

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300134

研究課題名(和文)膜輸送と細胞骨格編成を統合した神経突起伸展・軸索ガイダンス機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of neurite outgrowth driven by membrane transport and cytoskeletal reorganization

研究代表者

中村 岳史 (Takeshi, Nakamura)

東京理科大学・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) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞の伸展制御の実体は骨格再編成と膜制御である。特に膜制御に焦点をあてキー分子の活性を可視化して基本要素の解明を行った。cAMPによる突起伸展ではcAMP PKA STEF Rac1が中心的に働き、先端部でのRac1とCdc42の局所活性化が制御の最小要素である。海馬細胞の極性形成では最長の突起先端でのみRap1が活性化し下流でPI3K、RalA、Nore1Aが働く。小胞上のTC10の不活性化がExo70乖離を介してRab11小胞の細胞膜融合を促進し伸展を正に制御する。突起伸展を促進するRab35のセンサーを開発した。突起先端部の細胞膜でのRab35活性は細胞体の細胞膜での活性よりも高い。

研究成果の概要(英文)：Cytoskeletal reorganization and the membrane addition are pivotal for neurite outgrowth. Here we studied the regulation-mechanism of membrane addition using FRET biosensors. TC10 activity at the plasma membrane decreased at extending growth cones. GTP hydrolysis of TC10 promotes neurite outgrowth through exocytic fusion of Rab11- and L1-containing vesicles by releasing exocyst component Exo70. We developed FRET sensor for Rab35, which promotes neurite outgrowth. Using Rab35 sensor, we showed that Rab35 activity at plasma membrane of growth cones was higher than that of neurite shafts and cell bodies. Phosphorylation of STEF by PKA is critical for Rac1 activation and neurite outgrowth in dbcAMP-treated PC12D cells. We propose that local activation of Rac1 and Cdc42 at neurite tips is necessary for neurite outgrowth. Longest neurite-specific activation of Rap1B in hippocampal neurons contributes to polarity formation through RalA and Nore1A in addition to PI3-kinase.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：神経突起伸展 小胞輸送 FRET Rab Rho

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応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制御機構の理解は近年急速に進んでいる。その一方で、後者の中心的制御因子である Rab ファミリーG 蛋白質が、外部刺激に応答するシグナル経路と小胞輸送機能をどう結びつけているかはほとんど未解明である。その大きな理由は、運動している成長円錐で Rab ファミリー分子の局所的な活性変化を見る手段がないことである。

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付加・取込みの制御機構に焦点をあてて、そのキー分子の活性動態を可視化し、神経突起伸展・軸索ガイダンスの基本要素を明らかにすることを目的として行った。

① 膜付加を制御するキー分子である Rab35 などの FRET センサーを新たに開発し、神経突起伸展の過程で、Rab5 を含むそれらキー分子の活性変化を可視化し、その制御機構を明らかにする。

② 2つの分子の活性を同時に可視化できるデュアル FRET 法に最適化したセンサーを開発し、Rho ファミリー分子と Rab ファミリー分子の協調的制御の分子の実体を明らかにする。

③ 細胞接着因子依存的な神経突起伸展について、FRET イメージングによる解析を行ない、これまでの NGF および cAMP による突起伸展制御機構の解析から得られた神経突起伸展の最小基本要素に関する作業仮説の検証と拡張を行なう。

④ 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、Rho/Rab ファミリー分子の活性とイノシトールリン脂質の量が「いつどこで変化しているのか」を FRET イメージングで可視化して、それらが軸索ガイダンス制御の中で果たす役割を明らかにする。

