

## 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 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590211

研究課題名（和文） 光依存的な cAMP の時間空間的制御による神経突起形成の試験管内高解像度解析

研究課題名（英文） Application of photoactivated adenylyl cyclase to study the mechanisms of neurite formation by controlling temporal and spacial intracellular cAMP level *in vitro*.

研究代表者

井上 明宏（INOUE AKIHIRO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：80322080

研究成果の概要（和文）：

鞭毛藻類あるいはバクテリア由来の光活性化型アデニル酸シクラーゼ（PAC）の細胞内 cAMP 濃度の時空間的制御性能を、抗体による生化学的解析および FRET プローブの利用、およびメラノーマ細胞におけるメラノソームの動態観察によって調べた。また、マウス胎児海馬由来初代神経細胞培養系へはエレクトロポレーションによって遺伝子発現を行い、PAC 分子の PC12 細胞も含めた神経系細胞の形態機能解析への応用を試みた。

研究成果の概要（英文）：

Potencies of the photo-activated adenylyl cyclases (PAC) from euglena and bacteria for controlling intracellular cAMP concentration *in vitro* were analyzed biochemically with a cAMP-ELISA as well as cell-biologically with an Epac FRET sensor probe. It was also observed that melanosomes labeled with its associated protein Rab27a fused to fluorescent proteins were immediately moved toward peripheral regions of the B16 melanoma cells in response to an increase of the intracellular cAMP. We have also tried to utilize the PACs to study the morphological development and functions of neural cells in PC12 cells and hippocampal primary culture neurons.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
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： 基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード： (1) 神経突起形成 (2) cAMP (3) 細胞内シグナル伝達 (4) 光活性化 (5) 光活性化アデニル酸シクラーゼ (6) エレクトロポレーション (7)メラノサイト

### 1. 研究開始当初の背景

神経細胞突起先端のフィロポディアの構造変化、運動性、伸長に影響を与える分子として、例えば Netrin-1 は、その活性発現が細胞内の cAMP 濃度に依存することが知られているが、cAMP 濃度が高い時には誘導的に働き、低い時には反発的に働くという報告がある一方で、cAMP 濃度の変化はそのようなスイッチ的な効果ではなく、Netrin-1 に対する突起伸長の反応性の感度と相関しているに過ぎないなどの報告もあり、必ずしも cAMP による神経細胞発生分化制御システムの明確な理解は得られていない。

cAMP の細胞内濃度上昇による神経突起形成、伸長促進作用などは古くから知られているが、通常試験管内で cAMP 濃度を操作したり、PKA の活性を制御したりする場合には、培養液全体に薬物や機能タンパク質を添加する方法が取られてきている。しかし、液状薬剤の全投与では困難な特定の細胞内の特定部位における cAMP 濃度変化を時間的に注意深くコントロールした上で細胞形態変化を解析するような研究はほとんど行われていない。鞭毛藻類であるミドリムシは青色光照射の強弱により光に対して回避あるいは集合という正反対の行動を取ること古くから知られていたが、このセンサーとなっている光感受性フラビンタンパク質がアデニル酸シクラーゼ (PAC) であることが見出された。このタンパク質は動物細胞でもその光感受性および AC 活性が確認されているものの、本格的な動物細胞生物学研究への応用はこれからの課題となっている。

### 2. 研究の目的

本研究では、PAC を用いて時間的空間的に高い解像度をもって細胞内 cAMP の濃度をコントロールして、これまで不明であった動物細胞の形態発生あるいは機能における cAMP シグナルを介した生物学的現象の分子メカニズムの解明に迫ることを最終的な目的とする。そのために、まず PAC の基本的な性能をいくつかの培養細胞の実験系で検証することを行い、その上で培養神経細胞での利用可能性を試し、神経突起形成における細胞内 cAMP の濃度変動と神経細胞の応答性について研究する。

### 3. 研究の方法

(1) PAC 発現ベクターの構築と遺伝子導入

① PAC 発現ベクターの構築

鞭毛藻類由来 PAC $\alpha$  遺伝子 (euPAC) あるいはバクテリア由来 PAC 遺伝子 (bPAC) の全コード領域の cDNA の下流に IRES 配列を挿入し、続けて蛍光タンパク質の mCherry または Tomato を連結した。プロモーターとしては CAG あるいは beta-アクチンを使用して発現ベクターを構築した。

②メラノサイトの細胞質中のメラノソームに付随しているタンパク質である Rab27a に EGFP あるいは mCherry の融合した遺伝子発現ベクター (Rab27a-EGFP あるいは Rab27a-mCherry) を構築した。

