

神経突起伸展と退縮時における
細胞内カルシウムシグナルによる
アクチン細胞骨格制御に関する研究

平成19年度

本間 耕平

目次

第1章 緒言	- 1 -
1.1 神経伝達物質の作用.....	- 1 -
1.1.1 神経伝達物質の発見.....	- 1 -
1.1.2 神経伝達物質の種類.....	- 2 -
1.2 神経伝達物質による細胞内Ca ²⁺ 動員	- 3 -
1.2.1 細胞内Ca ²⁺ 動員と排出	- 3 -
1.2.2 Ca ²⁺ 関連タンパク質	- 4 -
1.3 細胞内Ca ²⁺ によるシグナル伝達	- 5 -
1.3.1 細胞内Ca ²⁺ による遺伝子発現制御	- 5 -
1.3.2 細胞内Ca ²⁺ による細胞骨格制御	- 6 -
1.4 本論文の目的	- 7 -
1.5 本論文の構成.....	- 7 -
第2章 蛍光による細胞内分子動態測定.....	- 15 -
2.1 蛍光イメージング技術.....	- 15 -
2.1.1 蛍光のメカニズム.....	- 15 -
2.1.2 蛍光物質の種類.....	- 15 -
2.1.3 蛍光測定技術.....	- 17 -
2.2 蛍光指示薬による細胞内イオン濃度測定法.....	- 18 -
2.2.1 イオン濃度感受性蛍光指示薬.....	- 18 -
2.2.2 細胞内イオン濃度測定.....	- 19 -
2.3 蛍光タンパク質によるタンパク質動態の測定.....	- 21 -
2.3.1 目的タンパク質遺伝子cDNAのサブクローニング	- 21 -
2.3.2 修飾タンパク質のDNA作製.....	- 21 -
2.4 蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)測定技術	- 22 -
第3章 細胞内Ca ²⁺ による神経突起伸展促進効果.....	- 44 -
3.1 はじめに	- 44 -
3.2 実験方法	- 45 -

3.2.1	細胞培養	- 45 -
3.2.2	神経突起伸展測定.....	- 45 -
3.2.3	細胞内Ca ²⁺ イメージング	- 46 -
3.3	実験結果	- 46 -
3.3.1	神経伝達物質 5-HTによる神経突起伸展促進	- 46 -
3.3.2	5-HTの短期刺激による神経突起伸展促進	- 47 -
3.3.3	神経成長因子(NGF)による分化と 5-HTによるCa ²⁺ 動員	- 47 -
3.3.4	Ca ²⁺ 動員の経路	- 47 -
3.3.5	Ca ²⁺ 動員と神経突起伸展促進	- 48 -
3.3.6	神経突起伸展促進に関わるCa ²⁺ 関連シグナル.....	- 48 -
3.4	考察	- 49 -
3.4.1	5-HT ₃ 型受容体によるCa ²⁺ 動員.....	- 49 -
3.4.2	NGFによる分化における 5-HTによるCa ²⁺ 動員増強.....	- 49 -
3.4.3	Calcineurinを活性化による神経突起伸展の促進	- 49 -
3.4.4	生体内における 5-HTの神経突起伸展への影響	- 50 -
3.5	第3章のまとめ.....	- 51 -
第4章	細胞内Ca ²⁺ によるアクチン細胞骨格の制御.....	- 61 -
4.1	はじめに	- 61 -
4.2	実験方法	- 62 -
4.2.1	蛍光融合タンパク質の作製.....	- 62 -
4.2.2	細胞培養と遺伝子導入.....	- 62 -
4.2.3	タイムラプスビデオ蛍光観察.....	- 63 -
4.2.4	細胞内イオン濃度測定.....	- 63 -
4.2.5	FRET測定.....	- 64 -
4.2.6	ウェスタンブロッティング法.....	- 64 -
4.3	実験結果	- 65 -
4.3.1	融合タンパク質Cofilin-Venusの作製	- 65 -
4.3.2	ATP刺激によるコフィリンロッド形成.....	- 65 -
4.3.3	コフィリンロッドによるアクチン細胞骨格の再編成.....	- 65 -
4.3.4	FRETによるコフィリン-アクチン相互作用の測定	- 66 -
4.3.5	ATPによるCa ²⁺ 動員	- 66 -
4.3.6	Ca ²⁺ 動員とコフィリンロッド形成	- 66 -
4.3.7	コフィリンロッド形成に関わるCa ²⁺ 関連シグナル.....	- 67 -
4.4	考察	- 67 -
4.4.1	ATP刺激によるコフィリン-アクチンロッド形成.....	- 67 -
4.4.2	ATPによるCa ²⁺ 動員で誘導されるコフィリンロッド形成.....	- 68 -

