

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19500338

研究課題名（和文）初期-後期エンドソーム移行による神経突起伸長制御機構の解明

研究課題名（英文）Study of neurite elongation mechanisms of early-late endosome transfer

研究代表者

青木 俊介 (Aoki Shunsuke)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授

研究者番号：30392426

研究成果の概要（和文）：本研究では初期-後期エンドソーム転移が関与する神経突起伸長機構のSoloならびにRho GTPase、class C VPS/HOPSコンポーネントが働く分子メカニズムに注目して研究を進めた。その結果、Soloの下流でRacが作用し、VPS39が突起伸長に重要な役割を担っている事が示唆された。また、モデル動物でのシリコンチューブ連結における神経再生モデル系を構築し、*in vivo*で軸索伸長系に対する種々の細胞や薬剤等の投与実験を行うことができる再生評価系を確立することができた。

研究成果の概要（英文）：We studied on the intracellular mechanisms of neurite elongation controlled by early-late endosome transition modulated by Solo, Rho GTPase and class C VPS/HOPS molecules. We found that Rac is a major downstream signal regulator for neurite elongation induced by Solo and that VPS39 plays an important role in the cellular signal transduction. Moreover, we established a novel *in vivo* bioassay for neurite elongation/nerve regeneration by ligation of dissected rat facial nerve with silicon tube.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経薬理学

キーワード：神経損傷の再生・修復、細胞内小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

(1) 初期-後期エンドソーム移行システム

細胞内に存在する小胞のうちエンドソームは初期エンドソーム、リサイクリングエンドソーム、後期エンドソームの3種に分類され、伸長する神経突起の末端である成長円錐において近位側の細胞膜がエンドサイトーシスによって取り込まれ初期エンドソームからリサイクリングエンドソームへ転移しエクソサイトーシスによって先端方向へ運ばれる事が突起進展に必要であることが知られている。一方、細胞内エンドソームの膜輸送システムは主として初期エンドソームを起点とした2種のシステムに分類され、初期-リサイクリングエンドソーム膜輸送系と、初期-後期エンドソーム膜輸送系が知られている。伸長する神経突起末端の成長円錐においては様々な種類の細胞骨格が単分子の重合やその脱重合などによって成長することが必要であるとともに、細胞膜がエンドソームによって空間的に異なる場所に輸送される事も必要である事が示唆されている。しかしながら、初期-リサイクリングエンドソームの膜輸送系の神経突起伸長に関しては多くの研究がおこなわれ分子システムが明らかになっているのに比して、初期-後期エンドソーム移行機構の研究はあまり進んでいなかった。初期-後期エンドソーム移行に関しては、細胞の辺縁領域にある初期エンドソームが相互融合・成熟しながら細胞中心へ移動後、機能変換され後期エンドソームとなるとされていたが、移行プロセスの実行分子とメカニズムは不明であった。これに関して、蛍光標識 rab5, rab7 を用いた初期-後期エンドソーム移行の生細胞での可視化研究が行われた。その結果、初期エンドソ

ムから後期エンドソーム移行には複数の VPS (Vacuolar Protein Sorting) タンパク質からなる class C VPS/HOPS (Homotypic fusion and vacuole Protein sorting) 複合体の働きが必須である事が示されていた (Rink J et al. Cell 122, p735, 2005)。

(2) GEF1 ドメインを有する Solo と GTPase ファミリー分子

我々の研究グループは、小脳プルキニエ細胞変性マウスである PCD マウスの研究から初期エンドソーム特異的に局在する分子 Solo を同定していた。また、Solo が関与する初期-後期エンドソーム膜輸送系が神経突起伸長制御に関与する証拠を得ていた (Sun YJ et al. MCB 26, p6923, 2006)。Solo は GEF ドメインと C 末端の膜貫通ドメインからなるユニークな構造を有しており、C 末端の膜貫通ドメインを介して初期エンドソームに局在し初期から後期エンドソームの移行を制御することで初期エンドソームの数を増加させる活性を有する事が明らかになっていた。さらに Solo は培養ニューロンでは神経突起伸長を促進する活性を有し、他方、小脳のスライス培養系の RNAi 実験では Solo の発現抑制はニューロンの軸索伸長を抑制する事が明らかになった。これらの結果は Solo の下流シグナルが初期-後期エンドソーム移行システムを介して神経軸索突起伸長を促す事を示唆していた。また、初期エンドソームにおいて Solo の GEF ドメインの直接的な標的となる RhoGTPase ファミリー分子の重要性が示唆されていた。

