

学位申請論文

cAMP により誘導される PKA と p190B の活性化が
細胞膜上の TC10 を不活性化し神経突起伸展を促進する

平成 30 年 3 月

東京理科大学 生命科学研究所 生命科学専攻

鯉沼 真吾

主査 中村岳史 教授

副査 北村大介 教授

副査 古市貞一 教授

副査 後飯塚僚 教授

副査 中野直子 准教授

1	表紙	1
2	目次	2~4
3	略語	5
4	要旨	6~7
5	研究の背景および目的	8~12
6	材料および方法	13~17
7	結果	18~24
	— PC12 細胞および Neuro2A 細胞における細胞膜上の TC10 活性は dbcAMP の添加後に急速に低下する	
	— cAMP による神経突起伸展は TC10 のノックダウンにより抑制される	
	— dbcAMP による TC10 の不活性化は PKA を介する	
	— PC12 および Neuro2A 細胞における細胞膜上の RhoA 活性は、dbcAMP 添加後 20~30 分以内に低下する	
	— cAMP により誘導される TC10 と RhoA の不活性化は p190B のノックダウンにより抑制される	

- p190A および p190B のノックダウンは、異なるメカニズムで cAMP による神経突起伸展を抑制する
- dbcAMP による TC10 不活性化は、STEF および Rac1 を介する

9 考察 25~28

10 引用文献 29~36

11 図表 37~59

- 図 1 脳の発生過程では神経突起の伸長が必要である
- 図 2 成長円錐の構造と神経突起伸展のメカニズム
- 図 3 神経突起伸展を制御する外部シグナル
- 図 4 小胞のエキソサイトーシスにおける TC10 の役割
- 図 5 TC10 の FRET センサー
- 図 6 TC10 による神経突起伸展促進のモデル
- 図 7 神経系および非神経細胞系における dbcAMP 添加後の細胞膜上の TC10 活性の時空間変化
- 図 8 dbcAMP 添加後の PC12 細胞と HeLa 細胞の形態変化
- 図 9 dbcAMP により誘導される PC12 細胞の神経突起伸長に対する TC10 ノックダウンの影響
- 図 10 dbcAMP による TC10 の不活性化に対する PKA と Epac の関与
- 図 11 神経および非神経系細胞における dbcAMP 添加後の細胞膜における RhoA 活性の時空間変化

- 図 12 Raichu-TC10 / K-RasCT および Raichu-RhoA / K-RasCT の FRET / CFP 比と p190A または p190B の発現レベルとの相関
- 図 13 p190A および p190B のノックダウンが dbcAMP による TC10 と RhoA の不活性化に及ぼす影響
- 図 14 PC12 細胞における dbcAMP による神経突起伸長に対する p190A または p190B のノックダウンの影響
- 図 15 dbcAMP 処理した PC12 細胞の F-アクチンの構造およびダイナミクスに対する p190A または p190B のノックダウンの影響
- 図 16 dbcAMP による TC10 不活性化に対する Rac1-N17 発現および STEF ノックダウンの影響
- 図 17 cAMP から TC10 の不活性化に至るシグナル伝達経路

略語

FRET: Förster resonance energy transfer

dbcAMP: dibutyryl-cAMP

GLUT4: glucose transporter type 4

Raichu: Ras and interacting protein chimeric unit

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GAP: GTPase activating protein

CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid

DIC: differential interference contrast (微分干渉)

IMD: intensity modulated display

NGF: nerve growth factor (神経成長因子)

PACAP: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド)

EGF: epidermal growth factor (上皮成長因子)

PPV: plasmalemmal precursor vesicle

PKA: protein kinase A

Epac: exchange protein directly activated by cAMP

STEF: Sif- and Tiam1-like exchange factor

ROS: reactive oxygen species (活性酸素種)

CFP: cyan fluorescent protein

YFP: yellow fluorescent protein

mTFP: monomeric teal fluorescent protein

SNARE: soluble NSF attachment protein receptor

要旨

本研究は神経突起伸展における膜付加制御のメカニズムの解明を目標に研究を行った。特に cAMP シグナルにより誘導される神経突起伸展における、膜輸送関連因子である Rho ファミリーG タンパク質 TC10 の膜付加制御の分子メカニズムに焦点を当てて解析した。

セカンドメッセンジャーとして知られる cAMP は神経突起伸展において重要な役割を果たす。神経突起伸展の過程では小胞輸送のシステムを用いて神経突起の先端に位置する成長円錐に膜成分が供給される。しかしながら、膜輸送の制御につながる cAMP シグナリングは多くの部分が不明である。Rho ファミリーG タンパク質である TC10 は、特定のタイプの小胞輸送に重要な役割を果たす。所属研究室の以前の研究で、ラット副腎褐色細胞腫由来の PC12 細胞の神経成長因子 (NGF) による神経突起伸長における TC10 の役割が明らかになった。そこで、神経突起伸展過程における cAMP と TC10 との間の機能的なつながりを解析した。まず cAMP による TC10 の活性変化を調べたところ、細胞膜上の TC10 活性は cAMP 添加後に急激に減少した。また、cAMP を添加した PC12 細胞では伸長する突起の先端部で特異的に TC10 が不活性化されることがわかった。次に cAMP による神経突起伸展における TC10 ノックダウンの影響を検討した。TC10 をノックダウンした PC12 細胞では cAMP による神経突起伸長が強く抑制された。この TC10 のノックダウンによる神経突起伸展の抑制は野生型の TC10 を発現させることでレスキューできるが、恒常活性型変異体の TC10 の発現ではレスキューできなかった。このことは「細胞膜近傍での TC10 の GTP 加水分解が小胞融合を促進することによって神経突起伸展を促進する」というモデルを支持している。さらに、PC12 細胞における cAMP から TC10 の不活性化に至るシグナル伝達経路を解析した。複数の手法により cAMP による TC10 不活性化はセリンスレオニンキナーゼの PKA を介することがわかった。また TC10 だけでなく RhoA も cAMP により不活性化された。これらの分子の不活性化は p190A RhoGAP ではなく p190B RhoGAP を介することが明らかになった。また cAMP により p190B のみが細胞膜にリクルートされた。さらに Rac1 の GEF である STEF のノックダウンおよび Rac1-N17 の発現は、cAMP による TC10 不活性化を低下させた。以上の結果から、cAMP を加えた PC12 細胞では PKA-STEFA-Rac1-p190B 経路を介したシグナルにより、細胞膜上での

TC10 と RhoA の不活性化が起こり、その不活性化は cAMP による神経突起伸長に働くと結論づけた。

研究の背景と目的

神経突起伸展は神経ネットワークの形成や軸索再生において最も基本的なステップである

ヒトの脳には 1000 億個以上の神経細胞がある。これらの神経細胞がネットワークを形成することで記憶、学習、運動の制御などの高次機能を発揮する。神経ネットワークは一つ一つの神経細胞が軸索や樹状突起を伸ばして、他の細胞と接続することで形成される(図 1)。一度形成された神経ネットワークが損傷を受けて再生する際にも神経突起伸展が重要な役割を果たす。例えば哺乳類の末梢神経系の軸索は切断されると切断箇所から再び軸索を伸ばして元の組織へと接続する。このように神経突起伸展は脳の発生や軸索の再生において最も基本的な過程の一つであり、重要な役割を果たす。

神経突起伸展では成長円錐での細胞骨格の再編成と膜付加の 2 つが重要な役割を果たす

神経突起伸展は神経突起の先端に位置する成長円錐が前方に向かって移動することで行われる。成長円錐は運動性の高いアメーバ状の構造体で、外部環境からのシグナルによる軸索ガイダンスを中心的に行う。成長円錐は微小管が豊富なセントラルドメインとアクチンが豊富なペリフェラルドメインから構成される。この 2 つのドメインの境目はトランジションゾーンと呼ばれ、ミオシンが豊富に存在する (図 2A)。神経突起伸展の過程では、主に成長円錐において外部からのシグナルに応答した細胞骨格の再編成と膜の付加が起きており、この 2 つのプロセスが協調的に制御されることが重要であると考えられている (図 2B)。

成長円錐での膜付加は PPVs が細胞膜にエキソサイトーシスすることで行われる

神経突起伸展の過程では伸展する成長円錐で局所的に膜の表面積を急速に拡大する必要がある。この拡大に必要な膜の供給のかなりの部分は細胞体から運ばれてきたある種の輸送小胞による膜付加により行われる (Pfenninger, 2009)。膜輸送は神経突起の伸長方向の決定すなわち軸索ガイダンスにも重要であることが明らかにされつつある (Tojima & Kamiguchi, 2015; Wojnacki & Galli,

2016)。この膜付加は、主に plasmalemmal precursor vesicles (PPVs) と呼ばれる、比較的大型で電子密度が低くコートされていない小胞が成長円錐の細胞膜にエキソサイトーシスすることで行われると考えられている (Pfenninger, 2009; Pfenninger and Friedman, 1993; Ory and Gasman, 2011)。電子顕微鏡観察等のデータから、この PPVs は軸索のシャフトを運ばれてきた後、成長円錐のトランジションゾーン付近の細胞膜に融合するとされている (図 2A)。また、PPVs の細胞膜への融合機構は、シナプス小胞の融合機構とは異なることが報告されている (Futerman and Banker, 1996; Igarashi et al., 1996)。

神経突起伸展を制御する外部シグナル

神経突起伸展は様々な外部シグナルに制御されている。神経突起伸展に関わる代表的な外部シグナル分子として、神経栄養因子の一つである神経成長因子 (NGF) や、右脳と左脳をつなぐ軸索(交連線維)の形成に重要な役割を担っている Netrin、神経ホルモンとして多様な生理的役割をもつ下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)、成長円錐を退縮させる機能を持つことでよく知られるセマフォリンなどがある (Aoki et al., 2004, Nishiyama et al., 2003, Ogata et al., 2015, Zhou et al., 2008) (図 3)。例えば NGF はチロシンキナーゼ型受容体の一つである TrkA レセプターに結合し、PI3 キナーゼ - PIP3 - Vav2/Vav3 というシグナル経路を介してアクチン骨格のレギュレーターである Rho ファミリーG タンパク質の Rac1 や Cdc42 を活性化する (Aoki et al., 2004)。活性化した Rac1 や Cdc42 は細胞骨格の再編成を制御し、神経突起伸展を正に制御する。Netrin は受容体である Deleted in colorectal cancer (DCC) に結合し、cAMP の産生を促す (Nishiyama et al., 2003)。PACAP は G タンパク質共役型受容体に結合し、Gs を介してアデニル酸シクラーゼを活性化してセカンドメッセンジャーである cAMP の細胞内レベルを上昇させる (Ogata et al., 2015)。cAMP はセリンスレオニンキナーゼの一つである PKA と直接結合し PKA を活性化せる。活性化した PKA は Rac1 の GDP/GTP 交換因子(GEF)である STEF/Tiam2 をリン酸化し、それにより Rac1 を活性化させる (Goto et al., 2011)。セマフォリンの主な受容体はプレキシシンである。プレキシシン A は細胞膜直下のドメインに RacGEF の一つである FARP2 が結合し、Rac1 を活性化させることで神経突起伸展を促進する。プレキシシン B はカルボキシル末端に RhoGEF が結

合し、Rho ファミリーG タンパク質の RhoA を活性化させる。活性化した RhoA は Rac1 や Cdc42 とは逆に突起伸展を負に制御する(Zhou et al., 2008)。

このように外部シグナルに応答した細胞骨格の再編成を制御するシグナル経路の理解は大きく進んだ。一方で、膜輸送の制御についてはまだ多くの部分が明らかになっていない。したがって、膜付加と細胞骨格の再編成を結びつけるメカニズムについても未知の部分が多い。

Rho ファミリーG タンパク質である TC10 はエキソサイトーシスを制御することで神経突起伸展を促進する。

TC10 は Rho ファミリーに属する低分子量 G タンパク質の一つであり、Cdc42 と特に近い関係にありエフェクターの一部を共有している。Rho ファミリーの多くは細胞骨格の制御に関わるが TC10 は膜輸送及び神経突起伸展での機能が広く知られている (Bodrikov, Solis, & Stuermer, 2011; Dupraz et al., 2009; Fujita et al., 2013; Pommereit & Wouters, 2007)。低分子量 G タンパク質は GTP 結合型 (活性型) と GDP 結合型 (不活性型) の間を行き来することで、細胞内シグナルを伝達する分子スイッチとして働く。この活性の転換は GDP/GTP 交換因子 (GEF) と GTP アーゼ活性化因子 (GAP) によって行われる。活性型の低分子量 G タンパク質は特定のエフェクター分子と結合し、それにより下流にシグナルが流れる。TC10 は小胞、細胞膜、細胞質に存在する (Fujita et al., 2013, Kawase et al., 2006)。これまでの解析により、TC10 は GLUT4 (Chiang et al., 2001; Saltiel and Pessin, 2002)、AMPA 受容体 (Cuadra et al., 2004)、CFTR (Cheng et al., 2005) などといった膜タンパク質を載せた小胞のエキソサイトーシスに関与することが明らかにされている。小胞のエキソサイトーシスは主に輸送、繫留そして融合のステップに分けられ、TC10 は特に繫留のステップに関与するとされている (図 4)。繫留においては 8 個のコンポーネントからなるエクソシスト繫留複合体が中心的に働いている (EauClaire and Guo, 2003)。エクソシスト複合体のコンポーネントの一つである Exo70 (TerBush et al., 1996) は、TC10 のエフェクターであり (Inoue et al., 2003), 小胞と細胞膜に存在する (Fujita et al., 2013; Michelson et al., 2001)。TC10 の機能を明らかにするためには、TC10 の時空間的な活性分布を知ることが特に重要であると考えられる。所属研究室では、以前、TC10 の活性を可視化するために Förster

resonance energy transfer (FRET) の原理に基づく 2 つのセンサーを作製した (図 5)。1 つはセンサーのカルボキシル末端に TC10 の脂質修飾部位を付加し、センサーが TC10 と同じ細胞内局在をとるように設計したもの。もう一つはセンサーのカルボキシル末端に K-Ras の脂質修飾部位を付加し、センサーが細胞膜に存在するように設計したものである。これらの 2 つのセンサーを用いて、EGF で刺激した HeLa 細胞において、小胞が細胞膜に融合する 0.2–0.4 秒前に TC10 の活性が低下することを明らかにした (Kawase et al., 2006)。この細胞膜近傍での TC10 の不活性化は EGF による Rac1 の活性化とそれに続く NADPH オキシダーゼによる活性酸素種 (ROS) の産生、p190A RhoGAP の活性化により引き起こされることがわかった。この TC10 の不活性化は小胞が細胞膜へ融合するのに必要である。これらの知見をもとにして、私を含むグループの最近の研究により、TC10 が神経突起伸展を促進するメカニズムとして、「TC10 活性は細胞膜よりも小胞で高く、小胞上の活性型 TC10 はそこで Exo70 と結合する。エクソシスト複合体により TC10 陽性小胞が細胞膜に繫留される一方で、外部刺激により細胞膜付近で TC10 が不活性化され、それが小胞の膜融合を開始する」というモデルを提案して、神経成長因子 (NGF) による突起伸展の系でそのモデルを実証した (Fujita, Koinuma et al., 2013) (図 6)。また、NGF による TC10 の不活性化が、EGF と同様に、Rac1-ROS- p190A RhoGAP を介することを確認した。p190A RhoGAP が RhoA の GAP でもあることから、NGF で刺激した神経細胞では TC10 と同時に RhoA も不活性化しアクチン線維が緩むことで神経突起伸展を促進しているのではないかと考えられる。神経突起伸展を誘導する外部刺激には様々なものがあることを考えると、このような細胞膜と細胞骨格の協調的な制御がどの程度の神経細胞で行われているかは重要な問題であるだろう。

cAMP は神経突起伸展および軸索再生の強力な促進因子である

セカンドメッセンジャーとして知られる cAMP は神経突起の伸長を促進する働きがあることは古くから知られている (Richter-Landsberg and Jastorff, 1986; Rydel and Greene, 1988)。近年では成長円錐の形態変化や軸索ガイダンスにおいても、下流の protein kinase A (PKA) や Rap1 の GEF の一つである exchange protein directly activated by cAMP (Epac) を介したシグナル伝達により重要な働きをしている (Zheng et al., 1994; Piper et al., 2007)。また、中枢