4.4.3 コフィリンロッド形成へのP2X受容体の関与.....	- 69 -
4.4.4 Calcineurinの活性化とコフィリンロッド形成.....	- 69 -
4.5 第4章のまとめ.....	- 70 -
第5章 結言.....	- 85 -
5.1 結果のまとめ.....	- 85 -
5.2 NGFシグナルと細胞内Ca ²⁺ による神経突起伸展制御.....	- 86 -
5.3 Rhoファミリーシグナルと細胞内Ca ²⁺ による細胞骨格制御.....	- 87 -
5.4 FRETによる細胞内シグナル測定.....	- 88 -
5.5 本研究の意義と今後の展望.....	- 88 -
5.4 本研究の結言.....	- 89 -
参考文献.....	- 93 -

公刊論文目録および口頭発表目録

謝辞

略語一覽

5-HT: 5-hydroxytryptamine (serotonin)
ADF: actin depolymerizing factor
AP-1: activator protein-1
ATP: adenosine 5'-triphosphate
Arp2/3: actin-related protein 2/3
BDNF: brain-derived neurotrophic factor
CBP: CREB-binding protein
CICR: calcium-induced calcium release
CK: casein kinase
CRE: cAMP response element
CREB: CRE-binding protein
CaM: calmodulin
CaMK: calmodulin-dependent kinase
CaN: calcineurin
CaRE: calcium response element
DG: diacylglycerol
DMEM: Dulbecco's modified Eargle's medium
DRE: downstream regulatory element
DREAM: DRE antagonist modulator
Drf: diaphanous-related formin
EPSP: excitatory postsynaptic potential
ER: endoplasmic reticulum
ERK: extracellular signal-regulated kinase
FRET: fluorescence resonance energy transfer
GAP-43: growth associated protein-43
GDI: guanine nucleotide dissociation inhibitor
GEF: guanine nucleotide exchange factor
GFP: green fluorescence protein
GPCR: G-protein coupled receptor

Gp: G-protein
IEG: immediate early gene
IP₃: inositol-trisphosphate
IPSP: inhibitory postsynaptic potential
IRS: insulin receptor substrate
ITR: ionotropic receptor
JNK: c-jun N-terminal kinase
KRH: Krebs-Ringer-HEPES
LIMK: LIM domain kinase
MAP2: microtubule associate protein-2
MARKS: myristoylated alanine-rich C kinase substrate
mDia: mammalian diaphanous
MEK: MAPK-kinase
MLCK: myosin light chain kinase
NFAT: nuclear factor of activated T cell
NGF: nerve growth factor
PAK: p21-activated kinase
PC12: pheochromocytoma
PCR: polymerase chain reaction
PI4P5K: phosphatidylinositol 4-phosphate 5 kinase
PIP₂: phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate
PKC: protein kinase C
PLC: phospholipase-C
ROCK: Rho-associated kinase
Ras-GRF: Ras guanin-nucleotide release factor
SRE: serum response element
SRF: serum response factor
SSH: slingshot
TESK: testis-specific protein kinase
TIRF: total internal reflection fluorescence
Trk: tropomyosin receptor kinase
VDCC: voltage-dependent calcium channel
WASP: Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE: WASP family verprolin-homologous protein
[Ca²⁺]_i: intracellular calcium ion concentration

第1章 緒言

本論文では、神経伝達物質であるセロトニン（5-HT）とアデノシン3リン酸（ATP）によって誘導される細胞内Ca²⁺動員が引き起こすシグナル伝達が神経細胞の突起伸長に及ぼす影響について議論する。そこで、本章ではまず、神経伝達物質の概念とその作用についてまとめ、神経伝達物質の引き起こす細胞内Ca²⁺動員のメカニズムとシグナル伝達経路について概説する。

1.1 神経伝達物質の作用

1.1.1 神経伝達物質の発見

神経伝達物質の概念、すなわち化学的シナプス伝達を初めて提唱したのは、Thomas Renton Elliottといわれる。Elliottは、1904年英国生理学会にて、末梢交感神経を刺激したときの効果がアドレナリンを注射したときの反応と酷似していることを発表した。その後、実験的な証明は1921年のLoewiの実験によってなされた。Loewiはカエルの心臓灌流実験において、支配神経を刺激して心臓活動が抑制されるときには、神経伝達物質（Daleが後にアセチルコリンと確認）が放出されており、活動が促進されているときにはアドレナリン様物質（後にノルアドレナリンと判明）が放出されていることを明らかにした。