⑤ 以上の成長円錐伸展過程での形態変化データと分子活性変化データの相関を統計的手法で解析し、神経細胞の形態変化シグナル制御を統合した定量的モデルを構築する。

3. 研究の方法

本研究では、細胞内の分子活性を生きた細胞でモニターできる FRET センサーを使用し、各種の先端技術と組み合わせて使用した。

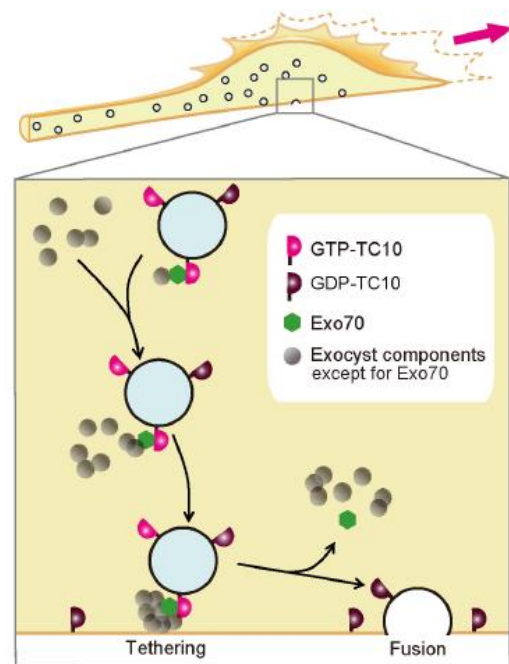
4. 研究成果

(1) 私たちのグループでは、NGF 刺激により誘導された神経突起先端部に Rac1/Cdc42 と PIP₃ を含む2つのフィードバックループが存在し、初期突起形成の原動力となることを明らかにした。ポジティブフィードバックでは PIP₃ → Vav2/3 → Rac1/Cdc42 という経路が主に働く。PIP₃ を脱リン酸化する SHIP2 がネガティブフィードバックを担う (Mol Biol Cell 2005; J Cell Biol 2007)。これに対して、cAMP による神経突起伸展の系では cAMP → PKA → STEF → Rac1 という経路がその中心で働いている。NGF 刺激の系との比較から、突起先端部での Rac1 と Cdc42 の局所活性化が神経突起伸展の最小基本要素であるという作業仮説を立てるに至った。

(2) 海馬神経細胞での軸索極性形成の過程で、Ras に近縁の G 蛋白質 Rap1 が最も長い神経突起 (future axon) の先端でのみ活性化することを示した。また Rap1 の新規変異体を利用して、Rap1 の下流分子のうち、PI3 キナーゼ、RalA、Nore1A が個々に働いて軸索極性形成に関与することを示した。

(3) 神経突起が伸びるには膜付加による局所的な表面積の増大が必要であり、成長円錐まで運ばれてきた小胞が細胞膜にエキソサイトーシスすることで必要な膜が供給される。Rho ファミリーG 蛋白質のメンバーである TC10 は、GLUT4 小胞の膜提示などでの解析から、小胞の細胞膜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、TC10 と Exo70 が神経突起伸展に関わることが報告された。その際には膜の付加を介することが想定されるが、具体的なメカニズムはよくわかっていない。そこで、そのメカニズムを明らかにすることを旨として、TC10 の活性をモニターする FRET センサーを使って、神経細胞株及び海馬初代培養神経細胞での解析を行った。神経成長因子(NGF)存在下で伸展している PC12 細胞の突起先端部、および海馬神経細胞の成長円錐において、伸展部に局限した細胞膜での TC10 活性の低下が見られた。またどちらの細胞でも小胞での TC10 活性は細胞膜での活性よりも高かった。全反射蛍光顕微鏡を使って、NGF 刺激した PC12 細胞において TC10 の載った小胞の細胞膜への融合が観察されたことから、神経細胞で TC10 小胞がエキソサイトーシスする際には、まず小胞上に活性型 TC10 が多く存在し、膜融合前に細胞膜付近で不活性化されると想定される(2006年に、私たちのグループは TC10 センサーを発現する HeLa 細胞を全反射蛍光顕微鏡により FRET イメージングすることで、TC10 小胞が細胞膜に融合する直前に小胞上の TC10 活性が低下することを示している)。また、NGF で誘導される神経突起伸展は TC10 のノックダウンで抑制できるが、その抑制を恒常活性化型 TC10 変異体ではレスキューできないことから、膜融合前の TC10 不活性化が突起伸展に必要であると考えられる。さらに、

