

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590109

研究課題名（和文）

リゾホスファチジン酸受容体 3 を介した神経突起分岐形成の分子機構解明

研究課題名（英文）

Molecular mechanisms for LPA<sub>3</sub>-mediated neurite branch formation

研究代表者 福嶋 伸之

(FUKUSHIMA NOBUYUKI)

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：10254161

研究成果の概要（和文）：神経突起の分岐は生後の神経ネットワーク形成に取って必須であるがその機構は未だ不明である。今回我々はリゾホスファチジン酸（LPA）が新規情報伝達経路を介して神経分岐を促進することを示した。神経系細胞に LPA<sub>3</sub> 受容体を発現させ、LPA で刺激をすると神経分岐の形成が生じた。この作用は G<sub>q</sub> シグナル経路の阻害により抑制された。さらに単量体型 G 蛋白質である Rnd2/Rho7 やその効果器である rapostlin の抑制性変異体を導入しても LPA<sub>3</sub> を介した神経分岐形成が阻害された。LPA<sub>3</sub> アゴニストの 2(S)-OMPT や LPA は初代培養海馬神経細胞の分岐形成を引き起こしたが、この作用も G<sub>q</sub> や Rnd2 の経路の阻害、あるいは LPA<sub>3</sub> のノックダウンにより抑制された。これらの知見は LPA<sub>3</sub>、G<sub>q</sub> および Rnd2 を包括する新規情報伝達経路が神経ネットワーク形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Although neurite branching is crucial for neuronal network formation after birth, its underlying mechanisms remain unclear. Here, we demonstrate that lysophosphatidic acid (LPA) stimulates neurite branching through a novel signaling pathway. Treatment of neuronal cell lines with LPA resulted in neurite branch formation when LPA<sub>3</sub> receptor was introduced. The effects of LPA were blocked by inhibition of G<sub>q</sub> signaling. Furthermore, expression of inhibitory mutants of the small GTPase Rnd2/Rho7 or an Rnd2 effector rapostlin abolished LPA<sub>3</sub>-mediated neurite branching. The LPA<sub>3</sub> agonist 2(S)-OMPT or LPA also induced axonal branch formation in hippocampal neurons, which was blocked by G<sub>q</sub> and Rnd2 pathway inhibition or LPA<sub>3</sub> knockdown. These findings suggest that the novel signaling pathway involving LPA<sub>3</sub>, G<sub>q</sub>, and Rnd2 may play an important role in neuronal network formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：リゾホスファチジン酸、G 蛋白質、神経軸索、分岐

## 1. 研究開始当初の背景

神経発達期の神経細胞は神経突起（軸索および樹状突起）の伸展・退縮を繰り返しながら分岐を形成し、神経回路を構築していく。このような神経突起の形態変化は細胞自律的な運動性だけでなく細胞外因子（誘導因子および反発/抑制因子）によっても調節されている。細胞外因子のうち、突起伸展・退縮に関わる因子は比較的良好に研究されている。例えば神経成長因子やセマホリン等はその作用機構も明らかにされている。これに対して、神経突起の分岐形成を調節する因子やその細胞内情報伝達経路に関する研究はほとんど行われていない。

LPA はいわゆる「神経突起伸展の反発因子」として働いていることが知られている。申請者らは、LPA がアクチンと微小管の再編成を介して幼若神経細胞の神経突起および軸索成長円錐の退縮を誘発することを明らかにしている (*MCN 2002, MBC 2002, J. Cell. Biochem. 2004, Brain Res. 2006, BBA2008*)。これらの作用は G 蛋白質共役型受容体である LPA 受容体 (LPA<sub>1</sub>~LPA<sub>6</sub>) のうち LPA<sub>3</sub> を除く全ての受容体により引き起こされる (*Annu. Rev. Biochem. 2004*)。

神経系における LPA<sub>3</sub> の機能は不明であったが、最近、申請者らは驚くべきことに LPA<sub>3</sub> の活性化が分岐形成を促進することを見出した。脳における *Lpar3* 遺伝子の発現は脳神経ネットワーク形成時期に認められるため、LPA<sub>3</sub> を介したシグナルが神経ネットワーク形成に関与していると考えられるが、その詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、LPA<sub>3</sub> が神経細胞の突起形成に

