

# 神経成長におけるカルシウムシグナル制御機構

機能分子・膜動態グループ

竹居 光太郎

## 【要旨】

神経系の成長・発達における神経成長円錐内のカルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )の役割について細胞内カルシウムストアからの $\text{Ca}^{2+}$ 放出に着目し、鶏卵胚の培養背根神経節(DRG)細胞を用いて検討した。種々の薬理的阻害実験やノックアウトマウスを用いた実験の結果から、イノシトール3リン酸( $\text{IP}_3$ )受容体( $\text{IP}_3\text{R}$ )を介する細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 放出が、神経成長における重要な制御因子であることが分った。特定分子を局所的に不活性化できるレーザー分子不活性法(CALI法)によって、成長円錐内に存在する1型 $\text{IP}_3\text{R}$ が担う細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 放出が神経突起の伸長を制御する重要なシグナルであることが明らかになった。

次に、神経成長における $\text{IP}_3\text{R}$ のシグナル伝達経路の下流分子を検索するため、種々の薬理的阻害実験を行った。細胞内カルシウムストアからの $\text{Ca}^{2+}$ 放出を阻害して生じる神経突起の伸長阻害は、細胞内cGMPを上昇させることで有意に緩和された。また、一酸化窒素(NO)合成酵素(NOS)は神経成長円錐に存在し、その活性を薬理的に阻害すると有意に神経突起の伸長が抑制された。これら一連の実験結果より、細胞内カルシウムストアからの $\text{Ca}^{2+}$ 放出はNOSを活性化してNOを産生し、その結果細胞内cGMPを上昇させて神経突起の伸長を促進すると考えられる $\text{Ca}^{2+}$ 依存性のシグナル伝達経路の存在が示唆された。

## 【はじめに】

神経系の発生過程では、分裂・移動を終えた神経細胞は突起を伸長させ、遠く離れた標的細胞を正確に見出してシナプスを形成する。この一連の過程は軸索誘導と呼ばれ、神経回路網形成の最も重要な現象である。伸長する神経突起の先端には成長円錐と呼ばれる特殊な構造が存在し、成長円錐は周囲の微小外界環境を感知しながら神経突起を標的細胞に正確に牽引する。神経系の成長・発達において成長円錐内のカルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )が重要な因子であることは知られていた。今まで細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ が細胞膜上のカルシウムチャンネルを通して細胞内に流入することで調節されると考えられてきた。ところが、ある種の神経細胞では細胞外からの $\text{Ca}^{2+}$ 流入を遮断しても神経成長に影響を受けない。そこで我々はこの事実に注目し、神経成長における細胞内カルシウムストアからの $\text{Ca}^{2+}$ 放出の役割について、成長円錐が大きく神経突起の成長速度が速い鶏卵胚の培養背根神経節(DRG)細胞を用いて検討した。

## 【細胞内カルシウムストアからの $\text{Ca}^{2+}$ 放出の役割】

Thapsigargin (TG) は  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の選択的阻害剤で、細胞内カルシウムストアへの  $\text{Ca}^{2+}$  供給を阻害する。長期的にこの薬剤にさらされると  $\text{Ca}^{2+}$  供給がない状態で継続的な細胞内カルシウムストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が起こるために細胞内カルシウムストアが枯渇する。培養 DRG 細胞に TG の長期的負荷を与えると神経突起の伸長が有意に抑制された (図 1)。このことは、細胞内カルシウムストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出は神経成長において非常に重要な役割を演ずることを示唆する。細胞内カルシウムストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出は、大別してイノシトール 3 リン酸 ( $\text{IP}_3$ ) 受容体 ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) を介するものと、リアノジン ( $\text{Ry}$ ) 受容体 ( $\text{RyR}$ ) を介するものの 2 種がある。 $\text{Ry}$  を過剰量与えて  $\text{RyR}$  を介する細胞内カルシウムストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を枯渇させても神経成長には影響がなかった。また、細胞膜上のカルシウムチャンネルを阻害するカドニウムによっても神経成長は阻害されなかった。以上の結果は、鶏卵胚 DRG 細胞では  $\text{IP}_3\text{R}$  を介した細胞内カルシウムストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が神経成長における重要な制御因子であることを示唆する。