これらの実験結果が出てきてはいたが、1930-1940年代にかけて、神経筋接合部における情報伝達が化学物質によるか電気的なシグナルによるかという論争（化学説—電気説論争）が続けられており、その時点では神経伝達物質の役割は明確ではなかった。1950年代になると、電子顕微鏡の発明によりシナプスの微細構造が明らかになったことと、細胞内微小電極の開発により局所的な神経伝達物質の適用による電位変化が測定され、ようやく論争の決着がついた。

神経筋接合部において神経伝達物質が小胞から放出されるという小胞仮説を初めて提唱したのはKatzらである。彼らは、カエルの神経筋接合部で一定量のアセチルコリンの集団的な素量的放出（quantal release）が起こることを細胞内微小電極による脱分極測定から明らか

にした。また、神経筋伝達に Ca^{2+} が必要であることは19世紀から既知であったが、Katzらはカエルの神経筋接合部やヤリイカの星状神経節の巨大シナプスにおける神経伝達物質の放出でシナプス前終末の脱分極により Ca^{2+} の透過性が上がり、 Ca^{2+} 濃度が増加すること、シナプス前終末に Ca^{2+} を泳動的に注入すると伝達物質の放出が起こることを明らかにした。

1933年、Daleはアセチルコリンを伝達物質とする神経伝達をコリン作動性 (cholinergic) 伝達、アドレナリン様物質によるものをアドレナリン作動性 (adrenergic) 伝達と呼ぶことを提唱し、解剖学的分類とは別に、神経伝達物質の種類による生化学的性質によって分類し、新しい視点で神経系を捉えなおした。また、神経の含有する神経伝達物質について、Daleは一つのニューロンから同じ物質が放出される可能性を指摘した。この後、Ecclesらは脊髄前角運動ニューロンの逆方向性抑制の機序が、Renshaw細胞の同じ伝達物質 (アセチルコリン) によって起こることなどの知見から“一つのニューロンから同じ伝達物質が放出されること”をDaleの法則 (Dale's principle) と呼ぶことを提唱した。これは必ずしも“一つのニューロンは一種類の神経伝達物質しか放出しない”という意味ではない。今日では、アセチルコリンとペプチド伝達物質、ノルアドレナリンとATPなど、複数の伝達物質が同時に放出されることも確認されており、“一つのニューロン内における神経伝達物質の組み合わせは同一である”という意味で解されている。

1.1.2 神経伝達物質の種類

神経伝達物質の条件として次のような性質が挙げられる。

- 1) 神経細胞のシナプス前終末部に局在している。
- 2) 神経伝達物質の前駆物質と生合成酵素がシナプス前終末部に存在する。
- 3) 神経刺激によって神経伝達物質の生理的に有効な量の放出が起こる。
- 4) シナプスへ直接に物質を作用させると神経入力側を刺激した場合と同じ反応を起こす。
- 5) 神経終末部に近接して特異的な受容体が存在する。
- 6) 神経伝達物質が受容体と結合すると、EPSP (excitatory postsynaptic potential) やIPSP (inhibitory postsynaptic potential) が発生する。
- 7) その物質の受容体との作用を生理的に必要な時間で終了させるような、特異的な不活性化の機序を持つ。
- 8) シナプス後部で何らかの阻害または不活性化したときの効果は、神経刺激でも伝達物質による刺激でも差が見られない。

(神経伝達物質—アミノ酸とアミン, 高垣玄吉郎, 永津俊治編, 1981)

神経伝達物質と極めて類似しているが、シナプス伝達に直接には関与していない物質を神経修飾物質として区別されているが、神経伝達物質、神経修飾物質の両方の性質を持つ物質も多く存在する。

神経伝達物質とホルモンの類似点も多く認められる。ホルモンはホルモン産生細胞 (内

分泌細胞)で前駆物質より特異的生合成酵素によって産生され、血中に分泌されて血流によって特定の受動細胞にある特異的な受容体と結合して生理作用を発現する物質と定義される。しかし、実際には、神経伝達物質としてもホルモンとしても作用する物質も多く存在する(表1.1)。

