

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830049

研究課題名(和文) 神経細胞の軸索と神経回路形成機構の解明

研究課題名(英文) Intracellular signaling in neural circuit assembly.

研究代表者

中牟田 信一 (Nakamuta, Shinichi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20647474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞は、分化の過程で共通の未分化な神経突起から軸索と樹状突起を獲得する。これまでに、細胞外因子からの刺激が細胞内シグナル伝達を誘導し、軸索形成を誘導していることが明らかとなっているが詳細な解析はなされていない。我々は極性化していない神経細胞が、早生まれの神経細胞が形成した軸索とのTAG-1を介した接着と、接着に伴うRac1の活性化が、軸索形成に重要であることを明らかにした。さらに最近、CaMKsの新規基質の1つとしてGEF-H1/ARHGEF2を同定した。リン酸化されたGEF-H1は、微小管から遊離し活性化することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Neurons are highly polarized cells that have structurally distinct processes the axons and dendrites that differentiate from common immature neurites. Various extracellular and intracellular signals contribute to axon specification; however, the specific intracellular pathways whereby particular extracellular stimuli lead to axon specification remain to be delineated. From our research, we found that the TAG-1-mediated cell-to-cell interaction between the unpolarized multipolar cells and the pioneering axons regulates the polarization of multipolar cells partly through Rac1. Recently, we identified the Rho guanine nucleotide exchange factor H1 (GEF-H1/ARHGEF2) as one of the CaMKs substrates in hippocampal neurons. GEF-H1 can be sequestered in an inactive state on polymerized microtubules. We identified the GEF-H1 phosphorylation site in the N-terminal region. GEF-H1 N-terminal region regulate its binding towards microtubules, thereby regulating the GEF activity.

研究分野：神経科学

キーワード：神経細胞 軸索 樹状突起 細胞接着 細胞外因子 CaMKs

1. 研究開始当初の背景

脳神経系の機能の中核を担う神経回路網は、発生段階の神経細胞の細胞体から伸長した軸索が標的細胞へと到達することにより構築される。非常に精巧で緻密な神経回路網を形成するには、一本の軸索と複数の樹状突起をもつ神経細胞の存在が必須である。つまり、軸索と樹状突起形成の基本原理を解明することは、神経回路網の形成過程の理解に貢献するとともに、神経発生再生の学問分野に重要な知見を提供する。この複雑な神経回路網形成には、神経栄養因子などの様々な細胞外因子により軸索及び樹状突起が正確な場所に誘導されることが重要である。しかしながら、それらの細胞外シグナルの下流で、どのような細胞内分子メカニズムが神経細胞の形態を制御しているのかほとんど解明されていない。これまでに申請者は、神経細胞を用いて未成熟な複数の突起の1つのみに刺激を加えることで突起伸長を促し、軸索を誘導する系を確立した。さらにこの系を用いた解析より、新規にカルシウム-CaMKs 経路が軸索形成に重要であることを明らかにした(中牟田ら, *Sci. Signaling*, 2011)。しかしながら、軸索や樹状突起形成過程における CaMKI や CaMKII を介した細胞骨格の機能やその制御機構は未だ解明されていない。

2. 研究の目的

(1) 神経細胞の分散培養系を用いた *In vitro* での軸索形成には神経栄養因子等の分子が関与することが明らかになっているが、*In vivo* での詳細な軸索形成機構については解明されていない。生体内の神経細胞は細胞同士が密に接着しお互いの接着から誘導されるシグナル伝達が軸索形成に関与している可能性が考えられる。しかしながら、個々の細胞の遺伝子導入や導入細胞の形態・機能解析等が困難だったため、詳細な個々の細胞解析が行われて来なかった。我々の研究室で

立ち上げた Cre 依存的な細胞ラベル法(中牟田ら, *Sci. Signaling*, 2011)を用いれば、これらの問題を解決することが出来ることが予想できた。そこで、生理的な条件下で、軸索形成に関わる分子を同定し、その分子の機能解析を行い、接着因子による軸索形成機構を明らかにし、最終的には軸索と樹状突起による神経回路形成機構を解明することを目的とした。