## 【イノシトール 3 リン酸 ( $\text{IP}_3$ ) 受容体の役割】

鶏卵胚 DRG 細胞には 1 型  $\text{IP}_3\text{R}$  ( $\text{IP}_3\text{R}1$ ) と 3 型  $\text{IP}_3\text{R}$  ( $\text{IP}_3\text{R}3$ ) が豊富に発現していた (図 2)。蛍光抗体法による免疫細胞化学を行ったところ、 $\text{IP}_3\text{R}1$  は細胞体、神経突起、成長円錐の中心部に分布し、成長円錐部では微小管の存在部位に近似して分布していた (図 3)。一方、 $\text{IP}_3\text{R}3$  は細胞体、神経突起、成長円錐全体に広く分布し、成長円錐部では糸状足細部にも分布し、 $\text{IP}_3\text{R}1$  の分布パターンとは異なっていた。

次に、神経成長における  $\text{IP}_3\text{R}$  の機能を検討するために種々の薬理的阻害実験を行った。 $\text{Li}^+$  はイノシトールリン酸代謝系の脱リン酸化酵素を阻害してイノシトールリン脂質 (PI) 代謝を枯渇させる。 $\text{Li}^+$  による  $\text{IP}_3$  産生の阻害は突起伸長を著しく抑制した。他方、Heparin は  $\text{IP}_3\text{R}$  の  $\text{IP}_3$  結合部位に吸着して  $\text{IP}_3$  結合を阻害する。突起伸長中の DRG 細胞に Heparin をマイクロインジェクションし、成長円錐の動態をタイムラプス記録して調べた。Heparin マイクロインジェクションの約 15 分後から伸長が停止して神経突起の一部に腕曲が生じた。その後ゆっくりと突起が退縮する現象が見られた (図 4)。Heparin アナログの場合は正常に突起伸長が継続した。これらの薬理的阻害実験によって、細胞内  $\text{IP}_3$  の産生- $\text{IP}_3\text{R}$  のチャンネル機能-細胞内カルシウムストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出の一連のシグナル伝達経路が神経成長に重要な役割を演ずることが明らかになった。

他方、 $\text{IP}_3\text{R}1$  の遺伝子欠損マウス (ノックアウトマウス) を用いて DRG 細胞の神経成長を調べたところ、胎生期や誕生 1 日目のノックアウトマウスでは、野生型に比して有意に神経突起の伸長が抑制されていた。 $\text{IP}_3\text{R}1$  は鶏卵胚 DRG 細胞の広範に渡って分布していたが、少なくとも  $\text{IP}_3\text{R}1$  は DRG 細胞の神経成長に深く関与するものと考えられた。しかし、どこに分布する  $\text{IP}_3\text{R}1$  が実際に神経成長の制御を行うのかは上記の薬理的的手法や遺伝子欠損マウ

スを用いた実験では明らかにすることはできない。そこで、レーザー分子不活性化法 (Chromophore-assisted laser inactivation: CALI 法) を活用して解析した。この方法は、色素標識した抗体で分子を特定化し、抗体と目的の分子が結合した状態でレーザー光 (波長: 620 nm) を照射すると標識色素がレーザー光を吸収してヒドロキシラジカルを産生して目的の分子の機能を不活性化するというものである (図5)。CALI 用に色素標識した  $IP_3R1$  に対する特異抗体を Trituration 法で DRG 細胞に導入して 2-3 時間培養した後、直径約  $10\mu m$  のスポットでレーザー照射して  $IP_3R1$  を局所的に不活性化させた時のレーザー照射前後の成長円錐の動態をタイムラプス記録で調べた。成長円錐部の  $IP_3R1$  を CALI 法で不活性化すると、神経成長が停止して神経突起の一部に腕曲が生じ、引き続き神経突起の退縮が起こった (図6)。この現象は Heparin を細胞体にマイクロインジェクションした時に観られたものとよく一致した。神経突起部で  $IP_3R1$  を同様に不活性化しても成長円錐の動態には変化は観られなかった。CALI の効果を生化学的に調べると、 $IP_3$  刺激による細胞内カルシウムストアからの  $Ca^{2+}$  放出能 ( $IP_3$ -induced  $Ca^{2+}$  release: IICR) が約 50% 減弱することが分かった (図7)。これらの結果は成長円錐部の  $IP_3R1$  を介した局所的なカルシウム変動が神経突起の伸長制御における中心的な役割を演じていることを示す。