1.2 神経伝達物質による細胞内Ca²⁺動員

歴史的には、Ca²⁺が細胞内の情報伝達に必要なであると初めて報告したのは、1882年 Ringer である。彼はカエルの心臓の収縮に細胞外 Ca²⁺が必須であることを示した。しばらくして後、1928年 Heilbrunn が、細胞の部分損傷実験における観察により、Ca²⁺が細胞の様々な生理過程において役割を担っていることを提唱した。しかし実際に Ca²⁺による細胞応答の分子機構が初めて明らかになったのは、江橋によって骨格筋のトロポニンに対する Ca²⁺の制御が発見されたときと言える(Ebashi et al., 1967)。その後、垣内らによって Ca²⁺結合タンパク質である calmodulin が発見され(Kakiuchi and Yamazaki, 1970)、非筋細胞でも Ca²⁺が細胞内シグナルとして機能することが明らかになった。また西塚らによるプロテインキナーゼ C (PKC) の発見や(Takai et al., 1977)、イノシトールリン脂質による Ca²⁺動員経路が解明されるなどを経て(Guillemette et al., 1987)、細胞外刺激に対する細胞内 Ca²⁺動員の重要性が明らかになってきた。

1.2.1 細胞内Ca²⁺動員と排出

細胞外からのCa²⁺流入

細胞外のCa²⁺濃度は1 mM以上であるのに対して、細胞内のCa²⁺濃度は50 nM程度に低く抑えられている。このため、Ca²⁺チャネルのようなCa²⁺の通過孔が開くと濃度勾配に従って細胞内にCa²⁺が流入する。Ca²⁺チャネルは、神経伝達物質などの各種リガンドが結合することによって開く受容体作動性Ca²⁺チャネル、細胞膜の脱分極によって開く電位依存性Ca²⁺チャネル、細胞の伸展などに応じる機械感受性チャネルなどがある。

細胞内Ca²⁺ストアからのCa²⁺放出

各種リガンドに対する代謝型受容体が活性化されると、Gタンパクを介してホスホリパーゼC (PLC) が活性化され、これによりイノシトール三リン酸 (IP₃) が産生される。滑面小胞体上にはIP₃受容体が存在し、この受容体が開くことによって小胞内からCa²⁺が放出される。またIP₃受容体はCa²⁺濃度によっても活性化され、Ca²⁺誘導性Ca²⁺放出 (Ca²⁺ induced Ca²⁺ release; CICR) も引き起こすことが知られる。また、IP₃受容体と類似した一次構造を持つ、リアノジン受容体もCICRを引き起こす受容体である。ミトコンドリアも細胞内Ca²⁺ストア

であると考えられており、細胞内Ca²⁺動態への役割が示唆されている。

Ca²⁺排出機構

細胞内Ca²⁺濃度が上昇すると、Ca²⁺の排出機構がすぐに働きはじめる。細胞膜上及び小胞体膜上にはCa²⁺ポンプが存在しており、ATPを利用して濃度勾配に逆らってCa²⁺を細胞外に汲み出したり、小胞体内に取り込んだりする。また、Na⁺-Ca²⁺交換体はNa⁺の濃度勾配を利用してCa²⁺を排出する。細胞内Ca²⁺が一定のリズムで変動するCa²⁺オシレーションやCa²⁺ウェーブを起こすにはこれらCa²⁺排出機構は必須である。

1.2.2 Ca²⁺関連タンパク質

細胞内Ca²⁺動員は、多くの生理過程に関わっているが、この作用はCa²⁺結合タンパク質を介したシグナル伝達による。Ca²⁺結合タンパク質は大きく以下のように分類できる。

1) EFハンドタンパク質

Kretsingerらがパルブアルブミンの構造解析の結果命名した。現在これに属する多くのタンパク質が発見されている。

2) Ca²⁺/リン脂質結合タンパク質

Conventional PKC (cPKC) はCa²⁺/リン脂質が結合するC2部位をもつ（それ以外のPKCはC2部位を持たない）。その他、PLC, synaptotagmin, annexinなどがある。

3) γ -カルボキシグルタミン酸含有タンパク質

血中に含まれる血液凝固因子、骨組織に含まれるオステオカルシンなど、Ca²⁺は γ -カルボキシグルタミン酸に結合し、もう一方でリン脂質のリン酸基と結合し、タンパク質-リン脂質を架橋していると考えられている。

4) リン酸含有タンパク質

カゼイン、ホスビチンなど、唾液、消化液、血液、骨、卵、ミルクなどに含まれるタンパク質でタンパク質-リン脂質と相互作用して結合している。

5) Ca²⁺貯蔵タンパク質

横紋筋小胞体にあるcalsequestrinや、平滑筋や非筋肉系組織の小胞体にあるcalreticulin, endoplasmic reticulumなど、これらのタンパク質はCa²⁺との親和性は低いが多量のCa²⁺との結合部位が存在する。