### (2)細胞培養

①株化培養細胞

HEK293、PC12、B16 (メラノーマ) 細胞を使用した。

②海馬初代培養神経細胞

胎生 16.5~17 日目マウス胚から海馬体を単離し、基本的に Banker 法に則り低密度分散培養した。

### (3)遺伝子導入発現

①化学的トランスフェクション

Lipofectamine2000 (インヴィトロジェン社) あるいは高効率低毒性リン酸カルシウム変法で行った。

②エレクトロポレーション

Neon (インヴィトロジェン社) システムを使用して行った。

### (4)顕微鏡観察

蛍光タンパク質の観察、経時動態観察は共焦点レーザー顕微鏡装置 (Biorad MRC 1024) で行った。

### 4. 研究成果

(1) PAC 性能の生化学的評価

① PAC 発現ベクター

CMV プロモーター下で euPAC および IRES を挟んで膜移行シグナルを付与した蛍光タンパク質 tomato を連結させ、遺伝子導入細胞が生きた状態で直接同定できるようにした。また、PAC を免疫化学的に検出するために、PAC に HA タグを付与し、かつ細胞膜移行シグナルを付与した PAC-HAm を使用した発現ベクターも同時に作成した。

② ELISA 法による測定

これらの発現ベクターを HEK293 細胞に導入して、青色光照射による細胞集団の細胞内 cAMP 濃度の上昇を、抗 cAMP 抗体を用いた ELISA 法によって確認したところ、フォルス

コリンやイソブチルメチルキサンチンなどの強い cAMP アゴニスト作用をもつ薬剤による濃度上昇ほどではないが、非照射時から約 2 倍の上昇をみた。

## (2)生細胞での PAC 活性評価

### ①FRET プローブ

cAMP の細胞内エフェクター分子である Epac1 を含む CFP-Epac1-YFP 蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) プローブ DNA ベクターを B16 細胞に導入して、まずフォルスコリンの全投与において CFP/YFP の比率を調べたところ、1 分以内に約 10%の変動が確認された。しかし、euPAC とこの FRET プローブを共発現させた細胞に青色光を全照射した場合には変動幅が小さかったため、より強い PAC 活性を持つと考えられる bPAC に置換した。

### ②メラノソーム動態

細胞内 cAMP 濃度上昇を感知した細胞の形態学的変化をレーザー顕微鏡で調べる実験系として、B16 細胞内のメラノソームの動態を観察する系を確立した。B16 細胞内のメラノソームを EGFP-Rab27a 遺伝子導入により標識し、フォルスコリン全投与の効果を観察したところ、1 分以内に細胞質膜方向への移動が見られた。続いて、bPAC と Rab27a が共発現した細胞において、青色レーザー光 (440nm) の細胞全体への照射によって迅速なメラノソームの細胞質膜方向への移動が観察された。さらに、CFP-Epac1-YFP FRET プローブも同一細胞内に発現した細胞を用いて、限局した cAMP の濃度上昇をモニターしながらその局所部位でのメラノソームの動態を観察し、解析している。

### (3)PC12 細胞

神経細胞様の性質を示す副腎髄質由来の PC12 細胞は、細胞内 PKA 活性化刺激によって突起の萌芽、伸長していくことが知られている。PC12 細胞に euPACα の遺伝子を発現させ、まず暗所において細胞全体に青色光を照射することにより、細胞の形態変化がどのように起こるかを経時的に観察した。さまざまな光強度、照射時間を試したが、著明な突起形成、伸展が見られず、より強い PAC 活性を持つと考えられる bPAC に置換して検討をしている。

### (4)海馬神経細胞初代分散培養遺伝子導入系

マウス胎児海馬由来初代神経細胞培養系を確立した。細胞への遺伝子導入方法としてはインビトロジェン社の Neon エレクトロポレーションシステムを用いて十分な効率が得られている。より高い発現効率を得るために、プロモーターを CAG に変換し、さらにウッドチャック肝炎ウイルス遺伝子の部分制御配列を発現ベクターに挿入すること

により遺伝子産物の安定化を高め、トータルでおおむね解析に十分な遺伝子発現を得ていると考えている。PAC 遺伝子導入細胞における光照射による cAMP 濃度の変動は FRET プローブを用いて行っており、形態、動態変化との関連について解析、検討中である。