どのように関与するのか、さらにはその分子機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

細胞培養；ラット副腎髄質腫瘍細胞 (PC12 細胞) およびラット神経腫瘍細胞 (B103 細胞) は 10% ウシ胎仔血清を含む D-MEM 培地で培養維持された。海馬神経細胞は胎令 18 日目の ICR マウスあるいは生後 3 日目の ICR マウスより摘出した海馬から調製した。

遺伝子導入；レトロウイルスを使用した。あるいはプラスミド DNA をリポフェクトアミン LTX を用いて導入した。海馬神経細胞には Nucleofector を用いてプラスミド DNA を導入した。

神経分岐形成アッセイ；細胞を固定し細胞体より伸展している突起のうち最長のものに注目した。この突起から枝分かれをしている分岐のうち、細胞体直径よりも長いものを分岐と見なし、その数を数えた。1 カバーガラスあたり 50-100 個の細胞を任意に選んだ。

細胞免疫染色；ポリリジンコートをしたカバーガラス上に細胞を播種した。細胞をフォルマリンで固定し、ブロッキング後 1 次抗体を反応させた。2 次抗体にはビオチン標識抗体あるいは蛍光 (Alexa488、Alexa546 あるいは Cy3) 標識抗体を用いた。ビオチン標識抗体を用いた場合は、続いて蛍光 (Alexa488 あるいは Cy3) 標識ストレプトアビジンを用いた。

RT-PCR; Tri-reagent を用いて細胞より RNA を抽出した。cDNA を合成し、LPA 受容体 (LPA<sub>1</sub>~LPA<sub>6</sub>)、Rnd2、rapostlin、ATX、Liph に対する特異的プライマーを用いて PCR を行った。94°C ; 30 秒、55°C ; 30 秒、72°C ; 90 秒のサイクルを 35 回繰り返した。

GST-rapostlin 抗体の作成 ; rapostlin の C 末端側 (284 アミノ酸) を GST に融合させたりコンビナント蛋白質を作成した。これをマウスに注射し、抗血清を得た。

#### 4. 研究成果

PC12 細胞および B103 細胞に  $LPA_3$  受容体を発現させ、 $1 \mu M$  の  $LPA$  で刺激をすると 8 時間後より神経分岐の形成が生じた。この作用は  $G_q$  シグナル経路の阻害剤である YM-254890 ならびに U-73122 の前処理により抑制されたが、 $G_i$  阻害剤である百日咳毒素は影響しなかった。

単量体型 G 蛋白質である Rnd2/Rho7 やその効果器である rapostlin が神経分岐に関与していることが報告されているため、 $LPA_3$  による神経分岐にこれらのシグナル分子が関与しているかどうかを調べた。Rnd2 の抑制性変異体を導入すると、 $LPA_3$  を介した神経分岐形成が阻害された。rapostlin の変異体導入も同様の抑制効果を示した。これらの結果から、 $LPA_3$  活性化による神経分岐形成には  $G_q$  シグナルおよび Rnd2 シグナルの両者が関与していることが明らかとなった。

海馬神経細胞は生後約 2 週間で神経軸索を伸展させ分岐を多数形成するとともに標的神経細胞とシナプス形成を終結させる。この時期、*Lpar3* 遺伝子の一過性発現が観察された。同時期には *Rnd2* および *rapostlin* 遺伝子、ならびに  $LPA$  合成酵素であるオートタキシンおよびホスファチジン酸特異的ホスホリパーゼ A1 の各遺伝子 (*ATX*, *Liph*) の発現も認められた。 $LPA_3$  の細胞内局在を免疫学的染色により検討したところ、神経軸索の成長円錐およびバリコシティー部位に蓄積していることが明らかとなった。rapostlin 抗体を自作し  $LPA_3$  抗体とともに 2 重染色に使用したところ、両者の共存が認