(カルシウムイオンとシグナル伝達, 御子柴克彦, 遠藤實, 宮本英七編, 1998)

これまでに明らかになってきた膨大なCa²⁺関連タンパク質の中で、ここでは特に本研究での細胞内Ca²⁺動員に関連する、EFハンドタンパク質と(表1.2, 表1.3), このタンパク質に属するcalmodulinにさらに結合するタンパク質を示した(表1.4)。

Calmodulinは、Ca²⁺依存性の生理過程の多くに関与していることがわかっている。Calmodulinは、N, C末端にそれぞれ2つのEFハンド構造をもち、各EFハンド構造にCa²⁺が結

合するので、一分子に計4つの Ca^{2+} が結合する。Calmodulinは Ca^{2+} と結合してコンフォメーション変化することで活性型になる。多くの場合、活性型calmodulinは、他のタンパク質に結合して、その標的タンパク質の活性を変化させる。Calmodulinは、calmodulin dependent kinase II (CaMK II) によるタンパク質リン酸化や、calcineurinによる脱リン酸化によって転写制御することが知られている。また、Calmodulinは、直接的な細胞骨格タンパク質への結合や、間接的なCaMK II やcalcineurinなどを介して、細胞骨格系を制御する。

1.3 細胞内 Ca^{2+} によるシグナル伝達

細胞内 Ca^{2+} は、筋肉の収縮、エキソサイトーシス、視覚機能、受精・発生、血小板活性化、アポトーシスなど、多種多様な生体機能のシグナルに関わっているが、ここでは特に本研究に関連する細胞内 Ca^{2+} の遺伝子発現制御と細胞骨格制御について概説する。

1.3.1 細胞内 Ca^{2+} による遺伝子発現制御

最初期遺伝子 (immediate early gene; IEG) である *fos* ファミリーと *jun* ファミリーは、成長因子添加後数分に発現が誘導される。 Ca^{2+} による遺伝子発現の例として、このファミリーの中で *c-fos* がよく調べられている。この遺伝子のプロモーター領域には Ca^{2+} 応答配列 (calcium response element, CaRE: TGACGTTT) がある。この配列は cAMP 応答配列 (cAMP response element, CRE: TGACGTCA) と相同性が高く、CREB (CRE-binding protein) も同じように認識する。ラット褐色細胞種である PC12 細胞を用いた研究から、細胞内 Ca^{2+} 動員により calmodulin が活性化し、CaMK を活性化させ、さらにこれが CREB をリン酸化すなわち活性化して *c-fos* 遺伝子の転写を引き起こすことが示された (Sheng et al., 1991)。なお Ca^{2+} による *c-fos* 遺伝子の発現には、血清応答配列 (serum response element, SRE) に結合する SRF (serum response factor) も関与していることが明らかになっている (Bading and Greenberg, 1991; Gille et al., 1992)。このシグナル経路には ERK (extracellular signal-regulated kinase) と CaMK が関与していると考えられている。

一方、タンパク質の脱リン酸化を引き起こす calcineurin も CREB とは別の経路で遺伝子発現を引き起こすことが知られている。例えば、小脳顆粒細胞で、 Ca^{2+} 濃度上昇による calcineurin の活性化によって、細胞増殖、細胞遊走、神経突起伸展など、未分化な神経細胞に関連する遺伝子が発現されるが、calcineurin を阻害すると、シナプス伝達などの既に分化した神経細胞に関わる遺伝子が発現される (Nakanishi and Okazawa, 2006)。また calcineurin の活性化によって IP_3 受容体、 Ca^{2+} ポンプが発現されてくることも明らかになっている (Carafoli et al., 1999)。しかし、これらの遺伝子発現制御に関わるタンパク質については明らかではない。calcineurin によって転写因子である NFAT (nuclear factor of activated T cell) が脱リン酸化

して核移行が促進されるが(Canellada et al., 2006; Graef et al., 2003; Shibasaki et al., 1996), 小脳顆粒細胞においてもこのような機構が働いているのかもしれない。また, EF ハンドタンパク質に属する転写抑制因子 DREAM (downstream regulatory element antagonist modulator) に細胞内 Ca^{2+} が結合することによって直接的に転写を制御する機構が明らかになっている (Carrion et al., 1999). このように Ca^{2+} による遺伝子発現には, いくつかのタンパク質を介したシグナルが複合的に組み合わさっていると考えられる. (図 1.1)

1.3.2 細胞内 Ca^{2+} による細胞骨格制御

Ca^{2+} は直接的に (表 1.2, 表 1.3), あるいは calmodulin 等の Ca^{2+} 結合タンパク質を介して (表 1.4), いくつかの細胞骨格タンパク質を制御し, 神経突起伸展などに影響を与えると考えられている (図 1.2).