以上の一連の実験研究により、成長円錐内に発現する  $IP_3R1$  を介する IICR は神経突起の伸長を制御する機構に深く関与するシグナル経路を担うことが判明した。

### 【 $IP_3R-Ca^{2+}$ シグナル伝達系の機能分子の検索】

神経成長における  $IP_3R$  のシグナル伝達下流分子の検索を目的として、種々の薬理的阻害実験を行った。TG による細胞内  $Ca^{2+}$  ストアからの  $Ca^{2+}$  放出を阻害した条件下で cGMP 濃度を人為的に上昇させると、TG による突起伸長阻害が有意に回復する傾向を示した (図8)。それに反し、cAMP 濃度を上昇させると TG による突起伸長阻害が増長された。cGMP 依存性蛋白質リ酸化酵素 PKG の選択的阻害剤は正常状態 (TG 負荷していない状態) の突起伸長を阻害しなかった。従って、cGMP は神経成長を直接的に促進するものではなく、細胞内  $Ca^{2+}$  ストアからの  $Ca^{2+}$  放出によるシグナル伝達経路に関連して神経成長を促進するものと推察された。

cGMP 産生に関与する分子の有力候補として一酸化窒素 (NO) を想定し、鶏卵胚 DRG 細胞において NO 合成酵素 (NOS) の阻害剤を用いて薬理的に解析した。NOS 阻害剤である N-ニトロ-L-アルギニン (N-NLA) は神経突起の伸長を有意に抑制した (図9)。NO の前駆体であるアルギニンを過剰に投与して N-NLA と競合させると、この阻害剤の効果は消失した。これらの結果は神経突起伸長に NOS が関与することを強く示唆する。神経型 NOS (nNOS) の特異抗体によって伸長中の DRG 細胞内の nNOS の分布を免疫細胞化学的に調べたところ、nNOS は細胞の広範に渡って分布していたが、突起先端の成長円錐部にも強い発現が認められた (図10)。これらの所見より、成長円錐の nNOS によって産生される NO が

