

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月19日現在

機関番号：12102
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23700365
研究課題名（和文） 神経突起伸長オーガナイザーとしてのホスファチジルエタノールアミンの役割
研究課題名（英文） Phosphatidylethanolamine as an organizing molecule for neurite extension
研究代表者 長谷川 潤（HASEGAWA HIROSHI） 筑波大学・医学医療系・准教授 研究者番号：10332230

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞膜の構成リン脂質ホスファチジルエタノールアミンが、神経細胞の形態形成にどのような役割を担っているかを解明することを目的とした。研究の結果、IV型ATPaseにより誘起されるホスファチジルエタノールアミンの細胞膜内運動が、低分子量Gタンパク質Cdc42の活性制御を介して成長円錐のアクチン細胞骨格系を再構成することにより、神経突起の伸長を制御していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have examined whether and how phosphatidylethanolamine, a phospholipid consisting of the plasma membrane, is involved in neuronal morphogenesis. Our results indicated that the intramembranous movement (flip-flop movement) of phosphatidylethanolamine, which is induced by a type IV ATPase, controls neurite morphogenesis by organizing actin cytoskeleton in growth cones through the regulation of small G protein Cdc42.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：発生・発達・再生神経科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経細胞は、情報の入力を司る樹状突起と情報の出力を司る軸索を持つ。これらの神経突起が正常に発達することが、高次脳機能に必須であり、神経突起伸長の異常は様々な神経・精神疾患を引き起こす。伸長する軸索の先端部では、アクチン細胞骨格系の再構築が活発に行われている。一方で、軸索の伸長は多量の細胞膜成分の供給を必要とする。したがって、軸索先端部では、細胞骨格系の再構築と細胞膜成分の供給が相互的に調節される必要がある。しかし、こうしたアクチン細胞骨格系の再構築と新規細胞膜の供給がどのようなバランス調節メカニズムにより

制御されているのかは、現在まで全く分かっていなかった。

(2) 私たちはこれまでの研究で、発生期の神経細胞に高発現する遺伝子のスクリーニングを行ってきた。その結果、細胞膜の構成リン脂質であるホスファチジルエタノールアミンの合成酵素エタノールアミンキナーゼ-1が、胎児期の神経細胞に高発現していることを発見した。そこで、神経軸索の伸長におけるエタノールアミンキナーゼ-1の機能を検討した結果、エタノールアミンキナーゼ-1は効率的な神経突起伸長に必須であることを見出した（平成21年度科学研究費補助金の採択課題研究の成果）。

(3) 近年、エタノールアミンキナーゼ-1 により産生されるホスファチジルエタノールアミンがシグナル伝達物質として機能することが明らかになってきた。すなわち、ホスファチジルエタノールアミンは、安定状態の細胞では主に細胞膜脂質二重層の内層に局在するが、ある種の刺激下においては細胞膜の内層と外層を往復すること（フリップ・フロップ運動）により細胞内の細胞骨格系を制御することが示された (Emoto *et al.*, 2005, *J Biol Chem*; Saito *et al.*, 2007, *Dev Cell*)。

2. 研究の目的

上記の研究背景より私たちは、発生期の神経細胞で高発現しているエタノールアミンキナーゼ-1 により産生されたホスファチジルエタノールアミンが、神経突起先端部において、フリップ・フロップ運動を行うことによりアクチン細胞骨格系を制御し、神経突起の伸長を促しているのではないかと考えた。この仮説が正しければ、これにより新規細胞膜成分の供給とアクチン細胞骨格系の再構築が相互的に制御されることが可能となる。この可能性を検証するため、本研究において私たちは、以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1) 神経突起先端部におけるホスファチジルエタノールアミンのフリップ・フロップ現象を司る分子メカニズムの解明

神経突起先端部でホスファチジルエタノールアミンのフリップ・フロップ運動を制御すると考えられる IV 型 ATPase およびその補因子である CDC50 分子を同定する。

(2) ホスファチジルエタノールアミンのフリップ・フロップ運動により制御される細胞内情報伝達システムの解明

ホスファチジルエタノールアミンのフリップ・フロップ運動は、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の活性調節を介してアクチン細胞骨格系の制御を行うことが予想された。そこで、(1)で同定した IV 型 ATPase が神経突起先端部でのアクチン細胞骨格系の制御を行っているか、また Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の活性を制御するかを明らかにする。