Myosin light chain kinase (MLCK) は, Ca^{2+} と calmodulin が結合することによって活性化して, 神経突起の先端の成長円錐の動態を制御している (Jian et al., 1994). MLCK は PKC, CaMK II などによるリン酸化によって calmodulin との結合が抑制される (Ikebe et al., 1985; Ikebe and Reardon, 1990). Calpain は Ca^{2+} によって活性化されるプロテアーゼであり, 成長円錐の先端のフィロポディアに起こる Ca^{2+} ウェーブにより活性化されフィロポディアを退縮させることが示されている (Robles et al., 2003). Calpain は脳スペクトリン (calspectin, fodrin) などの細胞膜裏打ち構造を形成するタンパク質複合体を分解すると考えられている (Sobue et al., 1982). PKC はラット胎児脳における Semaphorin 3A による成長円錐の退縮に関係している (Mikule et al., 2003). また PKC の阻害剤は, GABA 受容体のアゴニストなどによる成長円錐のターニング応答を反発から誘引に転向させる (Xiang et al., 2002). このターニング応答の転向には, 成長円錐内の cAMP や cGMP の割合が関係していると考えられている (Nishiyama et al., 2003).

Calmodulin は, calmodulin が直接結合するか, calmodulin 依存性の酵素活性によって, (または両方の制御によって) 細胞骨格を制御している.

Caldesmon は, アクチンフィラメントと結合してアクチン-ミオシン相互作用を抑制するが, この結合は Ca^{2+} 活性化 calmodulin によって阻害される (Sobue et al., 1985). MAP2 (microtubule associate protein-2) と tau タンパク質は, 微小管を構成する tubulin に結合し, 微小管重合を促進するが, Ca^{2+} 活性化 calmodulin との結合や CaMK II などによるリン酸化によって重合能が抑制される (Sobue et al., 1981). GAP-43 (growth associated protein) は, アクチンキャップタンパク質でありアクチンフィラメントの伸長を阻害するが, PKC によるリン酸化によりアクチンのキャップはできなくなり, 伸長を促進する (He et al., 1997). GAP-43 のリン酸化は calmodulin と結合すると抑制される (Alexander et al., 1988). また, リン酸化された GAP-43 は, calcineurin によって脱リン酸化されることも知られている (Lautermilch and Spitzer, 2000). MARKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) はアクチンフィラメン

トの脱重合を引き起こすが(Mikule et al., 2003), PKCによるリン酸化によってタンパク質の機能の一部は抑制される. Calmodulin との結合により, MARKS のリン酸化が阻害される(Graff et al., 1989).

Calmodulin は CaMK II や calcineurin を活性化させるが, CaMK II は, 細胞接着因子や FGF (fibroblast growth factor) による神経突起伸長促進効果に関わっている(Williams et al., 1995). また calcineurin は, *Xenopus* 脊髄神経細胞の自発的 Ca^{2+} スパイクによる神経突起伸長速度低下に関わっている(Lautermilch and Spitzer, 2000). 最近 calcineurin は, Slingshot (SSH) というタンパク質を脱リン酸化して活性化することが分かった(Wang et al., 2005). SSH は, アクチンフィラメントを脱重合する ADF/cofilin を脱リン酸化させることによって活性化させる(Niwa et al., 2002).

以上のように, 遺伝子発現制御や細胞骨格制御において, 個々の現象に対する細胞内カルシウムの役割は明らかになってきているが, これらのカルシウムシグナルがどのように統合されて神経突起の伸長または退縮を制御しているかについては未だ明らかではない. 本論文では特にカルシウム関連タンパク質として, calmodulin, calcineurin の経路に注目して, これらの制御系による現象について調べた.

1.4 本論文の目的

細胞内 Ca^{2+} シグナルは, 神経発生において神経突起伸展を促進するときもあれば, 逆に退縮させるときもある. しかし, このシグナルが細胞内でどのように逆の現象を制御しているかについては明らかではない. 本論文では, PC12細胞を用いて細胞内 Ca^{2+} を動員する神経伝達物質である 5-HT と ATP の刺激による長期的な神経突起伸展促進と短期的な退縮のシグナル伝達について調べることによって, 同様の細胞内 Ca^{2+} 動員を引き起こす二つの神経伝達物質がそれぞれどのようなメカニズムで神経突起の伸展を制御しているかを明らかにする.