TC10 と Exo70 の共局在の解析により、小胞上の活性型 TC10 が Exo70 と結合していることが確認された。先行研究から、活性型 TC10 と Exo70 の結合は、Exo70 を含む 8 量体であるエクソシスト複合体の安定化に働いているので、TC10 不活性化による Exo70 の乖離はエクソシスト複合体の disassembly→SNARE 複合体による細胞膜への融合につながると考えられる。また、小胞リサイクリング経路のキー分子であり神経突起伸展にも関与する Rab11 と TC10 の共局在の解析により、Rab11 陽性小胞の大部分に TC10 が載っていることがわかった。神経細胞株の成長円錐においては、突起伸展能を持つ細胞接着因子 L1 を含む小胞のほとんどが TC10 陽性であった。以上の結果に基づいて、「神経細胞においては、小胞上の TC10 の不活性化が、Exo70 の乖離を介して Rab11 および L1 陽性小胞の細胞膜への融合を促進し、それにより神経突起伸展を正に制御する」というモデルを提案した。



(4) Rab35 は脳神経系を含む多くの組織で発現している Rab ファミリーのメンバーであり、細胞膜、細胞質、小胞に存在する。Rab35 については、細胞質分裂や各種のレセプターのリサイクリングなど多彩な機能を持つこと

が明らかにされているが、脳神経系においても広範囲の神経細胞で突起伸展を促進することが報告されている。また Rab35 が神経成長円錐に豊富に存在することが共同研究者の解析でわかっている。そこで、Rab35 の神経突起伸展に果たす役割とその活性制御機構を明らかにするために、Rab35 の FRET センサーを開発した。

細胞膜での Rab35 の活性を検討するために、Raichu-Rab35 (Raichu-A018) の C 末端を K-Ras の C 末端に置換した Raichu-A018kx を作製した。Raichu-A018kx を発現させた PC12 細胞を NGF で 24 時間処理して突起伸展を誘導した後に、タイムラプス画像を撮影した。成長円錐様の突起先端部の細胞膜での Rab35 活性は、突起のシャフトや細胞体の細胞膜での Rab35 活性よりも有意に高いことがわかった。ただし、突起先端部での Rab35 活性変化は先端部の伸縮とは必ずしも相関しておらず、むしろ「よく広がった成長円錐様の形態を保持している部分で Rab35 活性が高い」という傾向があった。これは以前に私たちのグループが成長円錐での RhoA 活性について報告したのとよく似た活性化パターンである。前述のとおり Rab35 は成長円錐に豊富に存在する。また、昨年度の解析から、成長円錐と神経突起のシャフトにおいて Rab35 陽性小胞が存在して移動していること、この Rab35 陽性小胞の約 80% がリサイクリング経路を中心的に制御する分子である Rab11 を持っていることがわかっている。こうしたデータから、Rab35 が成長円錐で何らかの機能を発揮して突起伸展に働いていると想定される。

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 Nakamura, T., Yasuda, S., Nagai, H., Koinuma, S., Morishita, S., Goto, A., Kinashi, T., and Wada, N. Longest

neurite-specific activation of Rap1B in hippocampal neurons contributes to polarity formation through RalA and Nore1A in addition to PI3-kinase. *Genes Cells* 18, 1020-1031. 2013 (査読有)

② Fujita, A., Koinuma, S., Yasuda, S., Nagai, H., Kamiguchi, H., Wada, N., and Nakamura, T. GTP hydrolysis of TC10 promotes neurite outgrowth through exocytic fusion of Rab11- and L1-containing vesicles by releasing exocyst component Exo70. *PLoS One*, 8, e79689. 2013 (査読有)

③ Nagai, H., Yasuda, S., Ohba, Y., Fukuda, M., and Nakamura, T. All members of the EPI64 subfamily of TBC/RabGAPs also have GAP activities toward Ras. *J. Biochem.* 153, 283-288. 2012 (査読有)