(2) 神経細胞の突起形成には細胞骨格、特に微小管、アクチン繊維の制御が重要である。これまでに、個々の細胞骨格の制御機構に関しては勢力的に研究されてきたが、それらをつなぐ機構についてはほとんど解析されてこなかった。最近我々は、CaMKs の基質として ARHGEF2 を同定した。ARHGEF2 はこれまでの報告で不活性状態では微小管に局在し、活性化状態ではアクチン繊維に移行することが明らかとなっている。そこで、CaMKs による ARHGEF2 の制御機構を明らかにし、細胞外因子からの細胞骨格制御シグナルの全貌を解明すること目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、マウス胎生を用いた *In Utero* の系と Sh ノックダウン法を併用した個体遺伝子導入法を用いて神経が軸索、樹状突起を獲得していく様子を解析する。さらに、細胞外環境を最小限にし、細胞内シグナルを容易に解析しやすい系である神経細胞の分散培養法も併用して解析を行う。共同研究者より TAG-1 KO mouse を入手し、軸索形成過程の詳細な解析を行う。

(2) CaMKs の基質を同定するためにマウス脳を用いた Slice culture 法を立ち上げた。この実験系の利点は、生体内により近い状態で刺激し解析できる点である。この系を用いてリン酸化プロテオミクスを行い CaMKs の基

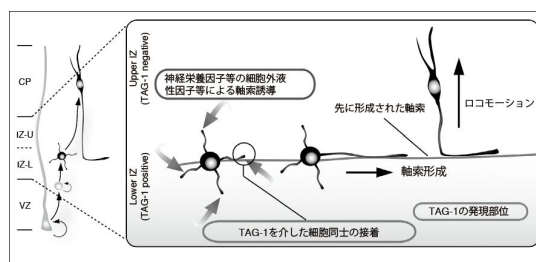
質の同定を行う。さらに同定されたリン酸化基質より候補分子を選択し、そのリン酸化サイトを同定する。リン酸化箇所が同定できれば、さらにリン酸化の抗体を作成する。リン酸化抗体を用いて、リン酸化の時系列的な変動や、細胞や組織を用いたリン酸化の同在を検討し、リン酸化の時空間的な を明らかにする。次に、CaMKs によるリン酸化の意義を検討するために、培養細胞を用いた過剰発現系を用いてリン酸化意義を明らかにする。さらに生体内でのリン酸化意義を解明するために、分散培養法を用いた遺伝子導入実験を行い、神経突起の形態に与える影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 生体内での軸索形成の詳細を観察するために *In Utero* 法で遺伝子を導入後、Slice culture を行い、GFP ラベルした神経細胞の挙動をライブセルイメージング法で解析した。その結果、多くの神経細胞では軸索が先に形成されること、発生期の脳皮質脳部位のうち、中間体で多極性から双極性へと形態を変化させることが明らかとなった。さらに、早生まれの神経細胞の軸索と接触することで軸索形成が誘導されることを明らかにした。

軸索形成に関与する細胞外接着因子を同定するために、*In Utero* の系と Sh ノックダウン法を併用したスクリーニング系を立ち上げた。この系を用いて、細胞接着に関与することが報告されているコンタクチンファミリーや L1, NrCAM, NCAM をノックダウンしたところ、細胞接着分子 TAG-1 をノックダウンすることで軸索形成が阻害されることを見出した。詳細な形態解析をタイムラプスイメージング法を用いて行い、TAG-1 ノックダウン細胞では、多極性から双極性への移行ができないために軸索生成が抑制されることを明らかにした。さらにこれらの軸索生成

不全は野生型 TAG-1 の過剰発現でレスキューされた。次に TAG-1 の下流分子を検討した結果、低分子量 G タンパク質 Rac が関与していることを見出した。これらの結果は、神経細胞は発生過程で軸索を獲得する際、細胞接着分子 TAG-1 を介した Rac のシグナルが重要であることを示している。これらの研究成果は (難波ら, *Neuron*, 2014) で発表した。(図に、TAG-1 が誘導する軸索形成の様子を示す。論文雑誌 3 より改変)