神経系では神経細胞内部の cAMP レベルが幼弱期から成体になる過程で低下するのと平行して神経軸索の再生能も低下することが以前から報告されており、cAMP と軸索再生の間に何らかの関係があることが予想されていた。2002 年に Neumann らのグループが「脊髄損傷モデルにおいて dbcAMP を損傷部に添加することにより軸索再生が劇的に促進された」という報告を行い (Neumann et al., 2002)、以後、cAMP の軸索再生促進能は、基礎研究にとどまらず臨床的なツールとしての可能性が注目されるようになっていく。TC10 もまた軸索の切断時に発現レベルが上昇することから軸索再生時の神経突起伸展に関与している (Erschbamer et al., 2005, Tanabe et al., 2000)。これらのことから cAMP と TC10 の間には機能的なつながりがあるのではないかと考えられる。

本研究の目的

本研究では TC10 を基軸とした神経突起伸展における膜付加制御の分子メカニズムを解明することを研究の目的とした。特に cAMP により誘導される神経突起伸展において、cAMP により TC10 の活性が変化するのか、また変化するのであればどのようなメカニズムで活性変化が引き起こされるのかということに焦点を当てて解析を行った。TC10 の FRET センサーと RNA 干渉技術を組み合わせ、cAMP を添加した PC12 細胞において細胞膜上の TC10 と RhoA が同時に不活性化されること、この不活性化が PKA-Sif and Tiam1-like exchange factor (STEF)-Rac1-p190B 経路により引き起こされ、神経突起伸展に寄与することを明らかにした。また NGF と cAMP のどちらでも Rac1 は活性化し TC10 と RhoA を不活性化するが、これら 2 つの刺激はそれぞれ異なるシグナル伝達経路を介して TC10 と RhoA を不活性化することが分かった。

材料および方法

FRET バイオセンサー

Raichu-Rac1 / K-RasCT (1011x)は以下の構成要素からなる(Itoh et al., 2002) : YFP、スパーサー (Leu-Asp)、Pak1 の CRIB ドメイン (Ser-Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Gly-Thr)、Rac1、スパーサー (Gly-Gly-Arg)、CFP、スパーサー (Gly-Arg-Ser-Arg)、K-Ras の脂質修飾ドメイン。Raichu-TC10 / K-RasCT (1096kx) は 1011x を以下のように変更して作製した : YFP を Venus (より明るくなるように改変した YFP) に、Pak の CRIB ドメインを POSH の CRIB ドメインに、そして Rac1 を TC10 に入れ替えた (Kawase et al., 2006)。Raichu-RhoA / K-RasCT (1293x) は Rac1 のセンサーを以下のように組換えて作製した : Pak の CRIB ドメインを PKN の Rho 結合ドメインに、Rac1 を RhoA に組換えた (Yoshizaki et al., 2003)。これらのセンサーのカルボキシル末端には、K-Ras のカルボキシル末端領域 (K-RasCT) が存在し、それによって細胞膜に局在する。細胞質由来の過剰な蛍光シグナルは、観察したい領域のシグナル/ノイズ比を大きく低下させるが、K-RasCT を含むセンサーを使用することでこの問題を回避できる。

プラスミド

RNA ターゲッティングコンストラクトは pSUPER-puromycin ベクター (OligoEngine, Seattle, WA) を用いて作製した。TC10、PKA 触媒サブユニット α (PRKACA)、PKA 酵素サブユニット β (PRKACB)、Epac1、Epac2、および STEF に対するヌクレオチド配列は以下の通り :

5'-CTGTCTTCGACCACTACGCAGTCAGCGTC-3',

5'-GTGGTTTGCCACAACCTGAC-3'、5'-GGTTGAGGCTCCATTCATACC-3'、

5'-GGGGATCTGTGGTCTCATAACAG-3'、5'-GCCTTATCCCATCTTTCTA-3'、

5'-GGAGCTGCCTTTCTCACTTTA-3' (Fujita et al., 2013, Goto et al., 2011)。

pCXN2-5Myc-p190A (Kawase et al., 2006)、pAKAR3-3536NES (Komatsu et al., 2011)、pERedNLS-Rac1-S17N (Aoki et al., 2004) および

pCAGGS-Lifeact-mEGFP (Eiedl et al., 2008) は、松田道行教授 (京都大学) から恵与された。pFLAG-CMV2-p190B (Bustos et al., 2008) は Jeffery

Settleman 教授 (Harvard Medical School) から恵与された。全長ヒト TC10

(205 アミノ酸) およびその変異体をコードする cDNA に点突然変異を導入して si-RNA の影響を受けないように改変したものを pCAGGS に組込んだ。

pCAGGS-mCherry-K-RasCT は、K-RasCT を融合した mCherry タンパク質をコードする。

細胞、試薬、および抗体

PC12 細胞は、10%ウマ血清と 5%FBS を添加した RPMI 培地 (Life Technologies) を用いて培養した。ポリエチレンイミン (Sigma-Aldrich) でコーティングした 35 mm ガラスボトムディッシュ (Asahi Techno Glass) 上に細胞を撒いた。必要な場合は、さらにラミニン (Life Technologies) をコーティングした。木山博資教授 (名古屋大学) から恵与された Neuro2A 細胞は、10%FBS を含む DMEM / F-12 + GlutaMAX (Life Technologies) を用いて培養した。HeLa および COS-7 細胞は、10%FBS を含む DMEM 培地を用いて培養した。293-F 細胞 (Life Technologies) は FreeStyle 293 発現培地 (Life Technologies) で培養した。dbcAMP および PP2 は Calbiochem から購入した。ピューロマイシンおよび N6-ベンゾイルアデノシン-3'、5'-環状モノホスフェート (6-Bnz-cAMP) は Sigma-Aldrich から得た。8-パラ・クロロ・フェニル・チオ-2'-O-メチル-cAMP (007) は、Tocris Cookson から得た。アポシニン は東京化成工業 (Tokyo Chemical Industry) から購入した。Alexa Fluor 488 Phalloidin と 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) はそれぞれ Thermo Fisher Scientific と Dojindo から購入した。また本研究では以下の一次抗体を使用した：anti-p190A マウス mAb (1 : 1000 希釈、BD Biosciences)；anti-p190B マウス mAb (G-11, 1 : 1000 希釈、Santa Cruz Biotechnology)；anti-GAPDH ウサギポリクローナル抗体 (1 : 1000 希釈、Santa Cruz Biotechnology)；anti-TC10 ウサギポリクローナル抗体 (1 : 1000 希釈、Proteintech)。anti- β -tubulin マウスモノクローナル抗体 (1 : 1000 希釈、新井孝夫名誉教授から恵与) (Arai et al., 1988)。

RNA 干渉

p190A および p190B に対するステルス siRNA は、Life Technologies から購入した。ラット p190A mRNA を標的とする 25mer のヌクレオチド配列 (センス) は 5'-CCUCCCUGUCCAAAGAUCAUUCCAA-3'であり、ラット p190B

mRNA を標的とする 25 mer のヌクレオチド配列は 5'-UCCCAGAUGAUAGUCAGAAUCGAAU-3' である。PC12 細胞に、Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を使用して製造業者の説明書に従って 20 nM の siRNA をトランスフェクトし、72 時間のインキュベーション後に実験に使用した。

In Vitro Spectrofluorometry

トランスフェクションの 48 時間後、293-F 細胞を石英キュベットに移し、FP-750 分光計 (JASCO) を用いて 433nm の励起光を当てて蛍光スペクトルを得た。

神経突起伸長アッセイ

PC12 細胞に、pSUPER コンストラクトまたは siRNA を導入し、必要に応じて、2 µg/ml ピューロマイシンを添加して 2 日間培養した。神経突起伸長を 1mM dbcAMP で誘導し、0.1% BSA および 2 µg/ml ピューロマイシンを含有する RPMI 培地中で 48 時間培養した。その後、細胞を 3.7%ホルムアルデヒドで固定し、0.2% TritonX-100 で透過処理した。3% BSA を含むリン酸緩衝生理食塩水に 1 時間浸漬してブロッキングを行った後、サンプルを抗チューブリン抗体で一晩インキュベートした。次に Alexa Fluor 488 結合抗マウス IgG 二次抗体と DAPI (1:1000 希釈) で染色した。試料は、FV-1000 共焦点顕微鏡(Olympus) で観察し画像を得た。目視で状態が悪い細胞は観察から除いた。神経突起伸長の計測は、細胞体よりも長い神経突起を持つ細胞 (neurite bearing cell) の数の割合を算出した (Nakamura et al., 2002)。

タイムラプスイメージング

FRET センサーを発現する PC12 細胞を、0.1% BSA を含むフェノールレッド不含の DMEM / F-12 培地で 30 分間血清飢餓状態で培養し、次に dbcAMP を添加した。イメージング中の蒸発を防ぐために培地をミネラルオイル (Sigma-Aldrich) で覆った。Cool SNAP-HQ 冷却 CCD カメラ (Roper Scientific) 、オートフォーカスシステム (IX2-ZDC、オリンパス) および自動プログラム可能な XY ステージ (MD-XY30100T-Meta、シグマ光機) を備えた IX81 倒立顕微鏡 (Olympus) を用いて、1 回の実験で複数視野のタイムラプス画像を取得した。多色イメージングには以下のフィルターを使用した : FF01-438

/ 24-25 励起フィルター (Semrock) ; XF2034 (455DRLP) ダイクロイックミラー (オメガオプティカル)。2つの蛍光フィルター (シアン蛍光タンパク質 (CFP) の FF01-483 / 32-25 および FRET、Semrock の FF01-542 / 27-25)。光源は X-Cite 120LED (ルーメンダイナミクス) を用いて、プランアポクロマート 60×オイル対物レンズ (NA 1.4、オリンパス) で観察した。4×4 のビニング条件の下での露光時間は、CFP および FRET 画像を得る時は 200 ms、微分干渉コントラスト (DIC) 画像を得る時は 50 ms とした。MetaMorph ソフトウェア (Universal Imaging) を用いてバックグラウンドを除去した後、FRET / CFP 比画像を作成し、この画像を FRET 効率を表すものとして解析に用いた。

免疫染色および画像分析

細胞を 3.7%ホルムアルデヒドで固定し、0.2% TritonX-100 で透過処理した。3% BSA を含むリン酸緩衝生理食塩水に 1 時間浸漬した後、試料を一次抗体で一晩インキュベートし、次いで蛍光二次抗体 (Alexa Fluor 488 にコンジュゲートさせた) で 1 時間インキュベートした。サンプルは、FV-1000 共焦点顕微鏡で撮影した。p190A または p190B の細胞膜への局在の定量は、MetaMorph ソフトウェアを用いて以下のように行った : K-RasCT に融合した mCherry を細胞膜に局在させ、mCherry 陽性領域の輪郭を手で描いた。2 番目のアウトラインは、ソフトウェアのコマンドを使用して、最初のアウトラインの 5 ピクセル内側に描いた。3 番目のアウトラインは最初のアウトラインの 10 ピクセル内側に描いた。第 1 の輪郭と第 2 の輪郭の間の帯状の領域は細胞膜領域と見なし、第 2 の輪郭と第 3 の輪郭の間の帯状の領域を細胞質領域と見なして使用した。p190 の局在は、細胞膜領域の p190 シグナルを細胞質領域の p190 シグナルで割って正規化することで定量した。

定量的 RT-PCR

shRNA を発現する PC12 細胞からの全 RNA を RNeasy (Qiagen) を用いて抽出し、Transcriptor ファーストストランド cDNA 合成キット (Roche) を用いて cDNA 合成を行った。Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) および 7500 Fast Real-Time PCR システム (Applied Biosystems) を用いて定量的リアルタイム PCR を実施した (Nojima et al., 2011)。

統計分析

GraphPad PRISM (バージョン 5.04、GraphPad Software) を使用して一元配置 ANOVA を行った後、必要に応じて Dunnett または Bonferroni ポストホックテストを行った。

結果

PC12 細胞および Neuro2A 細胞における細胞膜上の TC10 活性は dbcAMP の添加後に急速に低下する

TC10 の FRET のセンサーを用いて、cAMP を加えた PC12 細胞における細胞膜上の TC10 活性の時空間変化を調べた (図 7A)。PC12 細胞は、ラット副腎褐色細胞腫由来で、神経細胞分化のモデルとしてよく用いられている。TC10 センサーは K-Ras の脂質修飾部位をつけることで細胞膜に特異的に存在させている。細胞内の cAMP レベルを上げるため、cAMP の膜透過型アナログである dibutyl cAMP (dbcAMP) を用いた。細胞膜上の FRET / CFP 比 (TC10 の活性を表す) は 1mM dbcAMP を添加した後、10 分以内に低下した (図 7C)。細胞膜上の TC10 の不活性化は、別の神経系の培養細胞株であるマウス神経芽細胞腫由来の Neuro2A 細胞でも同様に観察された (図 7D)。cAMP によって誘導される TC10 不活性化の時間変化の様子は、NGF 刺激した場合と類似しているが (Fujita et al., 2013)、一方でこの 2 つの刺激に対する空間的な TC10 活性の変化の間には大きな違いが存在した。NGF 刺激した PC12 細胞では、まず細胞全体で TC10 活性が低下したあと、突出した部位に限局した TC10 活性の低下が見られた。一方で、cAMP を添加した PC12 細胞における TC10 の不活性化は細胞全体で均一に生じた (図 7A)。次に、cAMP による TC10 の不活性化が非神経系の細胞でも起きるかどうかを調べた。ここで検討したヒト子宮頸部癌由来の HeLa 細胞 (図 7B および 7E) およびアフリカミドリザル腎臓由来の COS-7 細胞 (図 7F) の二つの非神経細胞株では、dbcAMP 添加後の細胞膜上の TC10 活性の変化は認められなかった。TC10 活性と神経突起形成との関連を探るために、dbcAMP により誘導される神経突起での TC10 活性の空間分布をさらに詳細に調べた。TC10 の活性は成長円錐の周辺部位で特に活性が低下し、中心部では比較的高いという傾向はあるものの、成長円錐全体で TC10 活性が低下した (図 7G)。次に TC10 の活性変化と細胞の形態変化について検討した。dbcAMP を添加した PC12 細胞では、細胞が一様に拡大していた (図 7A および 図 8)。これに対して dbcAMP を添加した HeLa 細胞では、顕著な形態変化は起きていなかった (図 7B および 図 8)。

cAMPによる神経突起伸長はTC10のノックダウンにより抑制される

次に cAMP により誘導される PC12 細胞の神経突起伸長に、TC10 が必要かどうかを調べた。TC10 のノックダウンには pac 遺伝子を含む shRNA 発現ベクターを使用し、ピューロマイシンを用いて shRNA 発現細胞を選択した。TC10 に対する shRNA が発現した細胞をイムノブロット法および定量的 RT-PCR 法を用いて解析したところ、タンパク質レベルでも mRNA レベルでも内在性 TC10 のレベルが 70%低下していた(図 9A および B)。shRNA 発現細胞を dbcAMP 存在下で 48 時間培養した後、抗チューブリン抗体で免疫染色し、神経突起を持つ細胞の割合を調べた。空の shRNA ベクターを導入した PC12 細胞の多くは、dbcAMP 添加後 48 時間以内に細胞体よりも長い神経突起を伸ばした(図 9C)。一方で TC10 をノックダウンした PC12 細胞では、cAMP により誘導される神経突起伸長が強く抑制された(図 9D)。図 9H は神経突起を有する細胞の割合を定量した結果を表している。コントロールでは、dbcAMP の存在下での神経突起を伸ばした細胞の割合は 63%であった。TC10 ノックダウン細胞では 7%まで低下した。shRNA 耐性の野生型 TC10 の発現により、神経突起伸長がレスキューできたことから(図 9E および 9H)。ここで得られた結果がオフターゲット効果によるものではないことがわかる。