2. 研究の目的

(1) Solo の軸索伸長活性

本研究では初期-後期エンドソーム転移が関与するような神経突起伸長機構の分子レベルのメカニズムを明らかにすることを目指して研究をおこなった。とりわけ Solo ならびに Rho GTPase, class C VPS/HOPS コンポーネントが関与する神経突起伸長の分子メカニズムに注目して研究を進めた。

(2) Rho GTPase ファミリー分子群に関して

Solo の GEF ドメインの活性発現に関係するような標的分子群のうち RhoGTPase ファミリー分子群に注目し Solo との関係を調べることを目的とした。Solo ならびに下流 RhoGTPase とエフェクター分子群に対する各種変異体等を用いて実験系を構築する。RhoGTPase ファミリーのなかでも Rho, Rac, CDC42 に着目し活性化型分子やドミナントネガティブ分子、また siRNA 分子等を構築し突起伸長に関する効果等を調べる。また、標的 RhoGTPase とそのエフェクター分子が Solo の下流で神経軸索伸長に関与する事を神経組織レベルで解析する実験系を構築することを目指した。

(3) class C VPS/HOPS に関して

Solo の下流シグナルで class C VPS/HOPS を起点としたシグナル伝達系が働き神経軸索伸長機序への関与している可能性が示唆される。class C VPS/HOPS は VPS11、VPS16、VPS33、VPS39 等の複数のコンポーネントから構成されており rab ファミリー分子分を介してエンドソームの制御システムとして働く。これら class C VPS/HOP の各コンポーネントを siRNA によりノックダウンして神経突起伸長への効果を細胞レベルや組織レベルで解析する事を目指した。

(4) 神経切断後の再連結シリコンチューブ

無い突起伸長再生実験系の確立

神経突起を人為的に再伸長させることが出来れば種々の難治性神経疾患に対する治療へ役立てることができる。*in vivo* での神経切断後の神経軸索再生促進実験などで神経再生の為の臨床応用に関する研究にまで視野を広げ、siRNA や作用薬剤などを導入できる動物レベルでの顔面神経切断後の再連結シリコンチューブ移植実験系を確立することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現用構築

Solo ならびに RhoGTPase ファミリー分子の発現用遺伝子構築は CMV プロモーター等の高発現用ベクターを用いて定法により構築した。Rho, Rac, CDC42、RhoG のドミナントネガティブならびに活性化型構築を用意した。ニューロンの突起可視化用の構築として、ニューロン特異的 T α -1 プロモーターの下流に赤色蛍光タンパク質 dsRed2 をコードする遺伝子を連結した構築を定法により作成した。

(2) siRNA の作製

RhoGTPase ファミリー分子ならびに class C VPS/HOPS の各コンポーネント VPS11、VPS16、VPS18、VPS33、VPS39、VPS41 に関する siRNA を自動配列デザインツールを用いて作製し、受託合成により作製した。

(3) マウス胎児大脳皮質由来初代培養ニューロン

E14 胎児マウスより大脳皮質を切除して酵素的に分離したのち NeuroBasal 培地に B27 サプリメントを添加して培養を行った。遺伝子導入はリポフェクトアミンと DNA の複合体を用いて定法により行った。

(4) *in utero* 遺伝子導入

E13 胎児マウス脳室内へ発現ベクターならびに siRNA を含む DNA/RNA 溶液をマイクロインジェクションし 60 V, 50 ms X 5 回の条件でエレクトロポレーション法により遺伝子導入をおこなった。その後、胎児を摘出し脳組織切片を作成して解析を行った。

(5) 顔面神経切断後の再連結シリコンチューブ移植

ラット顔面神経を一部切断後にコラーゲンゲル注入シリコンチューブを決断軸索両端に縫合し移植を行った。その後、シリコンチューブを摘出し組織切片を作成して解析を行った。

4. 研究成果

(1) 蛍光イメージングによる突起伸長解析

ニューロンの突起可視化用の構築として、ニューロン特異的 T α -1 プロモーターの下流に赤色蛍光タンパク質 dsRed2 をコードする遺伝子を連結した構築をニューロンへ遺伝子導入しニューロン特異的に神経の突起伸長を解析する実験系が確立できた。この実験系を用いて、Solo ならびに Rho, Rac, CDC42, RhoG のドミナントネガティブ体をそれぞれ同時に導入したところ Rac 導入時に神経突起伸長に異常が解析された。このことから、Solo 下流で Rac が働いていることが示唆された。