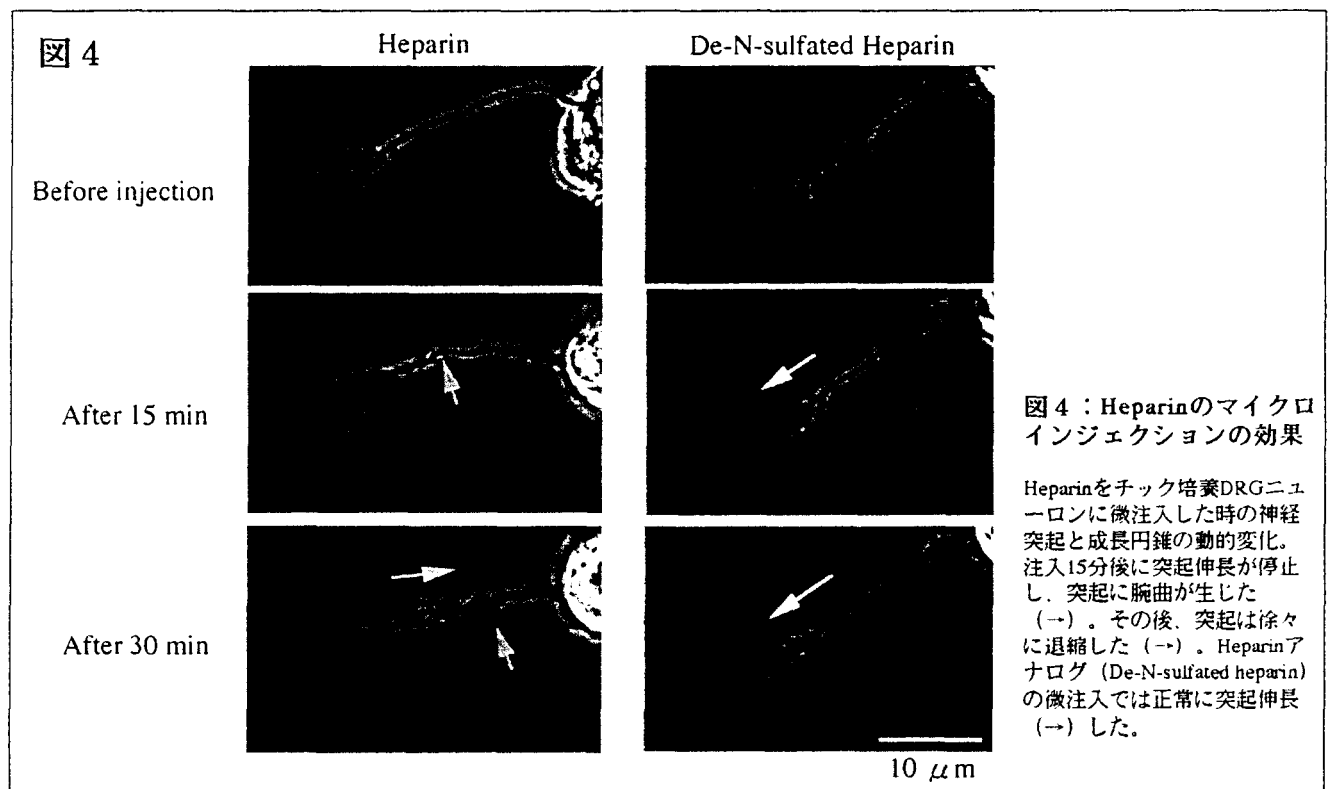
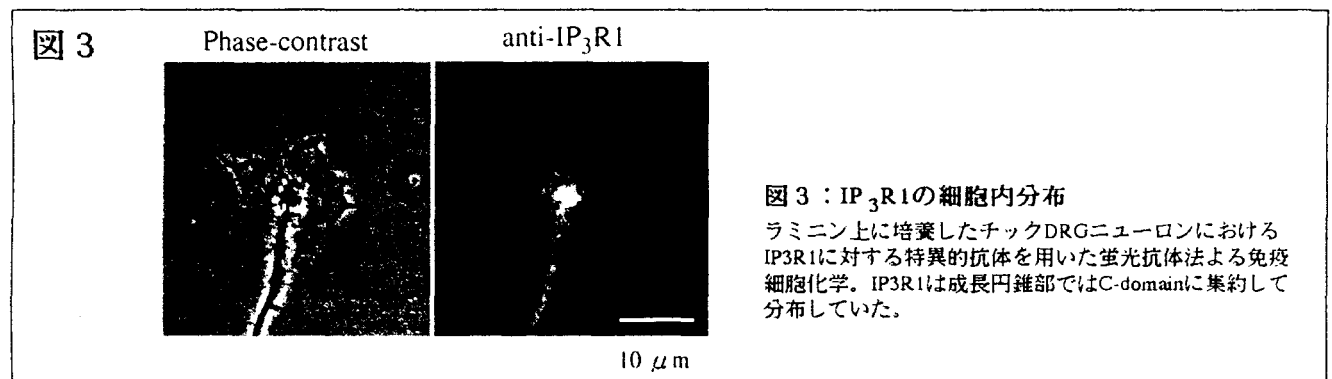
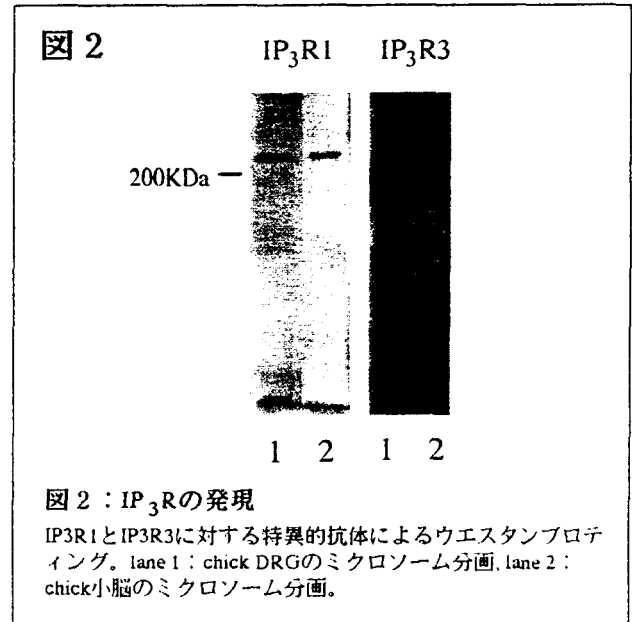
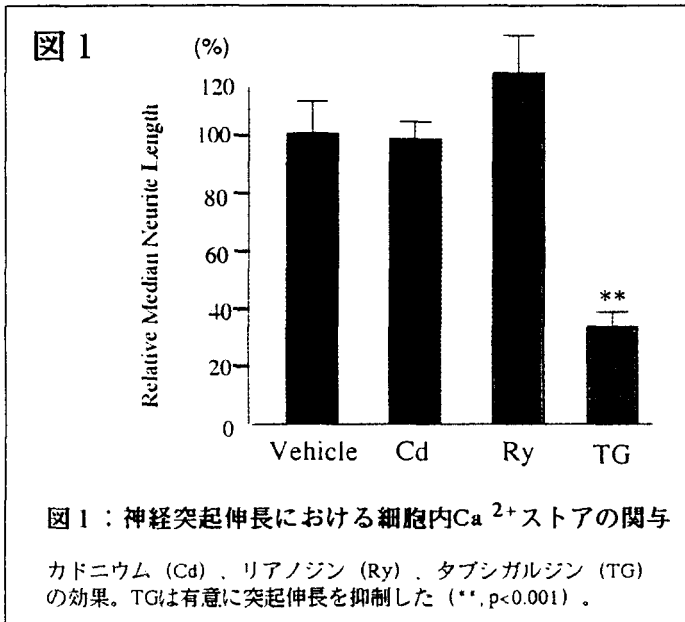
自らに作用して神経成長を促すものと考えられた。NOSはCa<sup>2+</sup>依存的に働く脱リン酸化酵素カルシニューリン(CN)の作用によって活性化される性質を有することから、細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアからのCa<sup>2+</sup>放出によってCNを介してNOSの活性化が誘導される可能性があり、現在、CNのシグナル伝達経路との関連性を明らかにするための解析を行っている。