## 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 5 件)

- ① Takao Nakata, Shinsuke Niwa, Yasushi Okada, Franck Perez, and Nobutaka Hirokawa. Preferential binding of a kinesin-1 motor to GTP-tubulin-rich microtubules underlies polarized vesicle transport. *The Journal of Cell Biology* (査読有り) Vol.194 (2011), 245-255. jcb.201104034 [pii] 10.1083/jcb.201104034 [doi]
- ② 中田隆夫、シグナル分子の光制御技術と神経の形態形成、ブレインサイエンス・レビュー2011、査読なし、2011、23-36.
- ③ Yamagata Y, Kobayashi S, Umeda T, Inoue A, Sakagami H, Fukaya M, Watanabe M, Hatanaka N, Totsuka M, Yagi T, Obata K, Imoto K, Yanagawa Y, Manabe T, Okabe S. Kinase-dead knock-in mouse reveals an essential role of kinase activity of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IIα in dendritic spine enlargement, long-term potentiation, and learning. *Journal of Neuroscience* (査読有り) Vol.29 (2009), 7607-7618.
- ④ Numano F, Inoue A, Enomoto M, Shinomiya K, Okawa A and Okabe S. Critical involvement of Rho GTPase activity in the efficient transplantation of neural stem cells into the injured spinal cord. *Mol Brain* (査読有り) Vol.2 (2009), 37.
- ⑤ 中田隆夫、東京医科歯科大学の教授就任にあたって、解剖学雑誌、査読なし、Vol.84 (2009), 26-27.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Takao Nakata, Shinsuke Niwa, Yasushi Okada, Franck Perez, Nobutaka Hirokawa. The kinesin-1 motor protein KIF5 recognizes microtubule lattice structure emanated from GTP-tubulin in axons as directional cue. (キネシンは、GTP チュ

グリーンに由来する微小管格子構造を認識し、軸索の方向を認識する) Neuroscience 2011 (第34回日本神経科学大会)、平成23(2011)年9月15日、横浜。

- ② T.Nakata, S.Niwa, Y.Okada, F.Perez, N.Hirokawa. Preferential binding of a kinesin-1 motor to GTP-tubulin-rich microtubules underlies polarized vesicle transport. The American Society for Cell Biology 2011 Annual Meeting, December 06, 2011, Denver, Colorado, USA.
- ③ Takao Nakata, Nobutaka Hirokawa. Rewiring vesicle transports to probe the mechanism of polarized transports in neurons. (神経細胞内の機能分子 Traffic と高次脳機能そして疾患)、Neuro2010(第33回日本神経科学大会、第53回日本神経化学大会合同大会)、平成22(2010)年9月3日、神戸。
- ④ 角元利行、中田隆夫、Cdc42の光制御法の開発と培養細胞への応用、第115回日本解剖学会総会、2010年3月28-30日、盛岡。
- ⑤ Yoko Yamagata, Shizuka Kobayashi, Tatsuya Umeda, Akihiro Inoue, Hiroyuki Sakagami, Masahiro Fukaya, Masahiko Watanabe, Nobuhiko Hatanaka, Masako Totsuka, Takeshi Yagi, Kunihiko Oabata, Keiji Imoto, Yuchio Yanagawa, Toshiya Manabe, Shigeo Okabe. THE ROLE OF KINASE ACTIVITY OF Ca<sup>2+</sup>/CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN KINASE II IN HIPPOCAMPAL SYNAPTIC PLASTICITY AND LEARNING. The 36th International Congress of Physiological Sciences, July 27- August 1, 2009, Kyoto, Japan.
- ⑥ 山肩葉子、小林静香、梅田達也、井上明宏、阪上洋行、深谷昌弘、渡邊雅彦、畑中伸彦、戸塚昌子、八木健、小幡邦彦、井本敬二、柳川右千夫、真鍋俊也、岡部繁男、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II $\alpha$ ;活性は海馬シナプス可塑性の構造学的・機能学的・行動学的発現に不可欠、第32回日本神経科学大会、平成21(2009)年9月16-18日、名古屋。

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：ポリペプチド、単離された核酸、組み換えベクター、遺伝子導入キット、形質転換体、および細胞内カルシウムシグナルの調節

方法

発明者：石井智浩、中田隆夫

権利者：東京医科歯科大学

種類：特許

番号：PCT/JP2012/053705

出願年月日：2012年2月16日

国内外の別：国外(国内含む)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 明宏 (INOUE AKIHIRO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：80322080

(2) 研究分担者

中田 隆夫 (NAKATA TAKAO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50218004

(3) 連携研究者

なし