④ Edimo, W. E., Derua, R., Janssens, V., Nakamura, T., Vanderwinden, J.-M., Waelkens E., and Erneux, C. Evidence of SHIP2 S132 phosphorylation, its nuclear localization and stability. *Biochem. J.* 439, 391-401. 2011 (査読有)

⑤ Goto, A., Hoshino, M., Matsuda, M., and Nakamura, T. Phosphorylation of STEF by protein kinase A is critical for Rac1 activation and neurite outgrowth in dbcAMP-treated PC12D cells. *Mol. Biol. Cell* 22, 1780-1790. 2011 (査読有)

[学会発表] (計 27 件)

その内招待講演 計 7 件

① 中村岳史: 膜輸送を制御するシグナルの動態を可視化する、第 8 回スフィンゴセラピー研究会、石川、2013 年 7 月

② Nakamura, T. A role of the Rac1-TC10 axis in neurite outgrowth, 日米脳科学セミナー Growth cones and axon

regeneration: Entering the age of informatics, New Orleans, USA
2012.10.10-12.

③ Nakamura, T., Fujita, A., Matsuda, M, and Wada, N. A role of the Rac1-TC10 axis in neurite outgrowth, 第 35 回日本神経科学大会、名古屋、2012 年 9 月

④ 作村諭一、田中大河、池田和司、中村岳史 : RhoGTPase による細胞形態制御の数理モデル- 定量データと力の導入、日本植物学会第 76 回大会、姫路、2012 年 9 月

⑤ 中村岳史 : FRET イメージングによる神経突起伸張制御機構の解析、大阪大学蛋白質研究所セミナー・包括脳ネットワーク研究会 第 2 回神経科学と構造生物学の融合、岡崎、2011 年 11 月

⑥ 中村岳史、後藤明弘、星野幹雄、松田道行 : cAMP による Rac1 活性化と神経突起伸張は PKA による STEF リン酸化を介する、第 84 回日本生化学会大会、京都、2011 年 9 月

⑦ Nakamura, T. The end of 35-year quest has come by FRET imaging: the molecular mechanism of cAMP-induced neurite outgrowth. BIT's 2nd World DNA and Genome Day, Dalian, China
2011.4.26 (4.25-30).

その他 20 件

① 永井寛之、石堂奈々子、安田さや香、小林穂高、福田光則、中村岳史 : 神経突起伸張過程における Rab35 の時空間的活性変化の解析、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2012 年 12 月 (ポスター)

② 藤田明音、鯉沼真吾、安田さや香、永井寛之、上口裕之、和田直之、中村岳史 : Rho ファミリー G 蛋白質のひとつである TC10 の GTP 加水分解は、Rab11 と L1 を含む小胞のエキソサイトーシスを介して神経突起伸張を促進する、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2012 年 12 月 (ポスター)

③ 安田さや香、大西悠希、藤田明音、川崎司人、和田直之、和栗聡、Giampietro Schiavo、福田光則、中村岳史 : エンドソーム成熟とオートファジーに関わる Rab7 の活性可視化、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2012 年 12 月 (ポスター)

④ 中村岳史、藤田明音、鯉沼真吾、安田さや香、永井寛之、上口裕之、和田直之 : Rho ファミリー G 蛋白質 TC10 は細胞膜近くで GDP 型に変わって Exo70 と脱離することにより、小胞のエキソサイトーシスを促進し神経突起伸張に働く、第 22 回バイオイメージング学会学術集会、東京、2013.9.15-16 (ポスター)

⑤ 安田さや香、永井寛之、大場雄介、福田光則、中村岳史 : TBC/RabGAP の EPI64 サブファミリーの全てのメンバーは Ras に対する GAP 活性を有する、第 22 回バイオイメージング学会学術集会、東京、2013.9.15-16 (ポスター)

⑥ 作村諭一、田中大河、池田和司、中村岳史 : Rho ファミリー G 蛋白質による細胞形態形成の定量数理モデル、第 36 回日本神経科学大会、京都、2013.6.20-6.23 (ポスター)