## 【まとめ】

- DRG細胞の成長円錐にはIP<sub>3</sub>R1が豊富に発現していた。
- IP<sub>3</sub>産生やIP<sub>3</sub>Rのチャンネル機能を阻害すると神経突起の伸長が阻害された。
- IP<sub>3</sub>R1ノックアウトマウスのDRG細胞は有意に神経突起の伸長が抑制されていた。
- CALI法を用いて成長円錐内のIP<sub>3</sub>R1を局所的に不活性化すると神経突起の伸長が阻害され、一過性に突起が退縮した。
- 細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアからのCa<sup>2+</sup>放出を阻害した条件下で細胞内cGMP濃度を上昇させると神経突起の伸長阻害を有意に緩和した。
- nNOSは成長円錐に存在し、NOSの活性化を阻害すると突起伸長が抑制された。
- 成長円錐内のIP<sub>3</sub>R1を介する細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアからのCa<sup>2+</sup>放出は、神経突起の伸長における重要な制御因子であることが判明した。
- 細胞内カルシウムストアからのCa<sup>2+</sup>放出はNOSを活性化して細胞内cGMPを上昇させて神経突起の伸長を促進すると考えられるシグナル伝達経路の存在が示唆された。

## 【関連参考文献など】

- 1) Takei, K., Shin, R.-M., et al. (1998) Science, 282: 1705-1708.
- 2) Kabayama, H., Takei, K., et al. (1999) Neurosci., 88: 999-1003.
- 3) Takei, K., Chan, T.A., et al. (1999) J. Neurosci., 19: 9469-9479.
- 4) Takei, K., Tokushige, N., et al. (2000) Bioimages, 8 (1), in press.
- 5) 竹居光太郎 (2000) 臨床神経科学 (Clinical Neuroscience) 18 (10), in press.
- 6) 竹居光太郎、御子柴克彦 (1999) 実験医学19 (16) : 73-81.
- 7) 竹居光太郎 (1999) 実験医学17 (14) : 132-140.
- 8) 竹居光太郎 (1999) 実験医学別冊、pp. 170-173.
- 9) 竹居光太郎 (1999) 細胞工学18 (5) : 693-695.