神経突起伸長における TC10 の分子機能をさらに詳細に調べるために TC10 ノックダウン細胞に TC10 恒常活性型変異体または優勢劣性変異体を発現させ、その効果を検討した。TC10 をノックダウンした PC12 では、恒常活性型変異体である TC10-Q75L を発現させても cAMP による神経突起伸長の割合は回復しなかった(図 9F、9H)。これは、神経細胞の細胞膜付近の TC10 の GTP 加水分解(図 7)が、cAMP による神経突起伸長に必要であることを示唆している。さらに、TC10 の優勢劣性変異体である TC10-T31N もまた、TC10 ノックダウンによる神経突起伸長の抑制をレスキューすることができなかった(図 9G、H)。これは小胞へ Exo70 をリクルートすることができなくなっているためではないかと考えられる(Fujita et al., 2013, Kawase et al., 2006)。以上のことから、cAMP 添加後の細胞膜上の TC10 の GTP 加水分解は、NGF 刺激した PC12 細胞で得られた結果と同様に、成長円錐での小胞融合を促進することによって神経突起伸長を促進すると考えられる。

dbcAMP による TC10 の不活性化は PKA を介する

dbcAMP により誘導される TC10 の不活性化のメカニズムを明らかにするため、まずこの経路で働く cAMP 直下の因子が何であるかについて調べた。cAMP は主にセリンスレオニンキナーゼの PKA と Ras ファミリー G タンパク質の Rap1 の GEF のひとつである Epac を介して下流にシグナルを流すことが知られている。そこで PKA 特異的 cAMP アナログである 6-Bnz-cAMP (Christensen et al., 2003) と Epac 特異的 cAMP アナログである 007 (Enserink et al., 2002) の効果を検討した。6-Bnz-cAMP を添加した PC12 細胞では dbcAMP を添加したものと同様のタイムコースで TC10 の活性が低下した (図 10A 左)。6-Bnz-cAMP 処理後の FRET / CFP 比の最低値は、dbcAMP 処理細胞のその 86%であった (図 10A 右)。一方で 007 を添加した細胞では TC10 の活性変化が全く見られなかった。この結果は PKA や Epac のノックダウン実験でも裏付けられた。PKA と Epac に対する shRNA のノックダウン効率は以前に検討されている (Goto et al., 2011)。PKA の触媒サブユニットの 2 つのアイソフォームである PRKACA および PRKACB のダブルノックダウンにより、dbcAMP により誘導される TC10 不活性化が抑制された (図 10B 左)。PRKACA と PRKACB のダブルノックダウン細胞の FRET / CFP 比の最低値の低下は、コントロールの 30%であった (図 10B 右)。一方で Epac1 と 2 をダブルノックダウンした細胞ではコントロールと同じように TC10 の不活性化が見られた。これらの結果から PC12 細胞での dbcAMP 処理による TC10 の不活性化は PKA を介することがわかった。

EGF 刺激した HeLa 細胞や NGF 刺激した PC12 細胞では、Rac1-NADPH オキシダーゼ-ROS-p190A というシグナル経路を介して TC10 が不活性化される (Fujita et al., 2013, Kawase et al., 2006)。cAMP による TC10 の不活性化が NGF による不活性化と同様の経路によって起きる可能性を検証するために、ROS の産生阻害剤であるアポシニンを用いて、TC10 の不活性化に対する効果を調べた。図 10C にあるように、アポシニンを添加しても cAMP による TC10 の不活性化に影響は無かった。さらに、Src ファミリーキナーゼ阻害剤である PP2 の効果を検討したが、PP2 も dbcAMP による TC10 の不活性化に影響が無かった (図 10D)。これらの結果から、dbcAMP 処理による細胞膜上の TC10 の不活性化は NGF 刺激による不活性化とは異なる経路を介することがわかった。

PC12 および Neuro2A 細胞における細胞膜上の RhoA 活性は、dbcAMP 添加後 20～30 分以内に低下する

次に、cAMP による TC10 の不活性化を担う GEF または GAP を同定する手がかりを得るために、cAMP による RhoA の活性変化を調べた。RhoA の FRET センサーは TC10 のセンサーと同様に細胞膜に存在するようにデザインされている (Yoshizaki et al., 2003)。PC12 細胞における細胞膜上の RhoA 活性は、dbcAMP 添加後 20～30 分以内に低下した (図 11A、C)。RhoA の不活性化は Neuro2A 細胞でも観察された (図 11D)。cAMP 処理した神経系の培養細胞株における RhoA 活性の低下は、TC10 活性の低下より緩やかではあったものの、そのタイムコースはよく似ていた。そこで非神経系細胞株において、dbcAMP 添加後に RhoA 活性が低下するかどうかを検討した。HeLa 細胞 (図 11B、E) や COS-7 細胞 (図 11F) では、dbcAMP を添加しても顕著な RhoA の活性変化は見られなかった。これらの結果は、神経細胞において、RhoA を不活性化する GAP が TC10 も不活性化する可能性を示している。

cAMP により誘導される TC10 と RhoA の不活性化は p190B のノックダウンにより抑制される

これらのことを踏まえて p190A RhoGAP (以下 p190A) または p190B RhoGAP (以下 p190B) のノックダウンが cAMP による TC10 の不活性化に与える影響を調べた。p190A は NGF による TC10 の不活性化を担うことが私も加わったグループにより示されている (Fujita et al., 2013)。p190B は p190A と最も近い近縁分子であり、神経系においては p190A よりも多く存在することが報告されている (Matheson et al., 2006)。まず、これらの GAP が TC10 や RhoA を不活性化させることができるかどうかを検討した。Raichu-TC10 を発現する 293F 細胞に、p190A または p190B の発現プラスミドを 0.5、1、1.5 μg と量を変えて導入した。蛍光分光光度計を用いてこれらの細胞の蛍光プロファイルを取得して、各条件での FRET / CFP 比を求めた。RhoA についても同様の実験を行った。図 12 に示すように、p190A と p190B はどちらも Raichu-TC10 および Raichu-RhoA の FRET / CFP 比をプラスミドの量依存的に減少させた。したがって p190A と p190B は TC10 と RhoA の両方に対して GAP 活性を有することがわかった (図 12)。そこで p190A および p190B のノックダウンが cAMP による TC10 と RhoA の低下や神経突起伸展に及ぼす影響を検討した。p190A

と p190B に対する siRNA をそれぞれ 2 種類用意して、PC12 細胞におけるこれらの siRNA によるノックダウン効率をイムノブロットィング法により検討した。p190A に対しては siRNA-1 が、p190B に対しては siRNA2 がそれぞれ 80% のノックダウン効率を示したので、以降の実験にはこれらを使用した (図 13A、B)。次に、これらの siRNA を用いて、cAMP により誘導される TC10 の不活性化に対する p190A または p190B のノックダウンの影響を調べた。p190B をノックダウンした細胞では、コントロールに比べて TC10 活性の低下が 60% 減少した (図 13C)。一方で、p190A ノックダウン細胞における TC10 活性の減少は、コントロール細胞における TC10 活性の低下とほぼ同じレベルであった。ノックダウン効率を考慮にいと、これらのデータは p190B が dbcAMP による TC10 不活性化に中心的に関与する GAP であることを強く示唆している。さらに、cAMP による RhoA の不活性化に対する p190A または p190B のノックダウンの影響を調べた。p190B ノックダウン細胞における RhoA 活性の最低値は、コントロールの 52% であった (図 13D)。p190A ノックダウン細胞を使った実験での RhoA 活性の最低値は、コントロール細胞とほぼ同レベルであった。次に、cAMP を添加した細胞における TC10 / RhoA 不活性化への p190B の寄与が特異的であるかどうかを確認するために、dbcAMP による p190A または p190B の細胞膜へのリクルートを調べた (図 13E、F)。dbcAMP を添加していない PC12 細胞では p190A と p190B の両方が、主に細胞質に存在する。dbcAMP を添加に応答して、p190B のみが細胞膜に効率よくリクルートされた。

p190A および p190B のノックダウンは、異なるメカニズムで dbcAMP による神経突起伸展を抑制する

dbcAMP により誘導される PC12 細胞の神経突起伸展に対する p190A または p190B ノックダウンの影響を調べた。コントロール siRNA をトランスフェクトした PC12 細胞は、dbcAMP 添加後 48 時間以内に細胞体よりも長い神経突起を形成した (図 14A 左)。一方で、p190B をノックダウンさせた PC12 細胞では、神経突起伸長が顕著に抑制された (図 14A 右)。p190B ノックダウンの効果よりも小さいが、p190A のノックダウンも cAMP による神経突起伸展を抑制した (図 14A 中央)。神経突起を持つ細胞の割合をコントロールおよびノックダウン細胞で求めた (14B)。コントロールでは、dbcAMP の存在下で 70% の細胞が神経突起を持っていたのに対して、p190A ノックダウン細胞では 27% が、また p190B

ノックダウン細胞では16%のみがdbcAMPの存在下で神経突起を伸ばしていなかった。p190A ノックダウン細胞におけるcAMPによる神経突起伸長の減少(図14)は、TC10およびRhoAのcAMPによる不活性化がp190A ノックダウンにより抑制されるという結果と矛盾する(図13C、D)。しかしながら、このp190A ノックダウンの結果は、以下のようなp190Aとp190Bの作用点の違いによって説明できると考えている。p190A ノックダウン細胞では、細胞膜直下のアクチンネットワークが増加し、そのことが初期突起の形成を阻害すると考えられる。一方で、p190Bのノックダウンは、cAMPによるTC10/RhoA不活性化を妨げることによって神経突起伸長を阻害すると考えられる。この解釈は、以下の3つの実験結果により支持される。まず、生細胞のF-アクチンを可視化するプローブであるLifeact-EGFPを発現させたPC12細胞にdbcAMPを添加し、48時間のF-アクチンのタイムラプスイメージングを行って、細胞体からの初期突起形成イベントの数を調べた(図15A、B)。コントロールでは、神経突起の形成と崩壊の繰り返しが観察された。ただし、顕微鏡観察中はCO₂の供給を受けられないことや、連続した励起光の照射などの影響で、神経突起の安定した伸長はほとんど認められなかった。p190A ノックダウン細胞では、細胞体に顕著な細胞膜直下アクチンネットワークが存在し、イメージング中に神経突起がほとんど形成されなかった。p190B ノックダウン細胞では、神経突起が形成される頻度はコントロールとほとんど変わらなかった。次に、dbcAMPを加えていない状態でのファロイジン染色による細胞膜直下のアクチン線維の量を調べた。p190A ノックダウン細胞におけるF-アクチンシグナルは、コントロールおよびp190B ノックダウン細胞より明らかに増加していた(図15C)。最後に、dbcAMPを加えていない状態でのp190A ノックダウン細胞のRhoA活性を調べた。p190A ノックダウン細胞ではdbcAMP添加前のRhoA活性はコントロールより有意に高かったが、p190B ノックダウン細胞におけるRhoA活性レベルはほぼ同じレベルであった(図15D)。しかしながら、図13Cおよび13Dに示したように、p190AのノックダウンはcAMPによるTC10/RhoAの相対的な活性低下には影響しない。したがって、cAMPによるTC10およびRhoAの活性変化は、p190Aではなくp190Bが担っていると考えられる。これらの結果から、p190BがdbcAMPによるTC10およびRhoAの活性変化に関与すること、またp190BがdbcAMPにより誘導されるPC12細胞における神経突起伸長に重要な

役割を果たすと結論できる。

dbcAMP による TC10 不活性化は、STEF および Rac1 を介する

p190B は PKA リン酸化モチーフを有していないので、PKA と p190B とをつなぐ因子を検索した。図 13F において、dbcAMP の添加により p190B が細胞膜にリクルートされることを見出した。Bustos らは、活性型の Rac1 が p190B の中央に位置するドメインに直接結合することにより p190B を細胞膜にリクルートし、それによって p190B を活性化させることを報告している (Bustos et al., 2008)。そこで Rac1 の優勢劣性変異体である Rac1-N17 が dbcAMP 添加後の TC10 不活性化に及ぼす影響を調べた。図 16A にあるように Rac1-N17 は、dbcAMP による TC10 の不活性化を強く阻害した。所属研究室の以前の研究で、Rac1 の GEF である STEF が PKA によりリン酸化され活性化すること、またこの STEF の活性化が dbcAMP による Rac1 の活性化および神経突起伸長に重要であることを明らかにした (Goto et al., 2011)。そこで、PKA-STEF-Rac1-p190B という経路が dbcAMP による細胞膜上の TC10 の不活性化に関与している可能性があると考えた。予想どおり、shRNA (図 16B) による STEF のノックダウンにより、dbcAMP による TC10 不活性化が強く抑制された (図 16C)。以上のことから、PKA-STEF-Rac1-p190B 経路 (図 17A) が dbcAMP による TC10 の不活性化と神経突起伸長に重要であることが明らかになった。

考察

本研究では神経細胞株を用いて、cAMP によって誘導される細胞膜上の TC10 および RhoA の不活性化が、PKA-STEF-Rac1-p190B という経路によって媒介されることを明らかにした。このような TC10 と RhoA の同時の不活性化は、膜付加および F-アクチンの減少を介して協調的に神経突起伸長を促進すると考えられる。そのことは以下の結果により支持される。(i) cAMP の添加により PC12 と Neuro2A 細胞の細胞膜近傍において TC10 と RhoA の活性が低下した。また cAMP により誘導された PC12 細胞での神経突起伸展の際に、突起の先端で TC10 の活性が局所的に不活性化された。(ii) dbcAMP により誘導される TC10 不活性化は PKA によって媒介される。(iii) p190B のノックダウンにより、cAMP による TC10 と RhoA の不活性化が抑制され、また cAMP による PC12 細胞の神経突起伸長が抑制された。(v) dbcAMP による TC10 不活性化は、STEF および Rac1 を介していた。軸索/神経突起伸長における膜輸送と細胞骨格再編成の協調的な調節は、最近の総説で (Pfenninger, 2009; Wojnacki & Galli, 2016) その重要性が強調されている。本研究で明らかになった cAMP-PKA - STEF-Rac1-p190B-TC10/RhoA というシグナル伝達経路(図 17A) は、このような協調的制御のひとつを担っていると考えられる。

cAMP による TC10 の不活性化は非神経系の培養細胞株では起こらなかった。その理由は STEF や p190B の発現レベルが神経系と非神経系で異なることによるものであろう。STEF は主に脳の発生過程で発現しているという報告がある (Hoshino et al., 1999)。p190B も主に発生過程の脳や成体の脳で発現していることが報告されている (Matheson et al., 2006)。STEF と p190B が広範囲の神経系で発現していることから、TC10 と RhoA 活性の制御における PKA-STEF-Rac1-190B 経路が広い範囲の神経組織で使用されていることが示唆される。本研究では、HeLa や COS-7 細胞に dbcAMP を添加しても、細胞膜上の RhoA および TC10 の活性は変化しなかったが、以前の研究で、白血球接着や内皮細胞のバリアー制御を含むいくつかの非神経系細胞において cAMP により活性化された PKA は RhoA の活性化を抑制することが示されている (Qiao et al., 2003)。これらの違いを説明する一つの理由として、PKA による RhoA リン酸化が考えられる。RhoA は、PKA によりその脂質修飾部位に近い 188 番目のセリンがリン酸化される (Lang et al., 1996)。このリン酸化は RhoA への GEF

と GAP の結合や作用を阻害しないが、RhoGDI との相互作用を強化することによって RhoA の活性化を阻害すると報告されている (Ellerbroek et al., 2003)。本研究で用いた RhoA センサーは K-Ras のカルボキシル末端領域を含み、RhoGDI に結合しない (Yoshizaki et al., 2003)。したがって、このセンサーは、RhoA の 188 番目のセリンのリン酸化状態とは無関係に、RhoA に作用する GEF と GAP のバランスをモニターすることができる。PKA による TC10 のリン酸化は報告されておらず、またソフトによる解析でも TC10 には標準的な PKA リン酸化モチーフは見つからない。PKA による TC10 の直接的なリン酸化を考慮する必要が無いので、cAMP を添加した細胞における TC10 センサーを用いた TC10 活性のデータはそのまま、解釈することができる。

本研究で見出した、「p190A ではなく p190B が cAMP による TC10 や RhoA の不活性化を媒介する」という知見は、二つの p190 タンパク質間の細胞内機能の違いについて新たな知見を提供する。p190B の特異性は、活性化 Rac1 が p190B と相互作用し、それによってその GAP 活性を上昇させるというメカニズムによって説明することができる (Bustos et al., 2008)。同様に、Ponic らは三次元微小環境における管形成中の際に、p190A ではなく p190B が、RhoA 不活性化を媒介し、これは Rac1-GTP の p190B への特異的結合によって説明できると主張している (Ponic et al., 2013)。PC12 細胞において、cAMP による RhoA の不活性化への p190B ノックダウンの影響は、有意であったが大きくはなかった。これはおそらく神経細胞に豊富に存在する別の GAP が、cAMP による RhoA の不活性化を p190B とともに制御しているのではないかと考えられる。p190B をノックアウトしたマウスは体のサイズが 30%減少し (Sordella et al., 2002)、前脳交連の走行異常や側脳室の拡張などの神経発生における異常を示す (Matheson et al., 2006)。神経系における 2 つの p190 タンパク質の発現領域は類似しているが (Matheson et al., 2006, Brouns et al., 2000)、p190B ノックアウトマウスの表現型は p190A のノックアウトマウスとは異なる重大な異常が生じる (Matheson et al., 2006)。これらの結果は、p190A および p190B が異なる細胞シグナル伝達経路に関与するという考えと一致している。p190A および p190B ノックアウトマウス間に見られる神経組織の異常の違いを理解するためには、p190A と p190B についてさらなる比較を行う必要があるだろう。