(2) CaMKs の新規基質を同定するため、リン酸化プロテオミクス法を用いてスクリーニングを行った。その結果、多数のリン酸化基質が同定された。申請者らはその中でも低分子量 G タンパク質の GEF である ARHGEF2 に注目した。同定されたリン酸化サイトの検討を行い、CaMKI および CaMKII によって ARHGEF2 の N 末が有利にリン酸化されることを明らかにした。次に ARHGEF2 のリン酸化による局在変化を検討した結果、NMDA や KCl 刺激により CaMKs の活性化を誘導することで ARHGEF2 が微小管から遊離することを見出した。さらにこの遊離は ARHGEF2 の非リン酸化変異体で抑制された。これらの結果より、微小管からの遊離には、CaMKs によるリン酸化が関与していることを明らかにした。さらに CaMKs が ARHGEF2 の活性化に与える影響を検討した。ARHGEF2 はこれまでの報告より、低分子量 G タンパク質の 1 つである RhoA の GEF であることが明らかになっている。そこで、ヌクレオチドフリーの RhoA を用いて ARHGEF2 の GEF 活性を検討した。その結果、恒常活性化型 CaMKs と共発現させることで

ARHGEF2 の GEF 活性が上昇することを明らかにした。今後、さらなる解析を続け、細胞外因子によるカルシウムシグナルを介した細胞骨格制御機構を明らかにする必要があると考えられた。

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5件)

1. Takashi Namba, Yasuhiro Funahashi, Shinichi Nakamuta, Chundi Xu, Tetsuya Takano and Kozo Kaibuchi Extracellular and intracellular signaling for neuronal polarity. *Physiol Rev*, *in press* (2015). (査読あり)
2. Tomonari Hamaguchi, Shinichi Nakamuta, Yasuhiro Funahashi, Tetsuya Takano, Tomoki Nishioka, Shohag Md. Hasanuzzaman, Yoshimitsu Yura, Kozo Kaibuchi and Mutsuki Amano In vivo Screening for Substrates of Protein Kinase A using a combination of proteomic approaches and pharmacological modulation of kinase activity. *Cell Struct Funct*, 40, 1-12 (2014). (査読あり)
3. Yasuhiro Funahashi, Takashi Namba, Shinichi Nakamuta and Kozo Kaibuchi Neuronal polarization in vivo: Growing in a complex environment. *Curr Opin Neurobiol*, 27, 215-223 (2014). (査読あり)
4. Takashi Namba, Yuji Kibe, Yasuhiro Funahashi, Shinichi Nakamuta, Akiko Shimada, Sachi Kozawa, Mayumi Okamoto, Tomoyuki Masuda, Akira Sakakibara, Yasushi Shimoda, Michihiro Igarashi, Takaki Miyata, Catherine Faivre-Sarrailh, Kosei Takeuchi, Kozo Kaibuchi Pioneering axons regulate axon formation in the developing cerebral cortex. *Neuron*, 81, 814-829 (2014). (査読あり)
5. Yasuhiro Funahashi, Shin Fujisue, Norimichi Itoh, Shinichi Nakamuta, Katsuhiko Kato, Akiko Shimada, Chundi Xu, Wei Shan, Tomoki Nishioka, Takashi Namba, and Kozo Kaibuchi

ERK2-mediated phosphorylation of Par3 regulates neuronal polarization. *J Neurosci*, 33, 13270-13285 (2013). (査読あり)

[学会発表](計4件)

1. 中牟田 信一、永井 拓、西岡 朋生、天野 睦紀、西 昭徳、貝淵 弘三 Proteomic screening for substrates of protein kinases activated by dopamine stimulation 第57回日本神経化学学会大会 2014年9月29日「奈良県文化会館、奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)」
2. 中牟田 信一、永井 拓、西岡 朋生、天野 睦紀、西 昭徳、貝淵 弘三 Proteomic screening for substrates of protein kinases activated by dopamine stimulation Neuroscience 2014 2014年9月12日「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」
3. Nakamuta, S., Nagai, T., Nishioka, T., Amano, M., Nishi, A., and Kaibuchi, K. Proteomic screening for substrates of protein kinases activated by dopamine stimulation. Gordon Research Conference, Catecholamines, 2013年8月12-13日「West Dover (USA)」
4. 中牟田 信一、松島 彩乃、Sharmin Aktar、西岡 朋生、貝淵 弘三 Proteomic screening for calcium/calmodulin-dependent protein kinases substrates. Neuro2013、2013年6月20日、「京都国際会議場(京都府・京都市)」

[図書](計1件)

1. 中牟田 信一、難波 隆志、船橋 靖広、貝淵 弘三 神経軸索の制御メカニズム **第7巻 神経系**, 192 (44-69) (岡野 栄之・出澤真理 編) 朝倉書店 3章 (2013)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/Yakuri/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中牟田 信一 (NAKAMUTA, Shinichi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 20647474