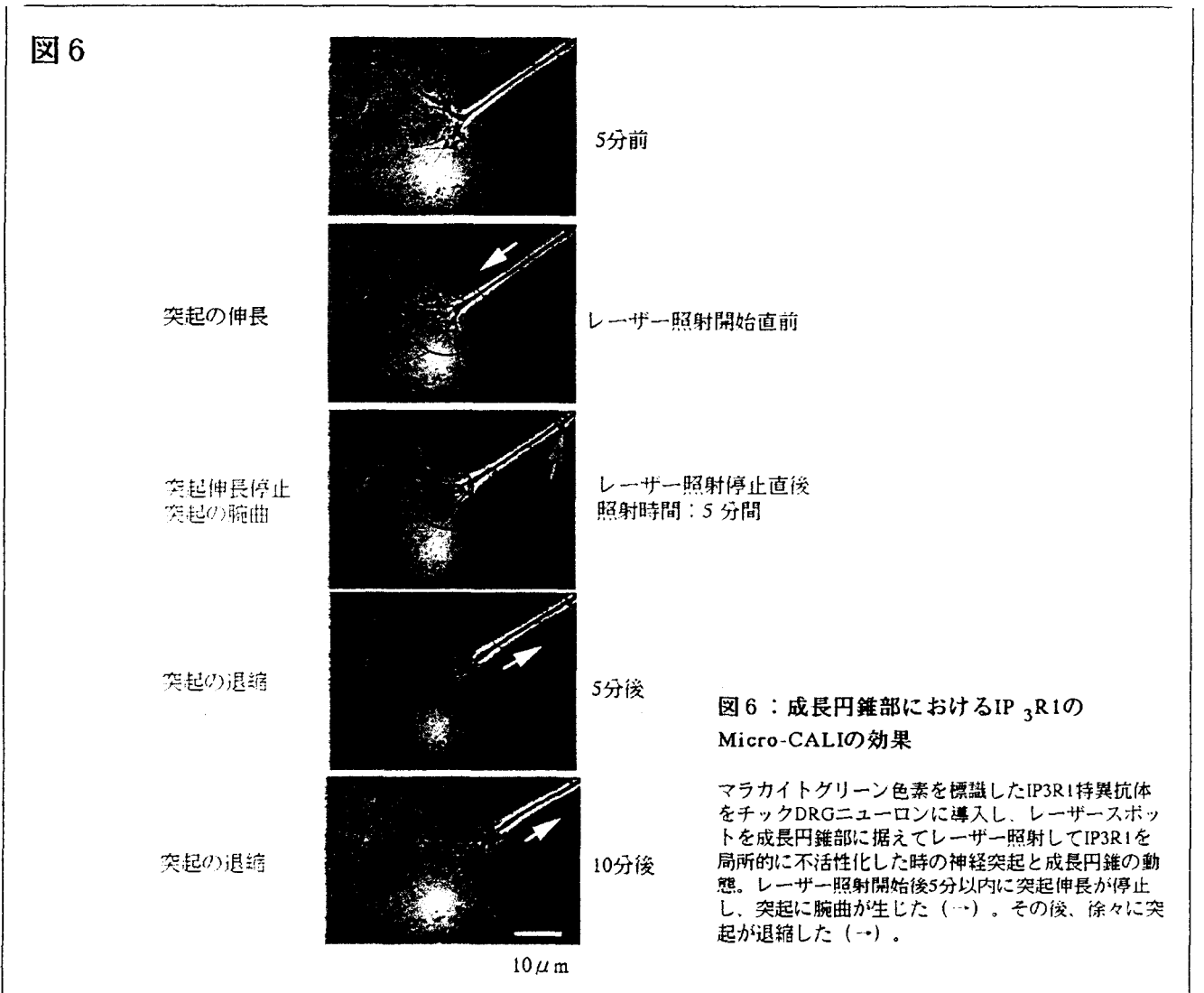
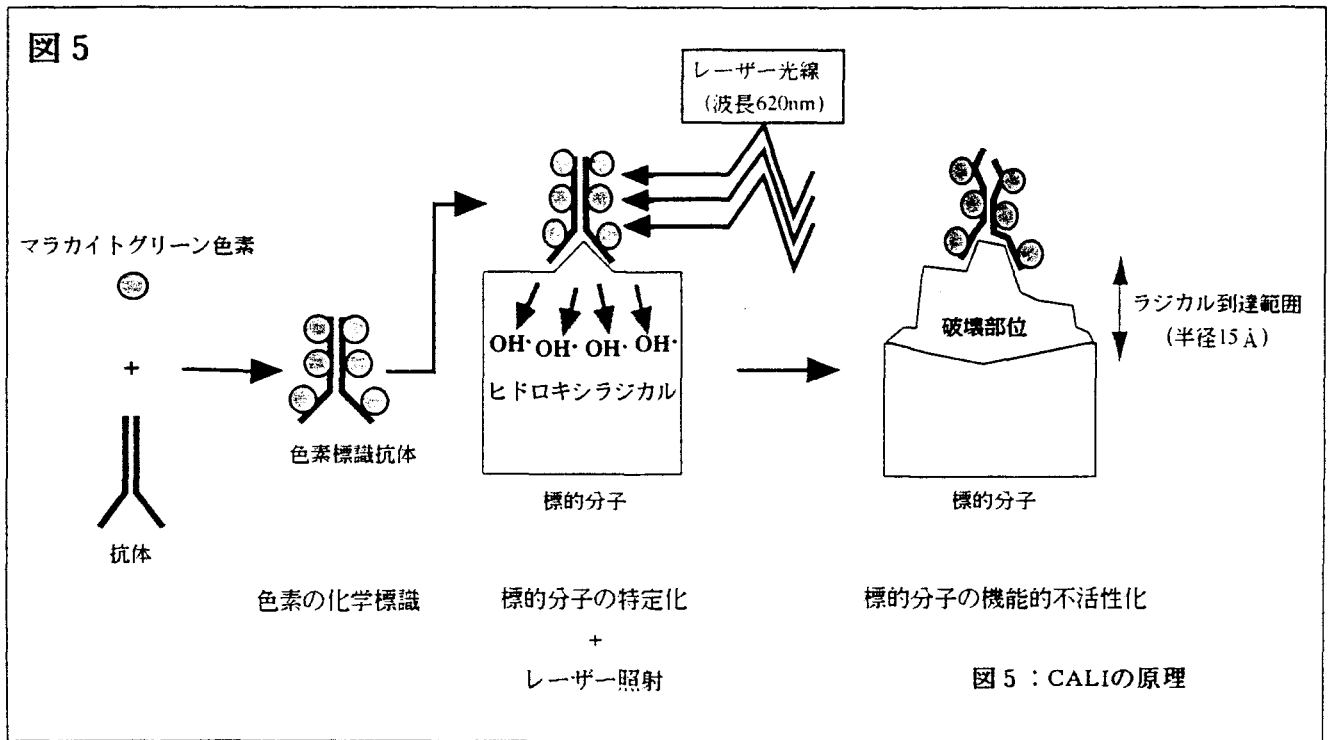