⑦ 鯉沼真吾、藤田明音、安田さや香、永井寛之、上口裕之、和田直之、中村岳史 : Rho ファミリー G 蛋白質 TC10 は細胞膜近傍での GTP 加水分解により小胞の細胞膜融合と突起伸張を促進する、第 36 回日本神経科学大会、京都、2013.6.20-6.23 (ポスター)

⑧ Fujita, A., Koinuma, S., Yasuda, S, Nagai, H., Wada, N., Nakamura, T. A role of the Rac1-TC10 axis in neurite outgrowth, 2012 ASCB annual meeting, San Francisco, USA 2012.12.11-14 (poster)

⑨ 安田さや香、川崎司人、大西悠希、中村岳史 : マクロピノサイトーシスにおける Rab5 の活性制御の解析。第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 (ポスター)

10. 石堂奈々子、永井寛之、小林穂高、新井

孝夫、服部成介、松田道行、福田光則、中村岳史：神経突起伸展における Rab35 の活性変化と小胞動態の解析、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月（ポスター）

11. Ishido, N., Nagai, H., Kobayashi, H., Arai, T., Fukuda, M., and Nakamura, T. Analysis of Rab35 function in neurite outgrowth using FRET biosensors, SfN2012, New Orleans, USA 2012.10.13-17.(poster)

12. Fujita, A., Koinuma, S., Nagai, H., Yasuda, S., Wada, N., and Nakamura, T. The Rho family GTPase TC10 is implicated in neurite outgrowth through membrane addition. 第 56 回神経化学学会大会、神戸、2012 年 9 月（ポスター）

13. 永井寛之、石堂奈々子、小林穂高、新井孝夫、服部成介、松田道行、福田光則、中村岳史：FRET センサーを使った神経突起伸展における Rab35 の機能解析。第 35 回日本神経科学大会、名古屋、2012 年 9 月（ポスター）

14. 大西悠希、川崎司人 安田さや香、新井孝夫、中村岳史：マクロピノサイトーシスにおける Rab5 の活性制御の解析。日本バイオイメージング学会第 21 回大会、京都、2012 年 8 月（ポスター）

15. 中平悠太、作村諭一、中村岳史、池田和司：細胞形態の定量化のための Shape Context の応用、2012 年電子情報通信学会総合大会、岡山、2012 年 3 月（ポスター）

16. 田中大河、中村岳史、池田和司、作村諭一：T 力学過程を介した細胞形態制御の定量数理モデル、2012 年電子情報通信学会総合大会、岡山、2012 年 3 月（ポスター）

17. Ishido, N., Nagai, H., Kobayashi, H., Sako, Y., Arai, T., Hattori, S., Matsuda, M., Fukuda, M., and Nakamura, T. Analysis of rab35 function in neurite outgrowth using FRET biosensors 第 34 回日本分子生

物学会年会、横浜、2011 年 12 月（ポスター）
18. Nakamura, T., Ishido, N, Obata, Y., Kobayashi, H., Yasuda, S., Koizumi, H., Arai, T., Fukuda, M., and Matsuda, M. A novel mode of neuritogenesis regulation: a spatiotemporal change of Rab35 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth. The 30th NAITO Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology (II) Sapporo, 2011 年 6 月（ポスター）

19. Ishido, N., Kobayashi, H., Sako, Y., Arai, T., Hattori, S., Matsuda, M., Fukuda, M., and Nakamura, T. Development of genetically-encoded FRET biosensors for Rab35. 第 63 回日本細胞生物学会大会、札幌、2011 年 6 月（ポスター）

20. Nakamura, T., Goto, A., Hoshino, M., and Matsuda, M. The molecular mechanism of cAMP-induced neurite outgrowth. EMBO workshop: Cell Biology of the Neuron. Polarity, Plasticity and Regeneration, Heraklion, Greece 2011.5.8 (5.7-10)（ポスター）

〔図書〕（計 1 件）

1. 安田さや香、中村岳史 化学とゲノム医学、化学と教育 61巻3号 (2013).

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