私の所属する研究グループでは以前に NGF による TC10 の不活性化が、

Rac1-NADPH オキシダーゼ-ROS-p190A 経路によって媒介されることを示しており (Fujita et al., 2013)、本研究では cAMP により誘導される TC10 不活性化が PKA-STEF-Rac1-p190B によって媒介されることを明らかにした。この二つのシグナル伝達経路が互いに独立しているが、どちらのシグナル伝達経路においても Rac1 と TC10 が膜付加制御に重要であることがわかった(図 17)。このことから、この Rac1-TC10 経路は NGF や cAMP 以外の因子による神経突起伸展でも膜付加制御に関与しているのではないかと考えられる。その一方で、NGF 経路と cAMP 経路では Rac1 のシグナル経路が異なっている。この違いは、Rac1 が細胞内の局在によって異なる機能を発揮するという主張 (Heasman & Ridley, 2008) ならびに Rac1 自体への修飾によって説明できる (Hodge et al., 2016) 可能性がある。さらに、cAMP はリンパ系細胞株で NADPH オキシダーゼの活性化を阻害することが報告されている (Burkey et al., 1993)。この阻害により、cAMP シグナルを Rac1-p190B 経路を含む他の経路に変更させることができるのかもしれない。Bustos らは活性型 Rac1 が p190B を界面活性剤不溶性細胞膜画分にリクルートできることを示しているが (Bustos et al., 2008)、細胞外刺激に依存した Rac1-NADPH オキシダーゼ経路と Rac1-p190B 経路との区別がどのように行われるかを理解するためには、より詳細な研究が必要だろう。

本研究では所属研究室が提案した「小胞上の TC10 が細胞膜近傍で不活性化することで膜融合を促進し、それにより神経突起伸展を正に制御する」というモデル(図 6)が cAMP による神経突起伸展の系にも拡張できることを示した(図 8A、図 9)。このモデルで提案しているように、小胞上の TC10 が細胞膜近傍で不活性化するためには、まず小胞上の TC10 の活性化が必要である。所属研究室の以前の研究で、HeLa 細胞において TC10 の活性は小胞、ゴルジ体、細胞膜の順で高いことを示した (Kawase et al., 2006)。また NGF で刺激した PC12 細胞においても TC10 活性は細胞膜よりも小胞で高いことがわかっている (Fujita et al., 2013)。ゴルジ体よりも小胞で活性が高いことを考慮すると、小胞がゴルジ体から出芽する際に TC10 の GEF が小胞にリクルートされ、小胞上の TC10 の活性を上昇させると考えられる。Kawase らは複数の GEF が TC10 のセンサーに応答することを示しており (Kawase et al., 2006)、このような GEF の中で TC10 陽性小胞に存在するものが TC10 の GEF の候補であると考えられ

るが、現時点ではデータは得られていない。小胞上での TC10 の活性化が外部シグナルによるものか、または外部刺激に非依存的に引き起こされるのかどうかといった問題も含め、小胞上の TC10 の活性化メカニズムの解明は今後の重要な課題である。

TC10 は、インスリンによる GLUT4 の再提示 (Saltiel et al., 2002)、神経突起/軸索伸長 (Dupraz et al., 2009, Fujita et al., 2013)、抑制性シナプスの神経伝達 (Mayer et al., 2013) などの様々な生理学的機能の分子基盤として働いていることが明らかにされてきた。しかしながら今日まで TC10 機能の解析のほとんど全ては細胞レベルで行われてきたもので、今後は本研究を含む細胞レベルでの実験から予測されるような TC10 の個体レベルの機能を解明することが期待される。私の所属するグループでは以前に TC10 の FRET センサーを開発し、様々なイメージング技術を用いて TC10 の活性を可視化した (Fujita et al., 2013, Kawase et al., 2006)。動物を用いた個体レベルの研究と高度なイメージング技術を組み合わせ、脳の高次機能の分子基盤として働く TC10 の分子メカニズムを明らかできると期待できる。

引用文献

- Aoki,K., Nakamura,T., and Matsuda,M. (2004). Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 713-719.
- Aoki,K., Nakamura,T., Fujikawa,K., and Matsuda,M. (2005). Local phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation recruits Vav2 and Vav3 to activate Rac1/Cdc42 and initiate neurite outgrowth in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2207-2217.
- Aoki,S., Su,Q., Li,H., Nishikawa,K., Ayukawa,K., Hara,Y., Namikawa,K., Kiryu-Seo,S., Kiyama,H., and Wada,K. (2002). Identification of an axotomy-induced glycosylated protein, AIGP1, possibly involved in cell death triggered by endoplasmic reticulum-Golgi stress. *J. Neurosci.* *22*, 10751-10760.
- Arai,T. and Matsumoto,G. (1988). Subcellular localization of functionally differentiated microtubules in squid neurons: regional distribution of microtubule-associated proteins and beta-tubulin isotypes. *J. Neurochem.* *51*, 1825-1838.
- Bearce,E.A., Erdogan,B., and Lowery,L.A. (2015). TIPsy tour guides: how microtubule plus-end tracking proteins (+TIPs) facilitate axon guidance. *Front Cell Neurosci.* *9*, 241.
- Bodrikov,V., Solis,G.P., and Stuermer,C.A. (2011). Prion protein promotes growth cone development through reggie/flotillin-dependent N-cadherin trafficking. *J. Neurosci.* *31*, 18013-18025.
- Bos,J.L. (2006). Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 680-686.
- Brouns,M.R., Matheson,S.F., Hu,K.Q., Delalle,I., Caviness,V.S., Silver,J., Bronson,R.T., and Settleman,J. (2000). The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development* *127*, 4891-4903.

Burkey, T.H. and Webster, R.O. (1993). Adenosine inhibits fMLP-stimulated adherence and superoxide anion generation by human neutrophils at an early step in signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* *1175*, 312-318.

Bustos, R.I., Forget, M.A., Settleman, J.E., and Hansen, S.H. (2008). Coordination of Rho and Rac GTPase function via p190B RhoGAP. *Curr. Biol.* *18*, 1606-1611.

Christensen, A.E., Selheim, F., de, R.J., Dremier, S., Schwede, F., Dao, K.K., Martinez, A., Maenhaut, C., Bos, J.L., Genieser, H.G., and Doskeland, S.O. (2003). cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J. Biol. Chem.* *278*, 35394-35402.

Dupraz, S., Grassi, D., Bernis, M.E., Sosa, L., Bisbal, M., Gastaldi, L., Jausoro, I., Caceres, A., Pfenninger, K.H., and Quiroga, S. (2009). The TC10-Exo70 complex is essential for membrane expansion and axonal specification in developing neurons. *J. Neurosci.* *29*, 13292-13301.

Ellerbroek, S.M., Wennerberg, K., and Burridge, K. (2003). Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J. Biol. Chem.* *278*, 19023-19031.

Enserink, J.M., Christensen, A.E., de, R.J., van, T.M., Schwede, F., Genieser, H.G., Doskeland, S.O., Blank, J.L., and Bos, J.L. (2002). A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat. Cell Biol.* *4*, 901-906.

Erschbamer, M.K., Hofstetter, C.P., and Olson, L. (2005). RhoA, RhoB, RhoC, Rac1, Cdc42, and Tc10 mRNA levels in spinal cord, sensory ganglia, and corticospinal tract neurons and long-lasting specific changes following spinal cord injury. *J. Comp Neurol.* *484*, 224-233.

Fimia, G.M. and Sassone-Corsi, P. (2001). Cyclic AMP signalling. *J. Cell Sci.* *114*, 1971-1972.

Fujita, A., Koinuma, S., Yasuda, S., Nagai, H., Kamiguchi, H., Wada, N., and Nakamura, T. (2013). 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.

Goto,A., Hoshino,M., Matsuda,M., and Nakamura,T. (2011). Phosphorylation of STEF/Tiam2 by protein kinase A is critical for Rac1 activation and neurite outgrowth in dibutyryl cAMP-treated PC12D cells. *Mol. Biol. Cell* *22*, 1780-1790.

Hall,A. and Lalli,G. (2010). Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a001818.

Hodge,R.G. and Ridley,A.J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 496-510.

Hoshino,M., Sone,M., Fukata,M., Kuroda,S., Kaibuchi,K., Nabeshima,Y., and Hama,C. (1999). Identification of the stef gene that encodes a novel guanine nucleotide exchange factor specific for Rac1. *J. Biol. Chem.* *274*, 17837-17844.

Itoh,R.E., Kurokawa,K., Ohba,Y., Yoshizaki,H., Mochizuki,N., and Matsuda,M. (2002). Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol. Cell Biol.* *22*, 6582-6591.

Jeon,C.Y., Moon,M.Y., Kim,J.H., Kim,H.J., Kim,J.G., Li,Y., Jin,J.K., Kim,P.H., Kim,H.C., Meier,K.E., Kim,Y.S., and Park,J.B. (2012). Control of neurite outgrowth by RhoA inactivation. *J. Neurochem.* *120*, 684-698.

Kanzaki,M., Watson,R.T., Hou,J.C., Stamnes,M., Saltiel,A.R., and Pessin,J.E. (2002). Small GTP-binding protein TC10 differentially regulates two distinct populations of filamentous actin in 3T3L1 adipocytes. *Mol. Biol. Cell* *13*, 2334-2346.

Kawase,K., Nakamura,T., Takaya,A., Aoki,K., Namikawa,K., Kiyama,H., Inagaki,S., Takemoto,H., Saltiel,A.R., and Matsuda,M. (2006). GTP hydrolysis by the Rho family GTPase TC10 promotes exocytic vesicle fusion. *Dev. Cell* *11*, 411-421.

- Komatsu,N., Aoki,K., Yamada,M., Yukinaga,H., Fujita,Y., Kamioka,Y., and Matsuda,M. (2011). Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol. Biol. Cell* *22*, 4647-4656.
- Lalli,G. (2014). Regulation of neuronal polarity. *Exp. Cell Res.* *328*, 267-275.
- Lang,P., Gesbert,F., Delespine-Carmagnat,M., Stancou,R., Pouchelet,M., and Bertoglio,J. (1996). Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* *15*, 510-519.
- Laudanna,C., Campbell,J.J., and Butcher,E.C. (1997). Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants. *J. Biol. Chem.* *272*, 24141-24144.
- Lee,J.K., Geoffroy,C.G., Chan,A.F., Tolentino,K.E., Crawford,M.J., Leal,M.A., Kang,B., and Zheng,B. (2010). Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo⁻, MAG⁻, and OMgp-deficient mice. *Neuron* *66*, 663-670.
- Lin,R., Bagrodia,S., Cerione,R., and Manor,D. (1997). A novel Cdc42Hs mutant induces cellular transformation. *Curr. Biol.* *7*, 794-797.
- Mar,F.M., Bonni,A., and Sousa,M.M. (2014). Cell intrinsic control of axon regeneration. *EMBO Rep.* *15*, 254-263.
- Mayer,S., Kumar,R., Jaiswal,M., Soykan,T., Ahmadian,M.R., Brose,N., Betz,H., Rhee,J.S., and Papadopoulos,T. (2013). Collybistin activation by GTP-TC10 enhances postsynaptic gephyrin clustering and hippocampal GABAergic neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *110*, 20795-20800.
- Michaelson,D., Silletti,J., Murphy,G., D'Eustachio,P., Rush,M., and Philips,M.R. (2001). Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J. Cell Biol.* *152*, 111-126.
- Nakamura,T., Komiya,M., Sone,K., Hirose,E., Gotoh,N., Morii,H., Ohta,Y., and Mori,N. (2002). Grit, a GTPase-activating protein for the Rho family,

regulates neurite extension through association with the TrkA receptor and N-Shc and CrkL/Crk adapter molecules. *Mol. Cell Biol.* *22*, 8721-8734.

Nakamura,T., Takeuchi,K., Muraoka,S., Takezoe,H., Takahashi,N., and Mori,N. (1999). A neurally enriched coronin-like protein, ClipinC, is a novel candidate for an actin cytoskeleton-cortical membrane-linking protein. *J. Biol. Chem.* *274*, 13322-13327.

Nakamura,T., Takeuchi,K., Muraoka,S., Takezoe,H., Takahashi,N., and Mori,N. (1999). A neurally enriched coronin-like protein, ClipinC, is a novel candidate for an actin cytoskeleton-cortical membrane-linking protein. *J. Biol. Chem.* *274*, 13322-13327.

Neumann,S., Bradke,F., Tessier-Lavigne,M., and Basbaum,A.I. (2002). Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron* *34*, 885-893.

Neumann,S., Bradke,F., Tessier-Lavigne,M., and Basbaum,A.I. (2002). Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron* *34*, 885-893.

Nimnual,A.S., Taylor,L.J., and Bar-Sagi,D. (2003). Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biol.* *5*, 236-241.

Nishiyama,M., Hoshino,A., Tsai,L., Henley,J.R., Goshima,Y., Tessier-Lavigne,M., Poo,M.M., and Hong,K. (2003). Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* *423*, 990-995.

Nishiyama,M., Hoshino,A., Tsai,L., Henley,J.R., Goshima,Y., Tessier-Lavigne,M., Poo,M.M., and Hong,K. (2003). Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* *423*, 990-995.

Nojima,T., Haniuda,K., Moutai,T., Matsudaira,M., Mizokawa,S., Shiratori,I., Azuma,T., and Kitamura,D. (2011). In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. *Nat. Commun.* *2*, 465.

Ogata,K., Shintani,N., Hayata-Takano,A., Kamo,T., Higashi,S., Seiriki,K., Momosaki,H., Vaudry,D., Vaudry,H., Galas,L., Kasai,A., Nagayasu,K., Nakazawa,T., Hashimoto,R., Ago,Y., Matsuda,T., Baba,A., and Hashimoto,H. (2015). PACAP enhances axon outgrowth in cultured hippocampal neurons to a comparable extent as BDNF. *PLoS. One.* *10*, e0120526.

Ory,S. and Gasman,S. (2011). Rho GTPases and exocytosis: what are the molecular links? *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 27-32.

Pfenninger,K.H. (2009). Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 251-261.

Pfenninger,K.H. and Friedman,L.B. (1993). Sites of plasmalemmal expansion in growth cones. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *71*, 181-192.

Piper,M., van,H.F., and Holt,C. (2007). The role of cyclic nucleotides in axon guidance. *Adv. Exp. Med. Biol.* *621*, 134-143.

Pommereit,D. and Wouters,F.S. (2007). An NGF-induced Exo70-TC10 complex locally antagonises Cdc42-mediated activation of N-WASP to modulate neurite outgrowth. *J. Cell Sci.* *120*, 2694-2705.

Ponik,S.M., Trier,S.M., Wozniak,M.A., Eliceiri,K.W., and Keely,P.J. (2013). RhoA is down-regulated at cell-cell contacts via p190RhoGAP-B in response to tensional homeostasis. *Mol. Biol. Cell* *24*, 1688-3.

Qiao,J., Huang,F., and Lum,H. (2003). PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* *284*, L972-L980.

Qiu,J., Cai,D., Dai,H., McAtee,M., Hoffman,P.N., Bregman,B.S., and Filbin,M.T. (2002). Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* *34*, 895-903.

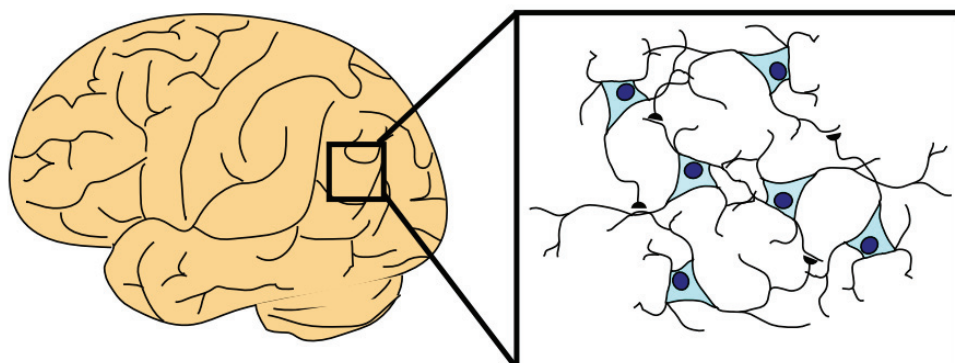
Riedl,J., Crevenna,A.H., Kessenbrock,K., Yu,J.H., Neukirchen,D., Bista,M., Bradke,F., Jenne,D., Holak,T.A., Werb,Z., Sixt,M., and Wedlich-Soldner,R. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* *5*, 605-607.