(3) 個体レベルでの神経突起伸長におけるホスファチジルエタノールアミンの役割の解明

ホスファチジルエタノールアミンのフリップ・フロップ運動が神経突起の伸長を制御していることを、マウス個体レベルで検証する。

3. 研究の方法

(1) 神経突起伸長に関与すると考えられる IV 型 ATPase および CDC50 因子の同定。

① 初代培養海馬神経細胞に発現する IV 型

ATPase および CDC50 因子を RT-PCR 法でスクリーニングする。

② 発現が観察された遺伝子に関しては、それぞれの遺伝子がコードするタンパク質が成長円錐に局在するかを検討する。そのために、哺乳動物細胞内発現用ベクターを用いて、各遺伝子がコードするタンパク質を発現するプラスミドを構築し、初代培養海馬神経細胞に過剰発現させる。

③ 初代培養海馬神経細胞に発現が見られ、かつ成長円錐に局在が観察される IV 型 ATPase および CDC50 因子が同定されたら、それらに対する siRNA を作製し、ノックダウンした時に神経突起の伸長が変化するかを、初代培養海馬神経細胞を用いて検討する。

(2) ホスファチジルエタノールアミンのフリップ・フロップ運動により制御される細胞内情報伝達システムの解明

① (1)で同定された IV 型 ATPase を過剰発現もしくはノックダウンすることにより、成長円錐のアクチン細胞骨格系に変化がみられるかを検討する。

② 同様に(1)で同定された IV 型 ATPase の過剰発現もしくはノックダウンにより、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 (RhoA, Rac1 および Cdc42) の活性が変化するかを検討する。

(3) 個体レベルでの神経突起伸長におけるホスファチジルエタノールアミンの役割の解明

マウス胎児の脳新皮質神経細胞に、(1)で同定された IV 型 ATPase を過剰発現もしくはノックダウンする。これにより神経細胞の形態がどのように変化するかを観察する。遺伝子導入法としては、*in vivo* 電気穿孔法またはレンチウイルスを用いた方法を使用する。

4. 研究成果

(1) 神経突起伸長に関与すると考えられる IV 型 ATPase および CDC50 因子の同定

① RT-PCR 解析により、初代培養海馬神経細胞に発現する IV 型 ATPase を 10 種類同定した。

② これらの IV 型 ATPase を初代培養海馬神経細胞に発現させたところ、ほとんどの分子は細胞体にのみ局在したが、1 種類のみ成長円錐に局在することが分かった (この分子を GC-ATPase と称する)。CDC50 因子に関しては、3 種類の CDC50 ファミリーメンバー全てが初代培養海馬神経細胞に発現することが確認され、そのうちの 2 種類が成長円錐に局在することが分かった (GC-CDC50-A、GC-CDC50-B)。

③ これらの IV 型 ATPase および CDC50 因子を初代培養海馬神経細胞に過剰発現させ、神経突起伸長に変化が観察されるかを検討

した。その結果、GC-ATPase および GC-CDC50-B を過剰発現させた場合にのみ、神経突起の伸長が促進されることが分かった。GC-CDC50-A の過剰発現は神経突起の伸長を促進しなかった。

④ 初代培養海馬神経細胞の GC-ATPase を siRNA のトランスフェクションによりノックダウンしたところ、神経突起伸長は抑制された。

これらの結果から、GC-ATPase および GC-CDC50-B は神経突起の伸長を制御していることが分かった。

(2) ホスファチジルエタノールアミンのフリップ・フロップ運動により制御される細胞内情報伝達システムの解明

① 初代培養海馬神経細胞の GC-ATPase をノックダウンしたところ、成長円錐において長いフィロポディアが形成された。このフィロポディアには太いアクチン束が認められた。一方、GC-ATPase の過剰発現では、成長円錐の形態に大きな変化は観察されなかった。

② ホスファチジルエタノールアミンのフリップ・フロップを抑制する細菌毒素を添加したところ、成長円錐に長いフィロポディアが形成された。この形態は GC-ATPase のノックダウンによる影響と酷似していた。

③ 初代培養海馬神経細胞の GC-ATPase をノックダウンしたところ、低分子量 G タンパク質 Cdc42 の活性が増加していた。一方、Rac1 の活性に変化は見られなかった。

以上の結果より、GC-ATPase を介したホスファチジルエタノールアミンのフリップ・フロップ運動は、Cdc42 の活性調節を介して成長円錐のアクチン細胞骨格系を再構築し、神経突起の伸長を制御しているものと考えられた。

(3) 個体レベルでの神経突起伸長におけるホスファチジルエタノールアミンの役割の解明

上記(1)、(2)の結果をマウス個体レベルで検証する目的で、マウス胎児大脳新皮質に GC-ATPase および GC-CDC50-B を過剰発現もしくはノックダウンを行う実験系を構築した。予備実験の結果、これらのタンパク質は、神経突起の伸長と共に、新生神経細胞の垂直方向移動に関与する可能性が示唆された。