1.5 本論文の構成

第1章は緒言で, 神経伝達物質の役割と神経伝達物質が引き起こす細胞内 Ca^{2+} シグナルについて従来の研究をまとめ, 本研究の背景を説明した.

第2章では, 蛍光による細胞内分子動態測定法として本研究で用いた, 蛍光指示薬に

よる細胞内イオン濃度測定, 蛍光タンパク質を用いたタンパク質動態解析, 蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を利用したタンパク質-タンパク質の相互作用解析法について説明した.

第3章では, 5-HTの細胞内 Ca^{2+} 動員による神経突起伸展促進効果について議論した. 5-HTによる細胞内 Ca^{2+} 動員は, NGFによる分化誘導により増大するが, この細胞内 Ca^{2+} 動員は, イオンチャネル型受容体である 5-HT₃ 型受容体の活性化によって膜電位が脱分極し, 細胞膜上の電位依存性 Ca^{2+} チャネルが開くことによって起こることを, Ca^{2+} イメージングを用いて薬理的に示した. また, 5-HTによる NGF 神経突起伸展の促進は, 先に示した 5-HT₃ 型受容体, 電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介した細胞内 Ca^{2+} 動員に依存すること, さらに Ca^{2+} シグナルの下流にある calmodulin と calcineurin が神経突起伸展促進効果に関わっていることを示した.

第4章では, ATP刺激に伴う細胞内 Ca^{2+} 動員によるアクチン細胞骨格制御について議論した. ATPはP2X受容体とP2Y受容体によって細胞内 Ca^{2+} 動員を引き起こす. そこでATPがP2X受容体を介した細胞内 Ca^{2+} 動員によって, アクチン結合タンパク質であるコフィリンを活性化し, コフィリン-アクチンの結合を促進することを Ca^{2+} イメージングとCofilin-Venusの蛍光タンパク質動態解析によって明らかにした. また, Cofilin-VenusとCerulean-actinの共発現によるコフィリンとアクチンの同時可視化からアクチン細胞骨格の再編成が起こることを示し, コフィリン-アクチンの結合の割合をFRETによって見積ることに成功した. また, コフィリン-アクチンの結合促進には, calmodulin と calcineurin が関与していることを薬理的解析から明らかにした.

第5章では本研究を総括し, 5-HTとATPによる細胞内 Ca^{2+} シグナルの神経突起の伸展・退縮を制御する遺伝子発現と細胞骨格制御について議論した.

表1.1 神経伝達物質一覧

化学的分類	神経伝達物質/ホルモン	ホルモン	神経伝達物質
アミン系	ドーパミン		◎
	ノルアドレナリン(ノルエピネフリン)	◎	◎
	アドレナリン(エピネフリン)	◎	◎
	チラミン		○
	オクトパミン		○
	フェニルエチルアミン		○
	フェニルエタノールアミン		○
	セロトニン	◎	◎
	トリプタミン		○
	ジメチルトリプタミン		○
	5-メトキシトリプタミン		○
	ヒスタミン	◎	◎
	アセチルコリン		◎
アミノ酸系	γ-アミノ酪酸(GABA)		◎
	グルタミン酸		◎
	アスパラギン酸		○
	グリシン		○
	タウリン		○
	セリン		○
	プロリン		○
プリン系	アデノシン		◎
	ATP		◎
脂肪酸系	プロスタグランジン類	◎	○
ペプチド系	エンケファリン		○
	エンドルフィン		○
	サブスタンスP		◎
	ニューロテンシン		○
	ボンベシン		○
	カルノシン		○
	アンジオテンシンII	◎	○

(◎ : 比較的明確なもの, ○ : 推定されるもの)