(2) *in utero* での Solo 遺伝子導入実験

Solo は生後、脳において徐々に発現が上昇し成熟個体脳で高レベルに発現しているが、胎児期の脳では発現していない。そこで、胎児の脳で Solo を発現させることで異所性発現を行いその機能解析実験系を確

立した。*in utero* での胎児脳への遺伝子導入実験系を確立し、Solo 発現ベクターとニューロン神経突起可視化用の T α 1-dsRed2 構築を同時に E13 胎児脳へ遺伝子導入を行った。その後、E15 の胎児大脳皮質におけるニューロンの形態を赤色蛍光によって解析を行い Solo の生理作用を *in vivo* で解析できる実験系が構築できた。

(3) *in utero* での Solo/Rho GTPase の神経突起伸長における機能解析

初期エンドソームから後期エンドソームの移行を制御する事で神経突起伸長に関わる分子である Solo に関しても下流シグナル伝達系として想定される Rho small GTPase ファミリー分子に対する siRNA を作製し Solo 活性化条件下での抑制実験を行った。Rho に対する siRNA を導入した大脳皮質では Solo によるニューロン突起伸長が異常観察され短い突起が観察された。Rac に対する siRNA は突起伸長を完全に阻害した。一方、RhoG ならびに CDC42 に対する siRNA も突起伸長に異常を誘導したが、突起伸長の進行方向が変化しており、これはニューロン側の変化というより突起伸長をガイドする細胞周囲環境側の異常であると考えられた。これらの結果から Rac 1 が重要な役割を担っている事が示唆された。

(4) *in utero* での Solo/ class C VPS/HOP の神経突起伸長における機能解析

初期エンドソームから後期エンドソームの移行に必須の class C VPS/HOP の働きを抑制する為に必要となる siRNA を作製し、*in utero* エレクトロポレーション法により *in vivo* の神経細胞に対して導入し、同時にニューロン特異的な転写プロモーターによって赤色蛍光タンパクを導入することで遺伝子

導入ニューロンにおいてのみ特異的に神経突起の形態を観察した。class C VPS/HOP は VPS11, VPS16, VPS18, VPS33, VPS39, VPS41 から構成されており、そのそれぞれに対して siRNA を用意して class C VPS/HOP の各コンポーネントを抑制した。VPS11 ならびに VPS16 に対する siRNA を導入した大脳皮質では Solo によるニューロン突起伸長はネガティブコントロールの 2 種類の siRNA のほぼ同じであり正常であった。一方、VPS33 に対する siRNA では若干突起伸長が短くなった。他方、VPS39 に対する siRNA では突起がほとんど伸長しないことが明らかとなった。VPS41 に対する siRNA では細胞数が減少しており、ニューロン死が引き起こされた。このことから、class C VPS/HOP 構成コンポーネントのなかでも VPS39 が神経突起の伸長ならびに構造維持に重要な役割を担っていることが示唆された。

(5) 顔面神経切断後の再連結シリコンチューブ移植実験系の構築

東京女子医大の研究グループとの共同研究でラット顔面神経切断後のコラーゲンゲル充填シリコンチューブ連結系における神経再生評価モデル系を確立し、Tissue Engineering 誌に報告することができた。顔面神経切断後の再連結シリコンチューブ移植実験系においては透明のシリコンチューブを用いており再生神経を外部から視覚的に観察できことから薬剤や siRNA の効果をリアルタイム評価し in vivo の実証実験を行う事ができる。さらに、人に近い大型のモデル動物であるブタでシリコンチューブ連結系における神経再生モデル系を構築し、in vivo で軸索伸長系に対する種々の細胞や薬剤等の投与実験を行うことができる評価系を確立することができた (論文投稿中)。また、このような in vivo の実験系で今後、神経突

起伸長を制御する事を考えて、バイオアベイラビリティが高い低分子作用薬剤のスクリーニング系の構築も本研究では行った。今後、シリコンチューブ内部へ種々の初期エンドソームから後期エンドソームの移行阻害剤や siRNA を導入して神経再生への関与を証明する実験を行い、本研究成果を応用研究へ発展させることが重要であると考えられた。

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 10 件)