められた。

初代培養海馬神経細胞に  $LPA_3$  アゴニストの 2(S)-OMPT を添加すると、軸索分岐が認められた。 $LPA$  も同様に軸索分岐形成を促進した。このことは  $LPA_3$  以外の  $LPA$  受容体刺激があったとしても、これらを介した作用は一過性であり、長期的な分岐形成作用には直接的な影響は無いことを示唆している。2(S)-OMPT の軸索分岐形成促進作用も  $G_q$  や Rnd2 の経路の阻害により抑制された。さらに、 $LPA_3$  に対する shRNA プラスミドを用いて *Lpar3* をノックダウンしたところ、2(S)-OMPT の作用が抑制された。一方、海馬神経細胞に *Lpar3* 遺伝子を過剰発現させると、軸索上に多数の小突起が認められた。この小突起を有する細胞数は  $G_q$  経路の阻害により減少した。

これらの知見は  $LPA_3$ 、 $G_q$  および Rnd2 を包括する新規情報伝達経路が神経軸索の分岐を調節していることを示している。これまで多くの研究により樹状突起スパイン形成の制御機構が明らかにされてきているが、軸索の分岐調節は不明な点が多かった。本研究はそのような調節機構の一端を明らかにしたと言える。特に成長過程における軸索の分岐は、正常な神経ネットワーク形成に先立つ、過剰なシナプス形成に必要な現象と考えられる。あるいは神経情報の分散に必要な細胞形態変化でもある。したがって、 $LPA_3$  シグナルは微小環境内の神経ネットワーク形成に重要な役割を果たしていることが示唆される。

さらに興味あることは、 $LPA$  産生系である合成酵素 ATX および LIPH が同じ発達期の脳に認められたことである。脳内で働く  $LPA$  の起源はいまだに不明であるが、神経細胞やグリア細胞が  $LPA$  を産生することが報告されており、血液由来ではないと考え

られる。Liph 遺伝子産物は 2 アシル型 LPA を合成するが、このタイプの LPA の LPA<sub>3</sub> および LPA<sub>6</sub> に対する親和性は他の受容体サブタイプにたいするそれよりも高い。LPA は脂溶性であるため、産生され近傍で作用していることが考えられる。成長円錐やバリコシティー部において LPA 合成が生じているのかどうか、明らかにする必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Furuta, D., Yamane, M., Tsujiuchi, T., Moriyama, R. and Fukushima, N. (2012) Lysophosphatidic acid induces neurite branch formation through LPA<sub>3</sub>. Mol. Cell. Neurosci. 50, 21-34. 査読有
2. Hayashi, M., Okabe, K., Kato, K., Okumura, M., Fukui, R., Fukushima, N. and Tsujiuchi, T. (2012) Differential function of lysophosphatidic acid receptors in cell proliferation and migration of neuroblastoma cells. Cancer Lett. 316, 91-96. 査読有
3. Okabe, K., Hayashi, M., Kato, K., Okumura, M., Fukui, R., Honoki, K., Fukushima, N. and Tsujiuchi, T. (in press) Lysophosphatidic acid receptor-3 increases tumorigenicity and aggressiveness of rat hepatoma RH7777 cells. Mol. Carcinog. 査読有
4. Okabe, K., Kato, K., Teranishi, M., Okumura, M., Fukui, R., Mori, T., Fukushima, N. and Tsujiuchi, T. (2011) Induction of lysophosphatidic acid receptor-3 by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate stimulates cell migration of rat liver cells. Cancer Lett. 309, 236-242. 査読

有

5. Fukushima, N., Furuta, D. and Tsujiuchi, T. (2011) Coordinated interactions between actin and microtubules through crosslinkers in neurite retraction induced by lysophosphatidic acid. Neurochem. Intl. 59, 109-113. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Fukushima, N. Lysophosphatidic acid signaling in neural functions. Molecular targets for treatment of pain. 2011 年 7 月 19 日、近畿大学 (東大阪市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

福嶋 伸之 (FUKUSHIMA NOBUYUKI)

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：10254161

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

辻内 俊文 (TSUJIUCHI TOSHIFUMI)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：10254492

森山 隆太郎 (MORIYAMA RYUTARO)

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：30411573