- Saltiel,A.R. and Pessin,J.E. (2003). Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. *Traffic*. *4*, 711-716.
- Shelly,M., Lim,B.K., Cancedda,L., Heilshorn,S.C., Gao,H., and Poo,M.M. (2010). Local and long-range reciprocal regulation of cAMP and cGMP in axon/dendrite formation. *Science* *327*, 547-552.
- Sordella,R., Classon,M., Hu,K.Q., Matheson,S.F., Brouns,M.R., Fine,B., Zhang,L., Takami,H., Yamada,Y., and Settleman,J. (2002). Modulation of CREB activity by the Rho GTPase regulates cell and organism size during mouse embryonic development. *Dev. Cell* *2*, 553-565.
- Tanabe,K., Tachibana,T., Yamashita,T., Che,Y.H., Yoneda,Y., Ochi,T., Tohyama,M., Yoshikawa,H., and Kiyama,H. (2000). The small GTP-binding protein TC10 promotes nerve elongation in neuronal cells, and its expression is induced during nerve regeneration in rats. *J. Neurosci.* *20*, 4138-4144.
- Tojima,T. and Kamiguchi,H. (2015). Exocytic and endocytic membrane trafficking in axon development. *Dev. Growth Differ.* *57*, 291-304.
- Wang,Y., Botvinick,E.L., Zhao,Y., Berns,M.W., Usami,S., Tsien,R.Y., and Chien,S. (2005). Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* *434*, 1040-1045.
- Wojnacki,J. and Galli,T. (2016). Membrane traffic during axon development. *Dev. Neurobiol.* *76*, 1185-1200.
- Yoshizaki,H., Ohba,Y., Kurokawa,K., Itoh,R.E., Nakamura,T., Mochizuki,N., Nagashima,K., and Matsuda,M. (2003). Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J. Cell Biol.* *162*, 223-232.
- Yoshizaki,H., Ohba,Y., Kurokawa,K., Itoh,R.E., Nakamura,T., Mochizuki,N., Nagashima,K., and Matsuda,M. (2003). Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J. Cell Biol.* *162*, 223-232.

Zheng,J.Q., Zheng,Z., and Poo,M. (1994). Long-range signaling in growing neurons after local elevation of cyclic AMP-dependent activity. *J. Cell Biol.* *127*, 1693-1701.

Zhou,Y., Gunput,R.A., and Pasterkamp,R.J. (2008). Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem. Sci.* *33*, 161-170.

A



B

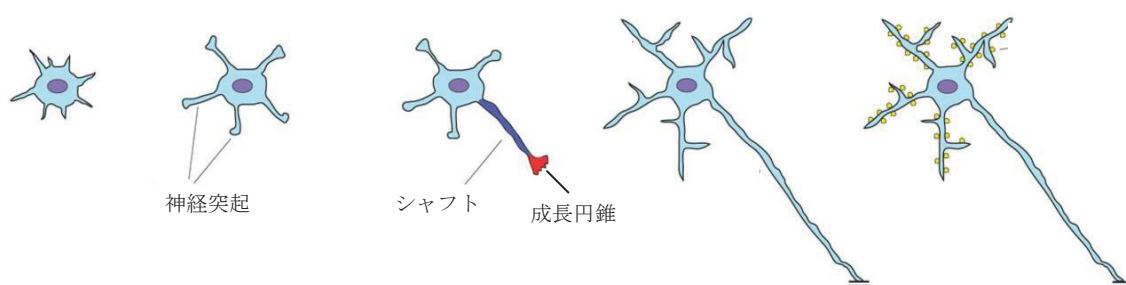


図 1. 脳の発生過程では神経突起の伸長が必要である

(A) ヒトの脳には 1000 億個以上の神経細胞があり、これらの細胞がネットワークを形成することで高次機能を発揮する。神経ネットワークは神経細胞一つ一つが神経突起をつなぐことで形成される。(B) 未分化の神経細胞は突起を乏しい球状の細胞である。発生過程で神経細胞に分化すると神経突起を形成し、他の細胞に向けて神経突起を伸ばす。神経突起の先端の扇状の構造のことを成長円錐と呼び、成長円錐と細胞体の中の細長い構造をシャフトと呼ぶ (Lalli G., 2012 図 1 を一部改変)。

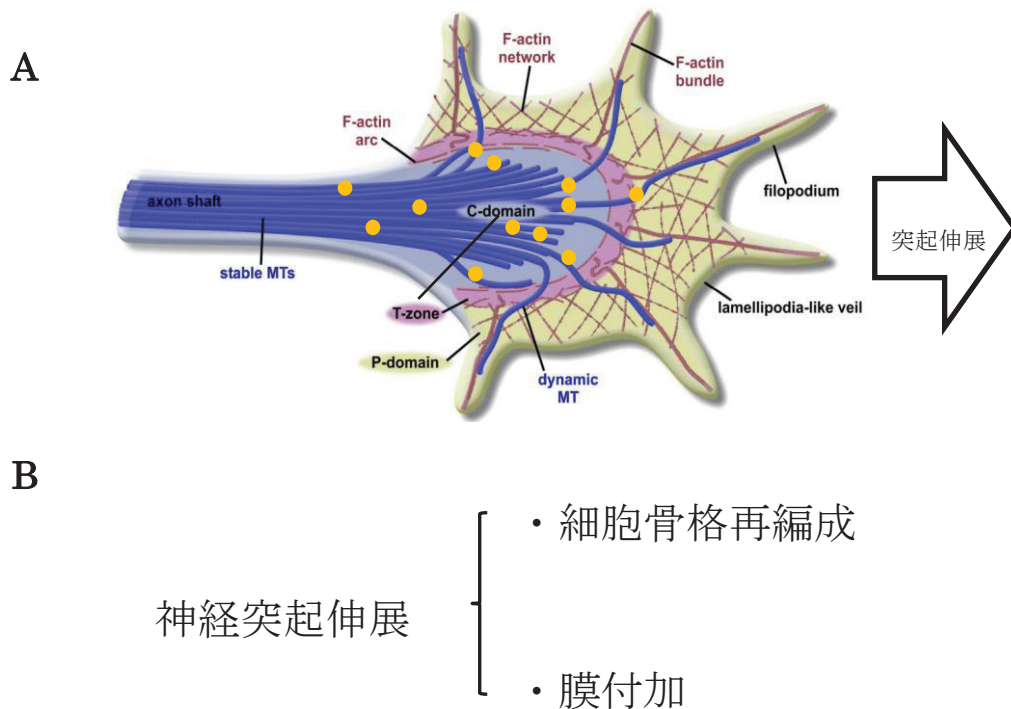


図 2. 成長円錐の構造と神経突起伸展のメカニズム

(A) 神経突起伸展は神経突起の先端にある成長円錐が前方に移動することで行われる。伸展に必要な膜は、PPVs (plasmalemmal precursor vesicles) がエキソサイトーシスされることによって供給される。小胞は微小管上を移動し、成長円錐のトランジションゾーン (T-zone) まで運ばれる。T-zone を境界として、内側に多くの微小管が束になっているセントラルドメイン (C-domain) があり、外側に多くのアクチンフィラメントが集まりラメリポディアやフィロポディア構造を形成しているペリフェラルドメイン (P-domain) がある (Bearce et al., 2015 の図 1 を一部改変)。P-domain は C-domain に比べて動的であり、外部の刺激を受け取り、伸展と収縮を繰り返している (Pfenninger., 2009,)。 (B) 神経突起伸展の実体は細胞骨格の再編成と膜の付加である。

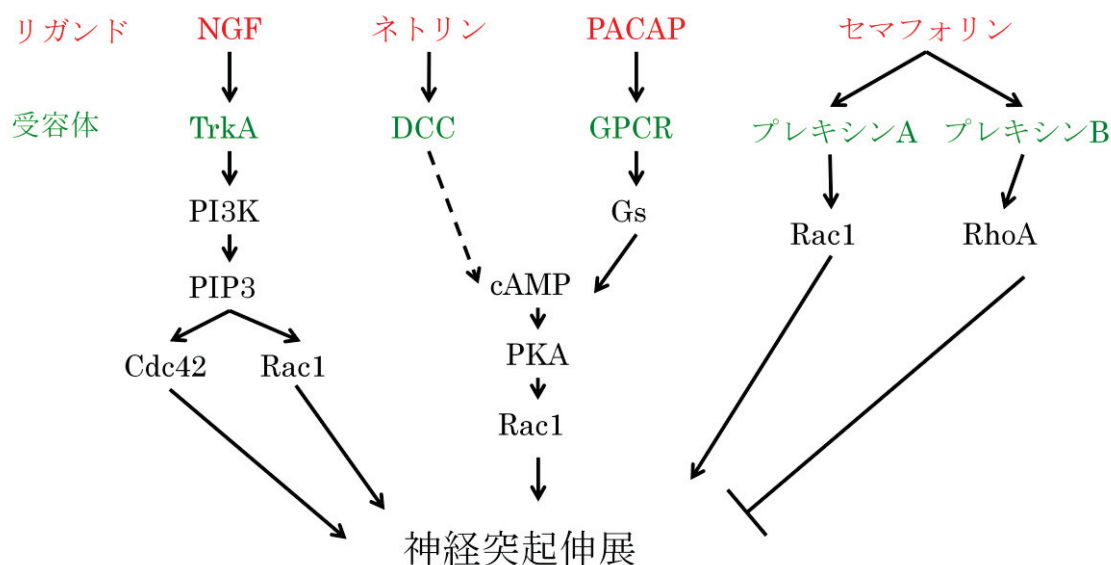


図 3. 神経突起伸展を制御する外部シグナル

神経突起伸展を促進する代表的な分子として、NGF、Netrin、神経ペプチド、セマフォリンがある。NGF はチロシンキナーゼ型受容体の一つである TrkA に結合し、PI3 キナーゼ - PIP3 - Vav2/Vav3 というシグナル経路を介して Rho ファミリーG タンパク質の Rac1 や Cdc42 を活性化する(Aoki et al., 2004)。活性化した Rac1 や Cdc42 は細胞骨格の再編成を制御し、神経突起伸展を正に制御する。Netrin は受容体である deleted in colorectal cancer (DCC)に結合し、cAMP の産生を促す(Nishiyama et al., 2003)。PACAP は G タンパク質共役型受容体(GPCR)に結合し、アデニル酸シクラーゼを活性化してセカンドメッセンジャーである cAMP の細胞内レベルを上昇させる。cAMP は PKA と Epac に直接結合し活性化させる。PKA は STEF をリン酸化することで活性化させ、活性化した STEF は Rac1 を活性化させる(Goto et al., 2011)。セマフォリンファミリーの主な受容体はプレキシシンである。プレキシシン A は細胞膜直下のドメインに RacGEF の一つである FARP2 が結合し、Rac1 を活性化させることで突起伸展を促進する。プレキシシン B はカルボキシル末端に RhoGEF が結合し、Rho ファミリーG タンパク質の RhoA を活性化させる。活性化した RhoA は Rac1 や Cdc42 とは逆に突起伸展を負に制御する。

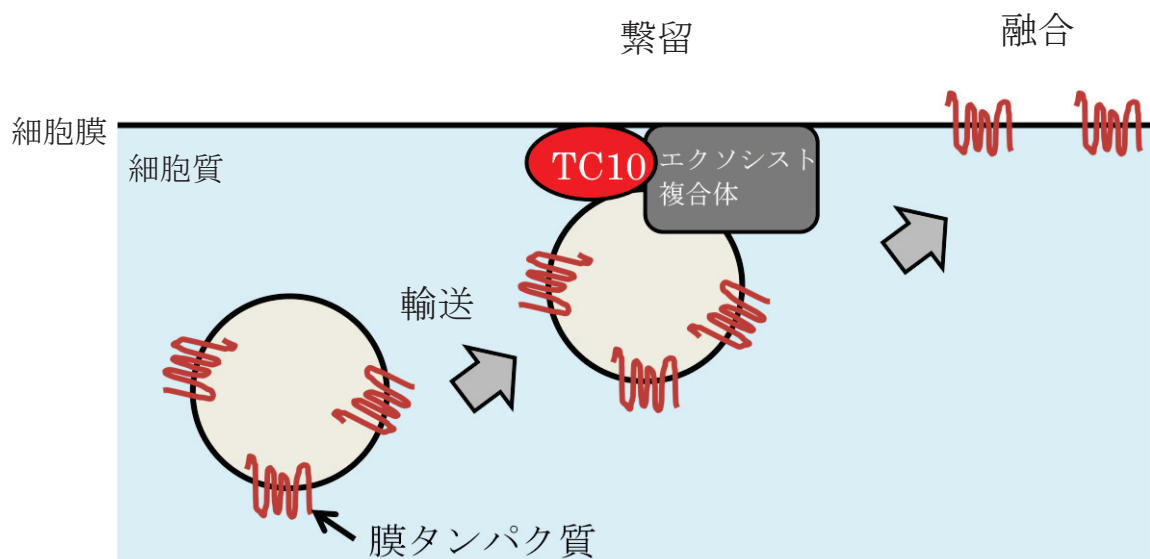


図 4. 小胞のエキソサイトーシスにおける TC10 の役割

小胞のエキソサイトーシスは輸送、繫留そして融合の 3 つのステップに分けられる。細胞膜の近傍まで輸送された小胞はエクソシスト繫留複合体により細胞膜に繫留される。繫留された小胞は最終的に SNARE 複合体の働きで細胞膜に融合する。エクソシスト繫留複合体は Sec3、Sec5、Sec6、Sec8、Sec10、Sec15、Exo70、Exo84 の 8 つのサブユニットから構成される。活性型の TC10 は Exo70 と結合し、小胞の繫留のステップを制御すると考えられている。これまでの研究で、TC10 はグルコーストランスポーターの Glut4、シナプス可塑性のメインプレーヤーである AMPA 受容体、嚢胞性線維症の原因遺伝子である CFTR といった膜タンパク質を積み荷にもつ小胞のエキソサイトーシスを制御していることが報告されている。

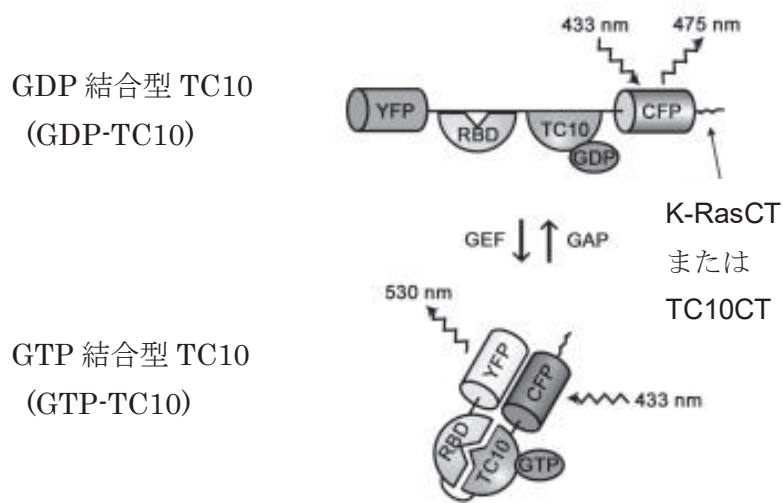


図 5. TC10 の FRET センサー

TC10 には GDP または GTP が結合している。GDP 結合型 TC10 では FRET センサーは開いた構造をとり、CFP の励起波長を照射すると CFP から蛍光が放出される。GTP 結合型 TC10 では TC10 と RBD が結合して閉じた構造をとり、CFP と YFP の距離が近づくので FRET が起こる。そのため、CFP の励起波長を照射すると YFP から蛍光が放出される。RBD、GEF、GAP はそれぞれ POSH の Rac 結合領域、TC10 のグアニンヌクレオチド交換因子、TC10 の GTP アーゼ活性化蛋白質を意味する。センサーのカルボキシル末端には K-Ras の脂質修飾部位 (K-RasCT) を付加しており、それによりセンサーが細胞膜に局在する (Kawase et al., 2006 の図 1 を一部改変)。