- ① T, Sakurai M, Ohashi H, Aoki S, Tominaga T, Wada K. Clock genes regulate neurogenic transcription factors, including NeuroD1, and the neuronal differentiation of adult neural stem/progenitor cells. **Neurochem Int.** 54: p227-285, 2009. (査読有り)
- ② Gamo K, Kiryu-Seo S, Konishi H, Aoki S, Matsushima K, Wada K, Kiyama H. G-protein-coupled receptor screen reveals a role for chemokine receptor CCR5 in suppressing microglial neurotoxicity. **J Neurosci.** 28: p11980-11988. 2008. (査読有り)
- ③ Sasaki R, Aoki S, Yamato M, Uchiyama H, Wada K, Okano T, Ogiuchi H. Tubulation with dental pulp cells promotes facial nerve regeneration in rats. **Tissue Eng Part A.** 14: p1141-1147. 2008. (査読有り)
- ④ Kabuta T, Furuta A, Aoki S, Furuta K, Wada K. Aberrant interaction between Parkinson disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. **J Biol Chem.** 283: p23731-23738. 2008. (査読有り)
- ⑤ Sasaki R, Aoki S, Yamato M, Uchiyama H, Wada K, Okano T, Ogiuchi H. Neurosphere generation from dental pulp of adult rat incisor. **Eur J Neurosci.** 27: p538-548. 2008. (査読有り)

- ⑥Kabuta T, Setsuie R, Mitsui T, Kinugawa A, Sakurai M, Aoki S, Uchida K, Wada K. Aberrant molecular properties shared by familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and carbonyl-modified UCH-L1. **Hum Mol Genet.** 17: p1482-1496. 2008. (査読有り)
- ⑦Hirayama K, Aoki S, Nishikawa K, Matsumoto T, Wada K. Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening. **Bioorg. Med. Chem.** 15:p6810-6818. 2007. (責任著者) (査読有り)
- ⑧Ohashi H, Nishikawa K, Ayukawa K, Hara Y, Nishimoto M, Kudo Y, Abe T, Aoki S, Wada K. Alpha 1-adrenoceptor agonists protect against stress-induced death of neural progenitor cells. **Eur. J. Pharmacol.** 573:p20-28. 2007. (責任著者) (査読有り)
- ⑨Noda M, Kariura Y, Pannasch U, Nishikawa K, Wang L, Seike T, Ifuku M, Kosai Y, Wang B, Nolte C, Aoki S, Kettenmann H, Wada K. Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of pro-inflammatory cytokine release from activated microglia. **J Neurochem.** 101:p397-410. 2007. (査読有り)
- ⑩Tanabe K, Gamo K, Aoki S, Wada K, Kiyama H. Melanocortin receptor 4 is induced in nerve-injured motor and sensory neurons of mouse. **J Neurochem.** 101:p1145-52. 2007. (査読有り)
- ⑪Nishimoto M, Furuta A, Aoki S, Kudo Y, Miyakawa H, Wada K. PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells. **Glia.** 55:p317-327. 2007. (査読有り)
- ⑫Setsuie R, Wang YL, Mochizuki H, Osaka H, Hayakawa H, Ichihara N, Li H, Furuta A, Sato Y, Sun YJ, Kwon J, Kabuta T, Yoshimi K, Aoki S, Mizuno Y, Noda M, Wada K. Dopaminergic cell loss in transgenic

mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. **Neurochem Int.** 50:p119-129. 2007. (査読有り)

[学会発表] (計3件)

- ①Hirayama K, Aoki S, Nishikawa K, Matsumoto T, Wada K. Identification of novel inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening, 16th international conference Interigent System for Molecular Biology. Toronto, 2008(July 19).
- ②Hirayama K, Aoki S, Nishikawa K, Matsumoto T, Wada K. Identification of novel UCH-L1-potentiating compounds by in silico drug screening, Neuro2007, Yokohama, 2007(September 10).
- ③平山和徳、青木俊介、西川香理、松本、和田圭司. Virtual screeningによるUCH-L3の新規阻害剤同定, 第35回構造活性相関シンポジウム, 京都, 2007(6月29日).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 俊介 (AOKI SHUNSUKE)
九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授
研究者番号：30392426

(2) 研究分担者

該当無し。

(3) 連携研究者

該当無し。

(4) 研究協力者

西川 香理 (NISHIKAWA KAORI)
東京大学・大学院工学系研究科・研究員
佐々木 亮 (SASAKI RYO)
東京女子医大学・歯科口腔外科