図7

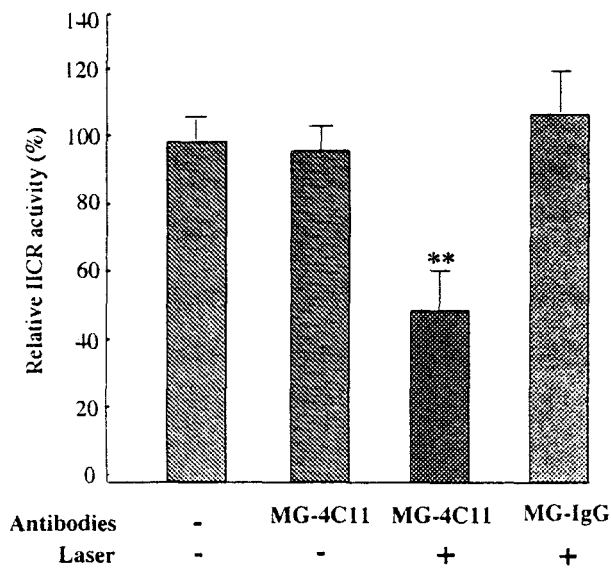


図7：CALI効果の検討

IP3R1を特異的に発現するマウス小脳ミクロソーム分画を用いてIP3-induced calcium release (IICR) におけるCALIの効果を生化学的に検討した。IICR活性は相対値で示してある。CALI用に色素(MG) 標識したIP3R1特異抗体4C11を用いてレーザー照射した場合にのみIICR活性が有意に減少した (\*\*, p<0.01)。