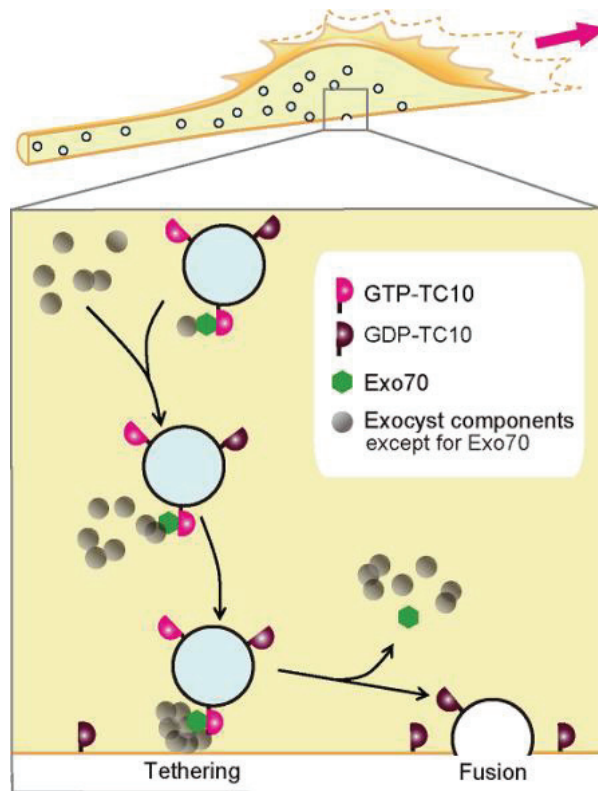


図 6. TC10 による神経突起伸展促進のモデル

下のパネルは上のパネルの四角で囲った領域を拡大したものであり、神経突起の成長円錐に運ばれてきた小胞が、細胞膜に融合し神経突起が伸展するところを表している。このモデルでは、小胞上の TC10 の多くが活性型であり、Exo70 などのエフェクターと結合している。活性型 TC10 を含む小胞は細胞膜近傍まで運ばれてくる。そこで小胞は Exo70 を含むエクソシスト複合体を介して細胞膜へ繋ぎ止められる。次に、繋ぎ止められた小胞上の TC10 は外部刺激により不活性化（加水分解）し Exo70 と乖離する。その結果、小胞が融合する。それにより新たな膜が供給され成長円錐が伸展する。

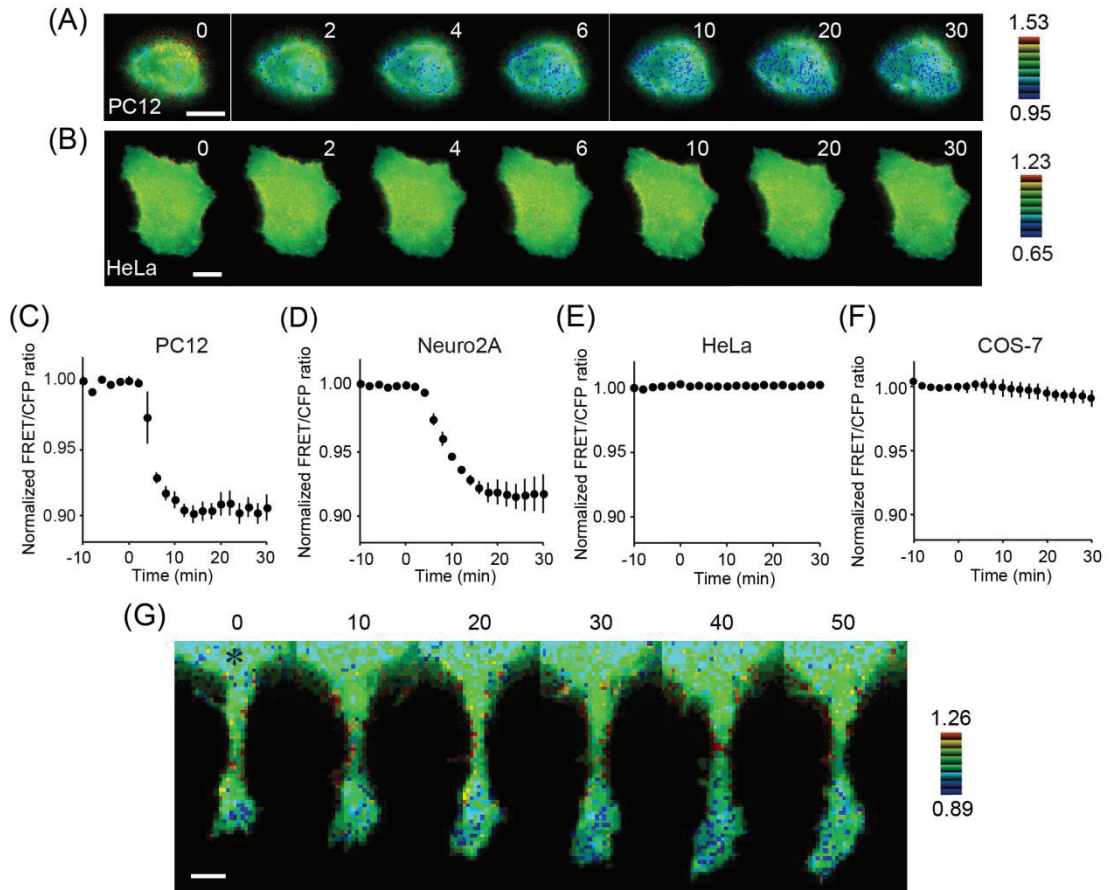


図 7. 神経系および非神経細胞系における dbcAMP 添加後の細胞膜上の TC10 活性の時空間変化

(A, C) PC12 細胞に Raichu-TC10/K-RasCT を導入し、30 分間血清飢餓状態においた。その後、1 mM の dbcAMP を添加して細胞膜上の TC10 活性の変化をタイムラプス観察した。dbcAMP 添加後、2 分ごとに 30 分間画像を得た。(A) FRET/CFP 画像を示した。右上の数字は dbcAMP を添加してからの時間 (分) を表す。FRET/CFP 画像は擬似カラー表示の 1 種である Intensity Modulated Display (IMD) モードで表している。IMD モードでは、赤色から青色の 8 色を FRET / CFP 比を表すために使用しており、各色の明度は FRET および CFP の蛍光強度の平均を表す。FRET / CFP 比の上限と下限はパネルの右側に示した (C) 各時点での細胞全体の FRET/CFP 比の平均値を求めて、その値の時間変化

をプロットした。dbcAMP の 添加時を 0 分とした。FRET/CFP 比の値を規格化するために、dbcAMP 添加前 10 分間の FRET/CFP 比の平均を 1 として、それに対する相対値をプロットした。(B、E) Raichu-TC10 / K-RasCT を発現する HeLa 細胞を 30 分間飢餓状態にし、次いで 1mM dbcAMP で刺激した。(B) パネル A の説明に記載したのと同様にして FRET/CFP 画像を示した。(E) パネル C の説明に記載したのと同様にして、HeLa 細胞における FRET/CFP 値の時間変化を示した。(D、F) dbcAMP で処理した Neuro2A (D) 細胞または COS-7 (F) 細胞の細胞での平均 FRET / CFP 比を、パネル C の説明に記載したのと同様にして求めた。それぞれの実験は少なくとも 9 細胞を各実験で解析し、その実験 3 回繰り返した。エラーバーは SE を示す。(G) Raichu-TC10 / K-RasCT を発現する PC12 細胞をラミニンコート上で培養し、dbcAMP で 24 時間処理した。その後、5 分ごとに 3 時間画像を得た。画像はパネル A の説明に記載したのと同様にして示した。このパネルでは、成長円錐が細胞体から下方に延びている。スケールバーは 5 μm (G) または 10 μm (A、B)。

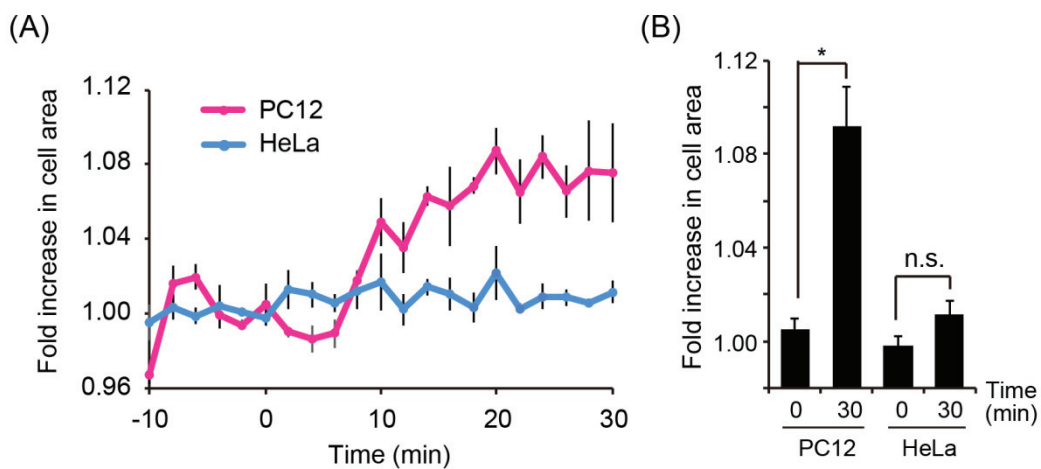


図 8. dbcAMP 添加後の PC12 細胞と HeLa 細胞の形態変化

(A) グラフは図 7 の PC12 細胞 (マゼンタ) と HeLa 細胞 (シアン) の面積の増減を表している。dbcAMP 添加時を 0 分とした。FRET/CFP 比の値を規格化するために、dbcAMP 添加前 10 分間の FRET/CFP 比の平均を 1 として、それに対する相対値をプロットした。(B) 棒グラフは dbcAMP を添加した直後 (time 0) と添加してから 30 分後の細胞における相対的な面積の値の平均値を表している。それぞれの実験は少なくとも 9 細胞を各実験で解析し、その実験 3 回繰り返した。エラーバーは SE を表している。星印 (*) は t テストの結果を表している (* $p < 0.05$; n.s., 有意差なし)

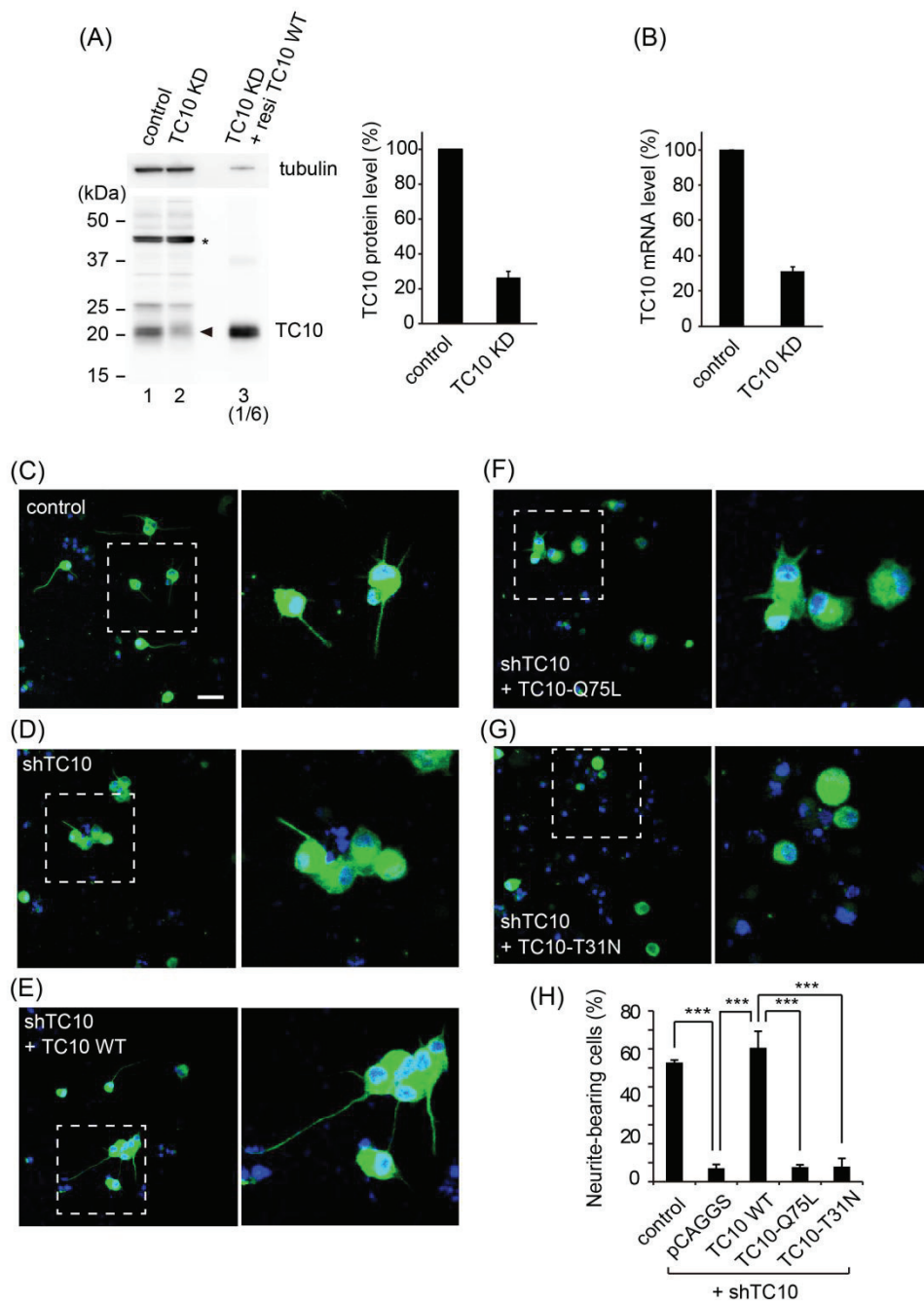


図 9. dbcAMP により誘導される PC12 細胞の神経突起伸長に対する TC10 ノックダウンの影響

(A, B) TC10 のノックダウン効率の検討結果。PC12 細胞に空ベクターまたは TC10 に対する shRNA を導入した。pCAGGS-resi-TC10-WT は shRNA とともに導入した。shRNA が発現した細胞をピューロマイシンで選択した後、それら

の細胞抽出液を TC10 やチューブリンに対する抗体を用いたイムノブロッティング (A) 及び定量的 RT-PCR 法 (B) により解析した。(A) 左はイムノブロッティングの結果を表している。内在性の TC10 と発現させた TC10 の発現量を比較するため、レーン 3 はレーン 1 や 2 の 1/6 量のタンパク質抽出液を泳動した。外来性の TC10 は内在性の TC10 のおよそ 10 倍発現していた。矢頭で示したバンドは外在性の TC10 のバンドの位置と一致したため、このバンドが内在性の TC10 のバンドであると判断した。星印 (*) で示したバンドはこの実験で使用した抗体の cross-reactivity により生じたものである。右のグラフはコントロールと TC10 ノックダウン細胞での TC10 の発現量を定量したものである。実験は 2 回行った。エラーバーは SE を表している。(B) コントロール細胞と TC10 ノックダウン細胞の TC10 の mRNA レベルを定量的 RT-PCR 法で解析した。実験は 3 回行った。エラーバーは SE を表す。(C~F) PC12 細胞に、pCAGGS-resi-TC10-WT またはその突然変異体を、TC10 を標的とする shRNA ベクターと組み合わせて遺伝子導入した。ピューロマイシンによる選択の後、1mM dbcAMP を加えて 48 時間培養し、DAPI および抗チューブリン抗体で細胞染色を行った。各実験において少なくとも 50 個の細胞を評価し、同じ実験を 3 回繰り返した。TC10 ノックダウン細胞 (D) および resi-TC10-WT 発現 TC10 ノックダウン細胞 (E)、resi-TC10-Q75L 発現 TC10 ノックダウン細胞 (F)、resi-TC10-T31N 発現 TC10 ノックダウン細胞 (G) の代表的な画像を示す。右のパネルは、それぞれ左のパネルの白い点線で囲った領域の拡大画像を示す。スケールバー、10 μm 。(H) 細胞体よりも長い神経突起を有する細胞を、神経突起を有する細胞と見なした。定量結果は、神経突起を有する細胞のパーセンテージの平均 \pm SE として棒グラフで示した。星印 (*) は、one-way ANOVA および Dunnett の事後テストの結果を示している。*** $p < 0.001$ 。