以上のように、本研究の成果により、神経突起伸長に重要であると考えられる新しい分子機構が明らかになった。今後は、神経ネットワーク形成の異常を伴う疾患に本分子機構が関与しているか、またシナプス形成やシナプス可塑性など他の神経現象に関与するかなど、幅広い研究領域を開拓することができるものと期待される。

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 3 件)

- (1) Tu Thi Ngoc Nguyen, Yong Min Kim, T. Doohum Kim, Oanh Thi Tu Le, Jae Jin Kim, Ho Chul Kang, Hiroshi Hasegawa, Yasunori Kanaho, Sang Yoon Lee, Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha facilitates Toll-like receptor 4-mediated microglial inflammation through regulation of the Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein (TIRAP) location, The Journal of Biological Chemistry, 288 巻、2013、5645-5659、査読有、DOI:10.1074/jbc.M112.410126
- (2) Hiroshi Hasegawa, Junko Noguchi Misuzu Yamashita, Risa Okada, Rika Sugimoto, Momoko Furuya, Takamitsu Unoki, Yuji Funakoshi, Tadashi Baba, Yasunori Kanaho, Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase is indispensable for mouse spermatogenesis, 2012, Biology of Reproduction, 86 巻、136、1-12、査読有、DOI:10.1095/biolreprod.110.089896
- (3) Unoki Takamitsu, Shinji Matsuda, Wataru Kakegawa, Ngo Thai Bich Van, Kazuhisa Kohda, Atsushi Suzuki, Yuji Funakoshi, Hiroshi Hasegawa, Michisuke Yuzaki, Yasunori Kanaho, NMDA receptor-mediated PIP5K activation to produce PI(4,5)P2 is essential for AMPA receptor endocytosis during LTD, Neuron, 73 巻、2012、135-148、査読有、DOI:10.1016/j.neuron.2011.09.034

[学会発表] (計 11 件)

- (1) 喜多紗斗美、圧負荷誘発性心肥大における PIP5 キナーゼ alpha の関与、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 22 日、福岡国際会議場、福岡
- (2) 長谷川潤、マウス生殖細胞における低分子量 G 蛋白質 Arf6 シグナルの役割マウス生殖細胞における低分子量 G 蛋白質 Arf6 シグナルの役割、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡国際会議場、福岡
- (3) 秋山雅博、Defect of axon myelination in the central nervous system of the small G protein Arf6 knockout mice、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡国際会議場、福岡
- (4) 長谷川潤、NMDA 受容体による脂質キナー

- ゼ PIP5K の活性化は、LTD における AMPA 受容体のエンドサイトーシスに必須である、第 35 回 日本神経科学大会、2012 年 9 月 18 日、名古屋国際会議場、名古屋
- (5) Hiroshi Hasegawa、Requirement of ADP-ribosylation factor 6 for the development of mouse germ cells、Joint meeting of the 45th annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & the 64th annual meeting of the Japan Society for Cell Biology、2012 年 5 月 31 日、神戸ポートアイランド、神戸
- (6) 鶴木隆光、NMDA 受容体により誘導される長期抑圧において、PI(4,5)P₂ 産生酵素 PIP5K は AMPA 受容体のエンドサイトーシスに重要である、第 54 回 日本神経化学会大会、2011 年 9 月 28 日、瑠璃光、加賀
- (7) 佐藤隆信、Phospholipase D (PLD) は腫瘍形成を抑制する、第 84 回 日本生化学会大会、2011 年 9 月 24 日、国立京都国際会館、京都
- (8) 岡田理沙、精子の形態維持におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ A の役割、第 84 回 日本生化学会大会、2011 年 9 月 24 日、国立京都国際会館、京都
- (9) 長谷川潤、フィブロネクチンによる Arf6 活性化は Arl14 低分子量 G 蛋白質を必要とする、第 84 回 日本生化学会大会、2011 年 9 月 24 日、国立京都国際会館、京都
- (10) 佐藤隆信、Phospholipase D ではなく Protein kinase C が好中球での活性酸素産生および酵素放出に不可欠である、第 63 回 日本細胞生物学会大会、2011 年 6 月 28 日、北海道大学、札幌
- (11) 木下雅美、Small G protein Arf6 is involved in lung homeostasis by regulating alveolar epithelial type II cell function、第 63 回 日本細胞生物学会大会、2011 年 6 月 28 日、北海道大学、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 潤 (HASEGAWA HIROSHI)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：10332230

(2) 研究協力者

金保 安則 (KANAHO YASUNORI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：00214437

鈴木 篤史 (SUZUKI ATSUSHI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
博士課程学生