングへの応用, 第120回日本薬理学会関東部会, 2009年7月11日, 東京.
  - Nakamura F, Ugajin N, Yamashita M, Taniguchi M, Ohshima T, Goshima Y, Sema3A regulates apical dendritic

growth of hippocampal CA1 pyramidal neurons, 32th Japan Neuroscience Society Meeting, 2009年9月16日, 東京.

- Yamashita N, Usui H, Chen S, Goshima Y, Semaphorin3A drives AMPA receptor subunit GluR2 to dendrites, 32th Japan Neuroscience Society Meeting, 2009年9月16日, 東京.
- Hida T, Takeuchi K, Usui H, Yamashita N, Goshima Y, Involvement of phosphorylation of unprimed substrates by GSK3b in Semaphorin3A-induced facilitation of axonal transport, 32th Japan Neuroscience Society Meeting, 2009年9月16日, 東京.
- Ogura K, Goshima Y, Muscle disorganization mutations unc-22 and unc-15 suppress abnormal axon guidance of unc-51 mutants in *C. elegans*, 第32回分子生物学会年会, 2009年12月11日, 横浜.
- Asakura T, Ogura K, Waga N, Okada T, Goshima Y, ATG-4.2 regulates intracellular localization of UNC-5, 第32回分子生物学会年会, 2009年12月11日, 横浜.

[図書] (計2件)

- ① Goshima Y, Sasaki Y, Uchida Y, Yamashita N, Nakamura F. CRMP family protein: Novel targets for Cdk5 that regulates axon guidance, synapse maturation, and cell migration. In Cyclin Dependent Kinase 5, ed by Nancy Y Ip, Li-Huei Tsai, Springer, p313, 2008.
- ② Yamashita N, Nakamura F, Goshima Y. Role of Cdk5 in axon guidance and synapse development. Tanpakushitsu Kakusan Koso. 54:802-807, 2009.

[その他]

ホームページ等

<http://parmac.med.yokohama-cu.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

五嶋 良郎 (GOSHIMA YOSHIO)

横浜市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00153750

### (2) 研究分担者

大島 登志男 (OOSHIMA TOSHIO)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：20311334