図8

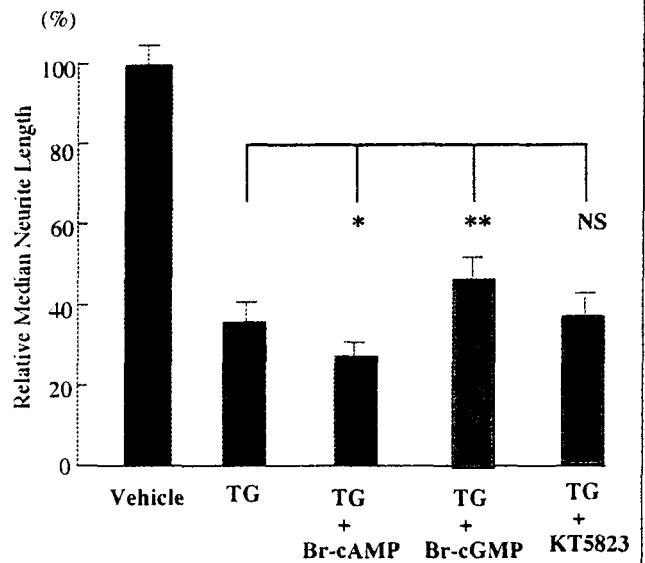


図8：神経突起伸長におけるcAMP / cGMP系の関与

タブシガルジン (TG) で細胞内Ca<sup>2+</sup>を枯渇させた条件下でcAMP、cGMPまたはPKG阻害剤KT5823を与えた場合の突起伸長の比較。cAMPを上昇させるとTGによる突起伸長阻害を有意に増長させたのに対し (\*, p<0.01)、cGMPを上昇させるとTGによる突起伸長阻害が有意に回復する傾向を示した (\*\*, p<0.005)。

図9

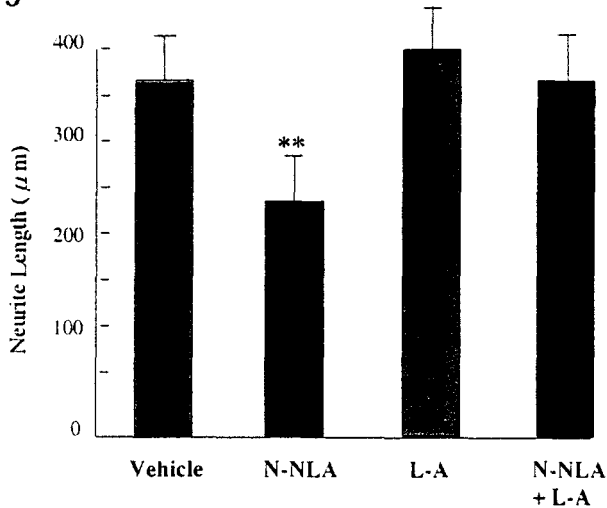


図9：神経突起伸長におけるNOS阻害剤の効果

N-NLAの投与は突起伸長に対して有意に抑制効果を示した (\*\*, p<0.001)。この効果はL-アルギニン (L-A) の過剰投与を伴うと消失した。

図10

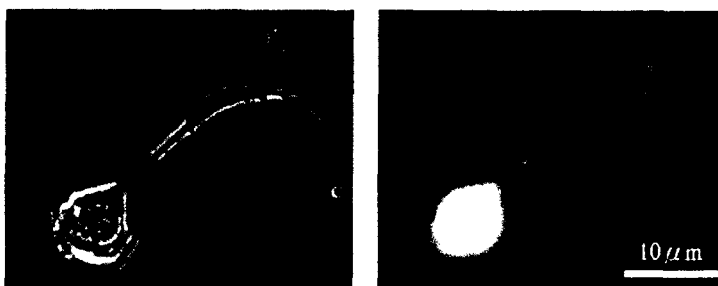


図10：神経型NOSの細胞内分布

チック培養DRGニューロンにおける神経型NOS特異抗体を用いた蛍光抗体法による免疫細胞化学。成長円錐部においても神経型NOSの発現が認められた。