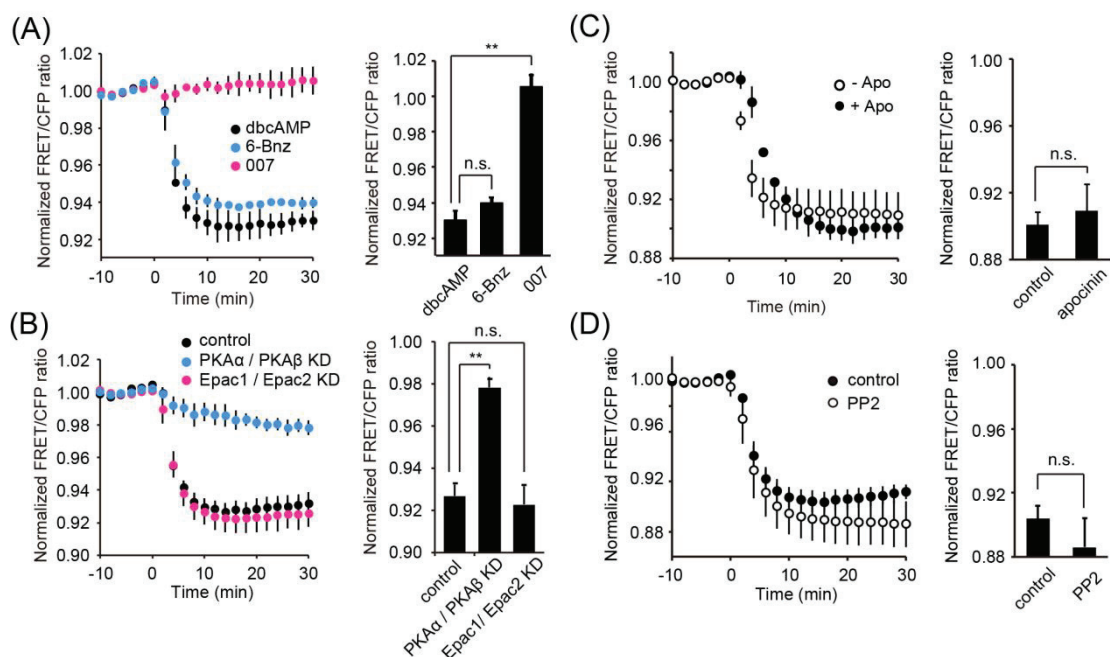


図 10. dbcAMP による TC10 の不活性化に対する PKA と Epac の関与

(A) Raichu-TC10 / K-RasCT を発現する PC12 細胞を 30 分間飢餓状態に置いた後、1 mM dbcAMP、100 μ M 6-Bnz-cAMP、または 100 μ M 007 を添加した。それぞれの cAMP アナログの添加後、2 分ごとに 30 分間撮影を行った。左の図は図 7C の説明に記載したのと同様にして、平均 FRET / CFP 比を表した。エラーバーは SE で表示した。右の図は左図で示された各サンプルの FRET / CFP 比の最低値の平均値および SE を表す。(B) pSUPER-PRKACA および pSUPER-PRKACB の両方、または pSUPER-Epac1 および pSUPER-Epac2 の両方を PC12 細胞に導入した。さらに pRaichu-TC10 / K-RasCT をトランスフェクトした後、ピューロマイシンで選択した。30 分間の血清飢餓後、dbcAMP を添加し、2 分ごとに 30 分間撮影を行った。左の図は図 7C の説明に記載したのと同様にして、平均 FRET / CFP 比を表した。エラーバーは SE で表示した。右の図は左図で示された各サンプルの FRET / CFP 比の最低値の平均値および SE を表す。(C、D) Raichu-TC10 / K-RasCT を発現する PC12 細胞を 10 μ M アポシニン (C) または 10 μ M PP2 (D) で 30 分間前処理し、dbcAMP を添加し、2 分ごとに画像化した。左の図は図 7C の説明に記載したのと同様にして、平均 FRET / CFP 比を表した。エラーバーは SE で表示した。右の図は左図で示され

た各サンプルの FRET / CFP 比の最低値の平均値および SE を表す。各実験において少なくとも 10 個の細胞を評価し、実験を 3 回繰り返した。星印 (*) は、一元配置 ANOVA および Dunnett のポストホックテスト (A、B) またはスチューデント t 検定 (C、D) (** $p < 0.01$) の結果を示す。

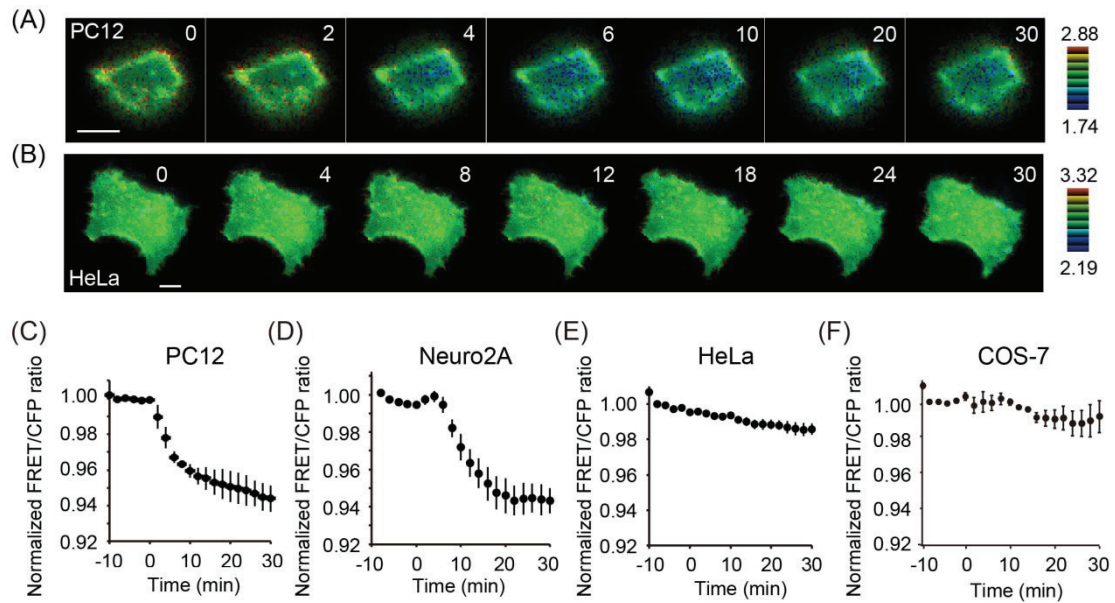


図 11. 神経および非神経系細胞における dbcAMP 添加後の細胞膜における RhoA 活性の時空間変化

(A, C) Raichu-RhoA / K-RasCT を発現する PC12 細胞を 30 分間血清飢餓状態に置いた後、1 mM の dbcAMP を添加した。dbcAMP 添加後、2 分ごとに 30 分間画像を得た。(A) 図 7A の説明に記載したのと同様にして FRET/CFP 画像を示した。(C) 図 7C の説明に記載したのと同様にして、FRET/CFP 値の時間変化を示した。(B, E) Raichu-RhoA / K-RasCT を発現する HeLa 細胞を 30 分間血清飢餓状態に置いた後、1 mM dbcAMP で刺激した。(B) 図 7A の説明に記載したのと同様にして FRET/CFP 画像を示した。(C) 図 7C の説明に記載したのと同様にして、FRET/CFP 値の時間変化を示した。(D, F) dbcAMP で処理した Neuro2A (D) 細胞または COS-7 (F) 細胞の平均 FRET / CFP 比を図 7C の説明に記載したのと同様にして示した。各実験で少なくとも 7 細胞を評価し、実験を 3 回繰り返した。エラーバーは SE を示す。スケールバー、10 μm 。

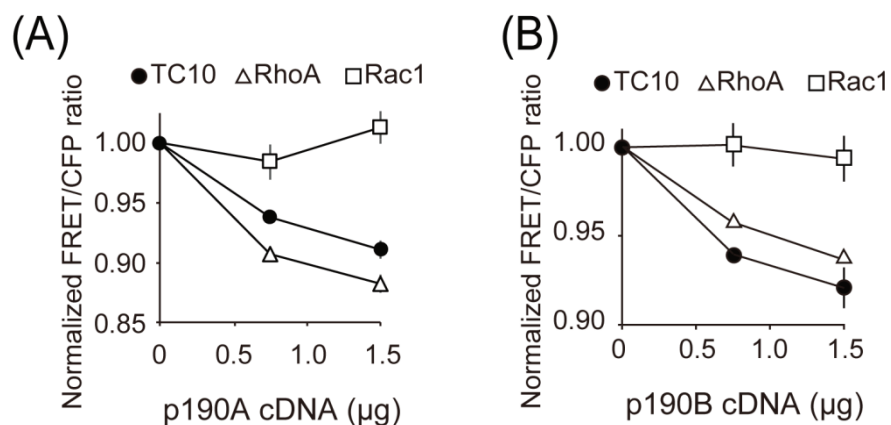


図 12. Raichu-TC10 / K-RasCT および Raichu-RhoA / K-RasCT の FRET / CFP 比と p190A または p190B の発現レベルとの相関

(A、B) 293-F 細胞に様々な量の pCXN2-5Myc-p190A (A) または pCMV-Flag-p190B (B) と組み合わせて、pRaichu-TC10、pRaichu-RhoA、または pRaichu-Rac1 を同時トランスフェクションし、それらのスペクトログラムから FRET/CFP 比を得た。Raichu-Rac1 / K-RasCT はネガティブコントロールとして用いた。エラーバーは SE (n = 3) を示す。

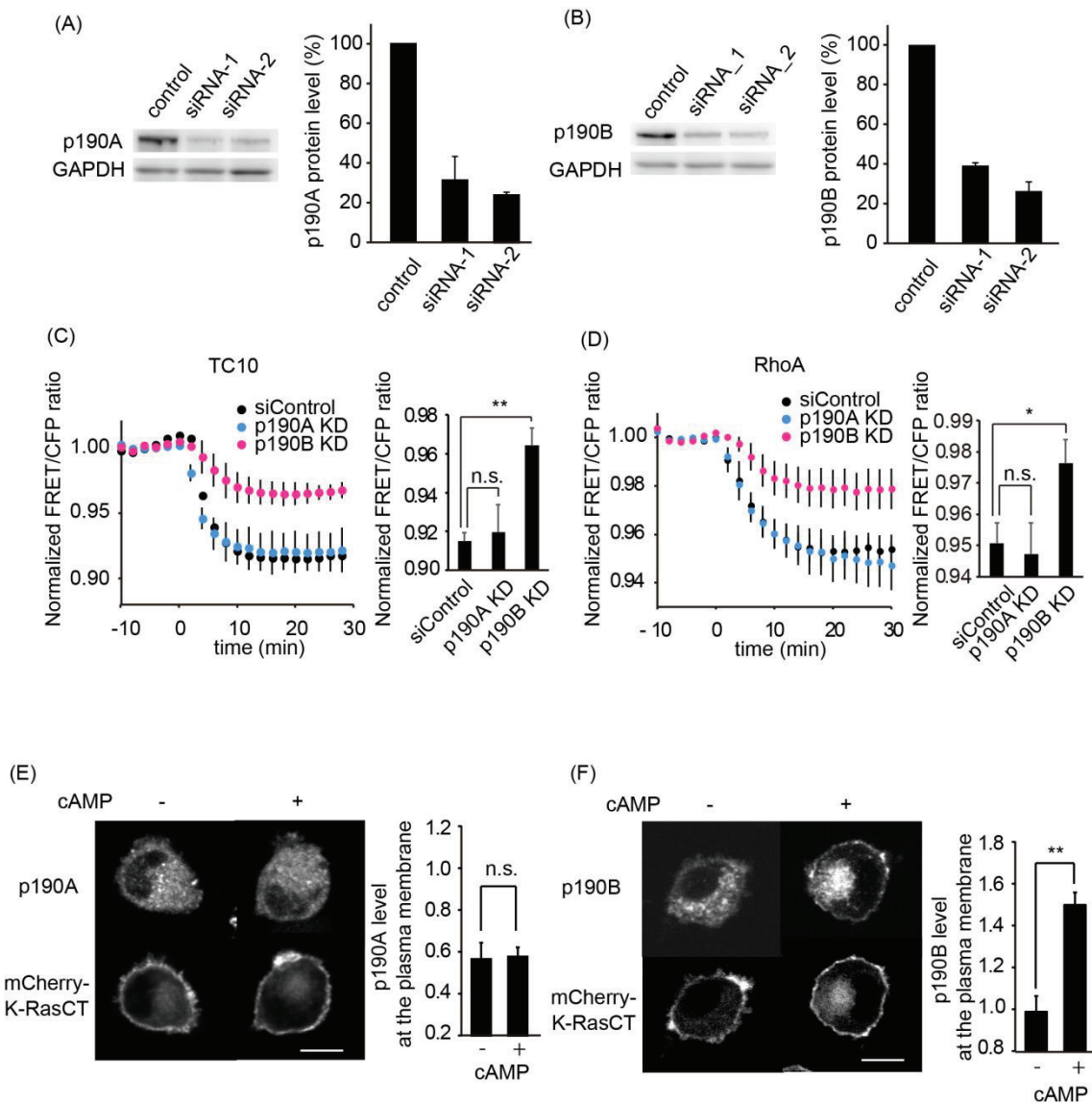


図 13. p190A および p190B のノックダウンが dbcAMP による TC10 と RhoA の不活性化に及ぼす影響

(A、B) PC12 細胞に siControl、p190A または p190B に対する si-RNA をそれぞれ導入した。72 時間培養した後、p190A (A) または p190B (B) に対する抗体を用いたイムノブロッティング法により解析した。GAPDH のシグナルで泳動した細胞抽出液のタンパク質の量を見積もって補正に用いた。実験は 3 回繰り返した。エラーバーは SE を表す。siRNA-1 (p190A について) および siRNA-2 (p190B について) がより高いノックダウン効率を示したので、以降の実験で使用了。(C) PC12 細胞に pRaichu-TC10 / K-RasCT を導入した。時間を置いて

p190A または p190B siRNA で導入した。3 日間の培養後、細胞を 30 分間血清飢餓状態に置いて、dbcAMP を添加して 30 分間 2 分ごとに撮影した。左の図は図 7C の説明に記載したのと同様にして、平均 FRET / CFP 比を表した。エラーバーは SE で表示した。右の図は左図で示された各サンプルの FRET / CFP 比の最低値の平均値および SE を表す。(D) PC12 細胞に pRaichu-RhoA / K-RasCT を導入した。時間を置いて、細胞を同様に処理し、パネル C と同様に分析した。左の図は図 7C の説明に記載したのと同様にして、平均 FRET / CFP 比を表した。エラーバーは SE で表示した。右の図は左図で示された各サンプルの FRET / CFP 比の最低値の平均値および SE を表す。各実験において少なくとも 10 個の細胞を評価し、実験を 3 回以上繰り返した。エラーバーは SE を表す。星印 (*) は一元配置分散分析 および Bonferroni の事後テストの結果を表している (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns、有意ではない)。(E, F) pCXN2-5Myc-p190A または pCMV-Flag-p190B を mCherry-K-RasCT と一緒に導入した PC12 細胞を dbcAMP で 20 分間処理した後、免疫染色した。左は代表的な p190A (E) または p190B (F) と mCherry-K-RasCT の共焦点画像。右の棒グラフは、dbcAMP の存在下または非存在下における PC12 細胞の細胞膜における p190A (E) または p190B (F) の規格化後のレベルを示した。各実験において 10 個の細胞を評価し、実験を 3 回繰り返した。星印 (*) は一元配置分散分析 および Bonferroni の事後テスト)の結果を表している (** $p < 0.01$; n.s.有意ではない)。

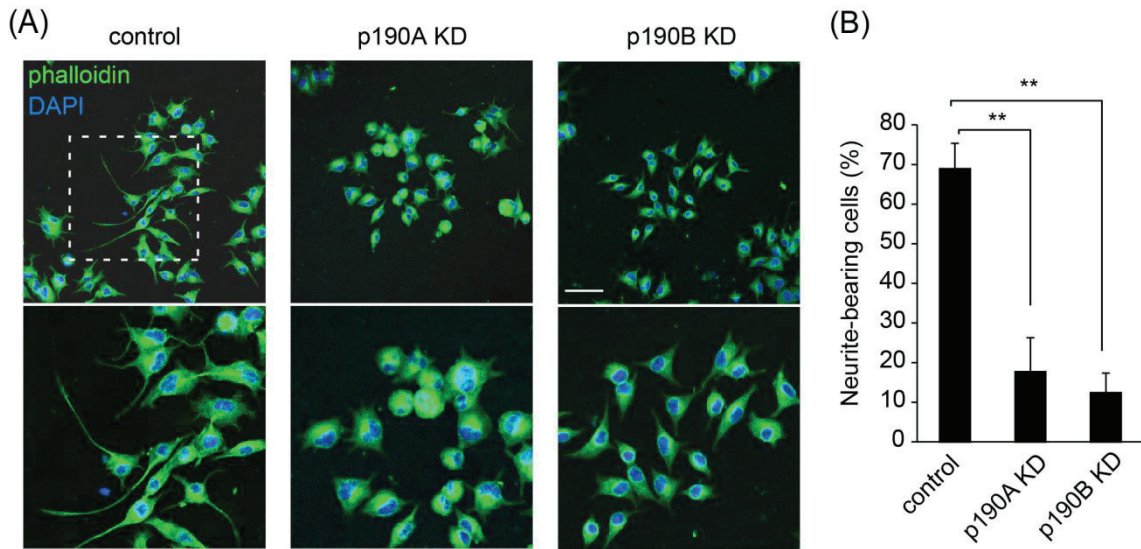


図 14. PC12 細胞における dbcAMP による神経突起伸長に対する p190A または p190B のノックダウンの影響

PC12 細胞にコントロールまたは p190A、p190B の siRNA を導入した。24 時間の培養後、細胞を 1 mM dbcAMP と共に 48 時間培養し、次いで DAPI および抗チューブリン抗体で染色した。各実験において少なくとも 50 個の細胞を評価し、実験を少なくとも 5 回繰り返した。(A) コントロール (左)、p190A ノックダウン細胞 (中)、および p190B ノックダウン細胞 (右) の画像を示す。下のパネルには、上のパネルの白い点線で囲んだ領域の拡大画像を示した。スケールバーは 10 μm 。(B) 神経突起の長さが細胞体の直径以上の細胞の割合を neurite bearing cells として、突起伸展の程度を定量化した。エラーバーは SE を表す。星印 (*) は一元配置分散分析 および Bonferroni の事後テストの結果を表す。 ** $p < 0.01$ 。

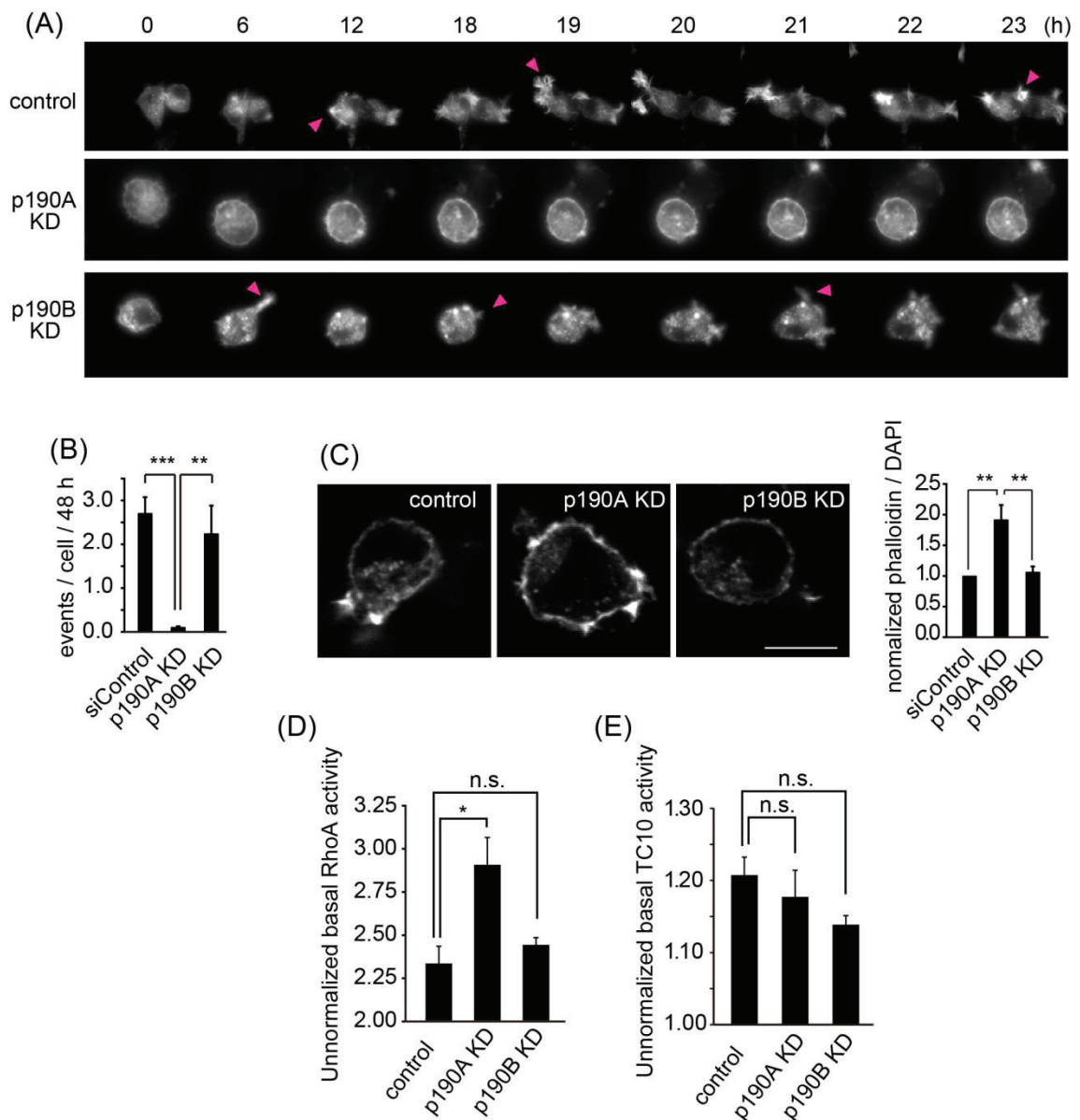


図 15. dbcAMP 処理した PC12 細胞の F-アクチンの構造およびダイナミクスに対する p190A または p190B のノックダウンの影響

(A、B) 生細胞の F-アクチンを可視化するプローブである Lifeact-mEGFP を発現させた PC12 細胞に p190A と p190B に対する siRNA を導入した。60 時間の培養後、細胞を 1 mM の dbcAMP で処理し、1 時間ごとに 48 時間撮影した。少なくとも 20 個の細胞を調べた。(A) 各条件における代表的な F-アクチン画像を示す。矢頭は、細胞体から伸びた神経突起を示している。(B) 棒グラフは、dbcAMP を添加してから 48 時間に起きた初期突出イベント数の平均値を示す。

エラーバーは SE を表す。記号は一元配置分散分析 および Bonferroni の事後テスト)の結果を表している (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)。 (C) p190A または p190B siRNA を導入した後、PC12 細胞を 60 時間培養して、次いでファロイジンおよび DAPI で染色した。左のパネルは代表的な F-アクチン画像を示す。棒グラフ (右) は、DAPI シグナルによって規格化したファロイジンの蛍光強度の平均値を示す。各実験で少なくとも 12 個の細胞を評価し、実験を 3 回繰り返した。星印は一元配置分散分析 および Bonferroni の事後テスト)の結果を表している。 ** $p < 0.01$ 。スケールバーは 10 μm 。 (D、E) パネル C において、dbcAMP を添加する前の 10 分間の RhoA (D) と TC10 (E) の活性化レベルすなわち FRET/CFP 比の規格化していない値の平均値を求めて棒グラフにした。エラーバーは SE を表す。記号は一元配置分散分析 および Bonferroni の事後テストの結果を表す。 (* $p < 0.05$; n.s., 有意差なし)

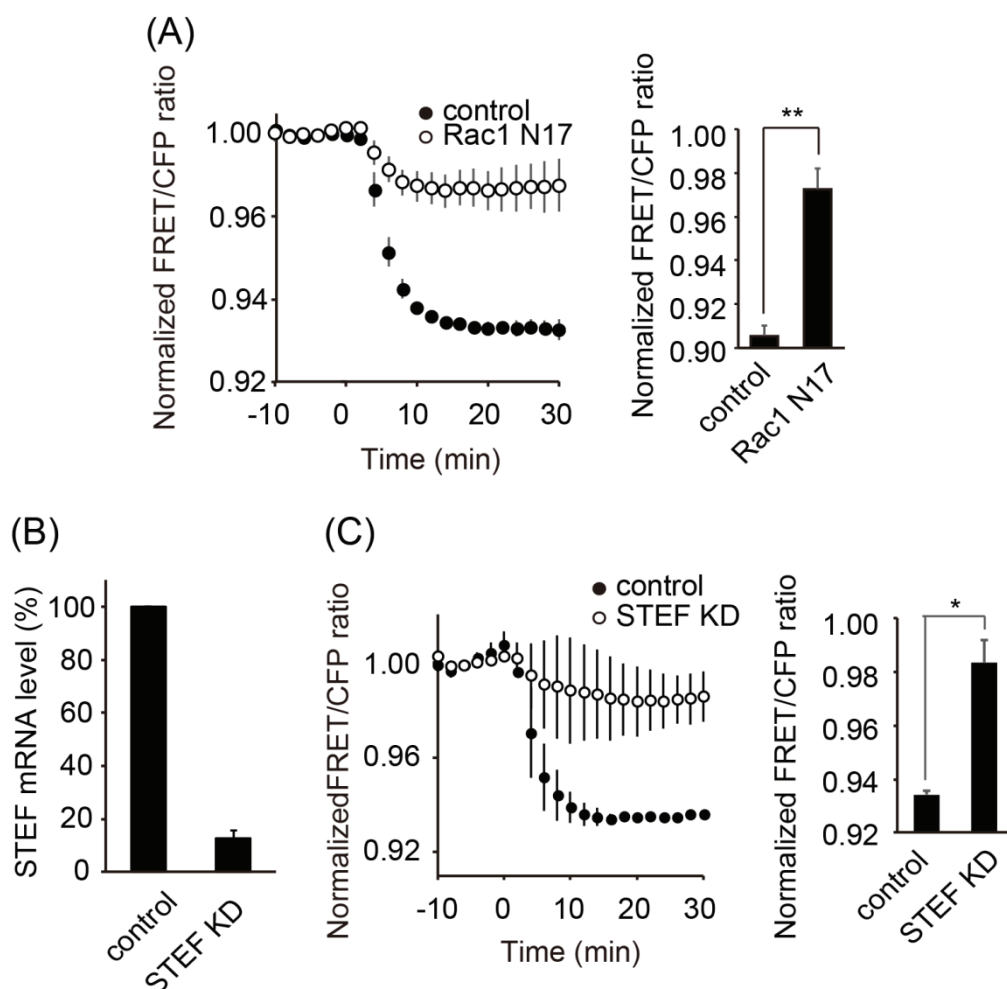


図 16. dbcAMP による TC10 不活性化に対する Rac1-N17 発現および STEF ノックダウンの影響

(A) PC12 細胞に pRaichu-TC10 / K-RasCT および pERedNLS-Rac1-S17N を導入した。30 分間の血清飢餓の後、細胞を dbcAMP で処理し、次いで 2 分ごとに撮影した。左のパネルには、全細胞にわたって平均した FRET / CFP 比の平均値の時間変化を図 7C の説明に記載したのと同様にして示した。右の棒グラフは、Raichu-TC10 の FRET / CFP 比の最低値の平均および SE を表す。(B) PC12 細胞に空のベクターまたは STEF に対する shRNA を導入した。shRNA が発現した細胞をピューロマイシンで選択した後、コントロール細胞と STEF ノックダウン細胞の STEF の mRNA レベルを定量的 RT-PCR 法で解析した。実験は 3 回行った。エラーバーは SE を表す。(C) 細胞に空のベクターまたは STEF に対する shRNA を導入した。しばらく培養した後、細胞にさらに pRaichu-TC10 / K-RasCT を導入し、ピューロマイシンで選択した。30 分間の血清飢餓の後、

dbcAMP を添加して、30 分間 2 分間ごとに画像を撮影した。左のパネルには、全細胞にわたって平均した FRET / CFP 比の平均値の時間変化を図 7C の説明に記載したのと同様にして示した。右の棒グラフのデータは、示されたサンプルにおける Raichu-TC10 の FRET / CFP 比の最低値の平均および SE を表す。各実験において少なくとも 9 つの細胞を評価し、実験を 3 回繰り返した。記号はスチューデント t 検定の結果を示す (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)。

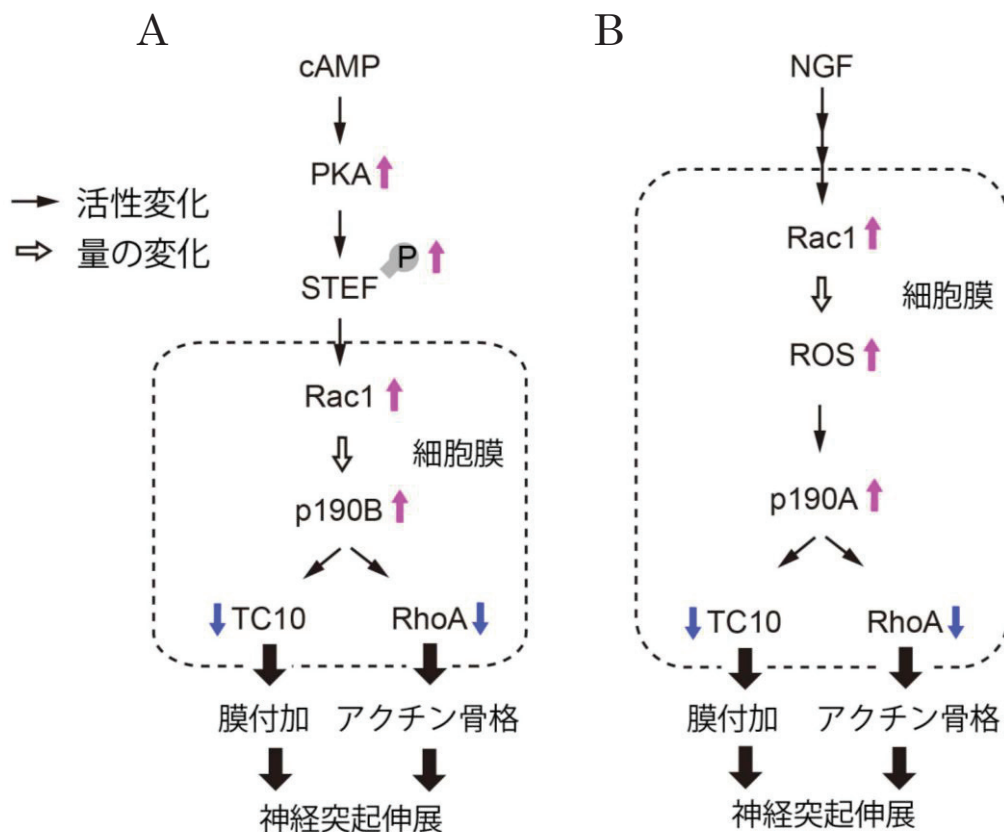


図 17. cAMP から TC10 の不活性化に至るシグナル伝達経路

(A) PC12 細胞の神経突起伸長における cAMP によるシグナル伝達経路の模式図。cAMP 添加後、活性化した PKA は Rac1 の GEF である STEF をリン酸化して活性化させる。Rac1-GTP は直接 p190B と結合し、p190B を細胞膜にリクルートして p190B の GAP 活性を増加させる。活性化した p190B は細胞膜付近の TC10 および RhoA を不活性化し、膜付加を引き起こし神経突起伸長を促進させる。(B) PC12 細胞の神経突起伸長における NGF によるシグナル伝達経路の模式図 (Fujita et al., 2013)。NGF 刺激により Rac1 が活性化する。活性化した Rac1 はエフェクターである NADPH オキシダーゼと結合し、活性酸素種(ROS)の産生を促す。ROS の働きにより p190A の抑制因子である低分子量チロシンホスファターゼが分解され、p190A が活性化する。活性化した p190A は細胞膜近傍で TC10 を不活性化し、膜付加を引き起こし神経突起伸長を促進させる。

謝辞

中村教授には本研究の遂行や本論文の作成だけではなく、研究に対する姿勢をご指導いただき大変感謝しております。また、一緒にTC10の研究を行ってきた先輩である藤田明音さんには実験を立ち上げる際に明快な助言と適切なサポートをいただき深く感謝します。卒研時の指導教員である和田直之教授には節目節目で貴重な助言をいただくとともに大学院在学中ずっと気にかけていただきました。ありがとうございました。安田さや香博士、竹内公平博士、七尾友久助教には有用な指導や提案をいただき感謝しております。また中村研1研究室の皆さんに感謝したいと思います。研究をする中で切磋琢磨できました。最後に、本論文の副査を務めていただきました、北村大介教授、古市貞一教授、後飯塚僚教授、中野直子准教授に深謝いたします。