神経伝達物質-アミノ酸とアミン, 高垣玄吉郎, 永津俊治, 1981より抜粋

表1.2 哺乳動物のEFハンドタンパク質（単独型）

タンパク質名	機能
<細胞内>	
calbindin family	ビタミンDにより誘導
calcineurin family	ホスファターゼ2Bの制御サブユニット
calcium-binding protein p22	イオン輸送の制御
calcyphosine (CCBP-23)	cAMP-Ca ²⁺ PI経路に関連
calmodulin, NB-1	多機能性調節タンパク質
caltractin/centrin, caltractin2	細胞骨格タンパク質, 中心体や紡錘体
myosin regulatory light chain 2 family	ミオシンATPaseの制御
parvalbumin family	骨格筋の弛緩に関連
GCAP1,2	cGMPの合成を刺激, GCの制御
hippocalcin	海馬での情報伝達に関連
NCS-1	K ⁺ チャネルの制御
recoverin	ロドプシンのリン酸化の阻害 (桿体細胞)
visinin like 1-3	ロドプシンのリン酸化の制御 (錐体細胞)
sorcin family	膜結合性制御因子
S100 family	多機能性調節タンパク質
SNK interacting protein 2-28	インテグリン α IIb結合タンパク質
troponin C family	筋収縮のCa ²⁺ センサー
<小胞体・ゴルジ>	
ERC55, reticulocalbin	His-Asp-Glu-Leu型の小胞体局在
calumenin	His-Asp-Glu-Phe型の小胞体局在
cab45/SDF4	ゴルジ・小胞体でのCa ²⁺ 依存性活性制御

カルシウムイオンとシグナル伝達, 御子柴克彦・遠藤實・宮本英七編, 1998より作成

表1.3 哺乳動物のEFハンドタンパク質（複合型）

タンパク質名	機能
<細胞外>	
BM-40/SPARC/osteonectin	リン酸化タンパク質
SC1	マトリックス糖タンパク質
thrombospondin 4	糖タンパク質, 細胞接着に関与
cartilage oligomeric matrix protein	マトリックスタンパク質
trichohyalin	毛包に存在
repetin	角質化した細胞の外被に存在
profilaggrin	上皮のケラトヒアリン顆粒に存在
vitronectin receptor α (integrin α V)	膜タンパク質
<細胞内>	
α actinin 1	F-アクチンクロスリンクタンパク質
plastin T, I, L	アクチン結合タンパク質
calpain family	Ca ²⁺ 依存性システインプロテアーゼ
diacylglycerol kinase α, β, γ	情報伝達に関連, 膜結合性
EGF receptor substrate 15	チロシンキナーゼの基質, 細胞増殖に関連
Erb2	チロシンキナーゼ, 膜タンパク質
major vault protein (mvp)	5%は核孔に存在する
phospholipase C γ, δ	情報伝達に関連, 膜結合性
protein phosphatase PP2A	セリンスレオニンホスファターゼ
spectrin α , brain type	細胞骨格タンパク質
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase t-3	ユビキチンC末端チオエステル水解酵素
<核>	
nucleobindin, NEFA	細胞質にも存在, 細胞外にも分泌される
probable transcription factor PML-2	転写因子
DNA-directed RNA polymerase II 33kD	mRNA合成酵素
zinc finger protein hrx (all-1)	転写因子
<ミトコンドリア>	
glycerol-3-phosphate dehydrogenase	エネルギー代謝酵素
mitochondrial stress-70 protein (hsp a9)	熱ショックタンパク質

カルシウムイオンとシグナル伝達, 御子柴克彦・遠藤實・宮本英七編, 1998より作成

表1.4 Calmodulin結合タンパク質

タンパク質名	機能
caldesmon	アクチン-ミオシン制御因子
MAP2	微小管重合制御
tau protein	微小管重合制御
spectrin (calstectin, fodrin)	細胞膜裏打ちタンパク質
synapsin I	シナプス小胞放出関連タンパク質
4.1 protein	細胞骨格タンパク質
GAP-43 (neuromodulin)	アクチンフィラメントキャップタンパク質
MARKS	アクチンフィラメント脱重合
myosin V	細胞内輸送
EGF receptor	EGFシグナル伝達
Insulin receptor	インスリンシグナル伝達
Insulin receptor substrate (IRS-1)	インスリン関連シグナル伝達
Ras-GAP protein	Rasシグナル伝達
NMDA receptor	グルタミン酸シグナル伝達
mGlu receptor	グルタミン酸シグナル伝達
Ca ²⁺ -ATPase	Ca ²⁺ ポンプ
IP ₃ receptor	細胞内ストアからのCa ²⁺ 動員
ryanodine receptor	細胞内ストアからのCa ²⁺ 動員
adenylyl cyclase	cAMP産生
phosphodiesterase	リン酸ジエステル加水分解
NO synthetase	NO産生
CaMK I, II, IV	タンパク質リン酸化
MLCK	ミオシン活性制御
phosphorylase kinase	セリンスレオニンキナーゼ
calcineurin	ホスファターゼ

カルシウムイオンとシグナル伝達, 御子柴克彦・遠藤實・宮本英七編, 1998より作成

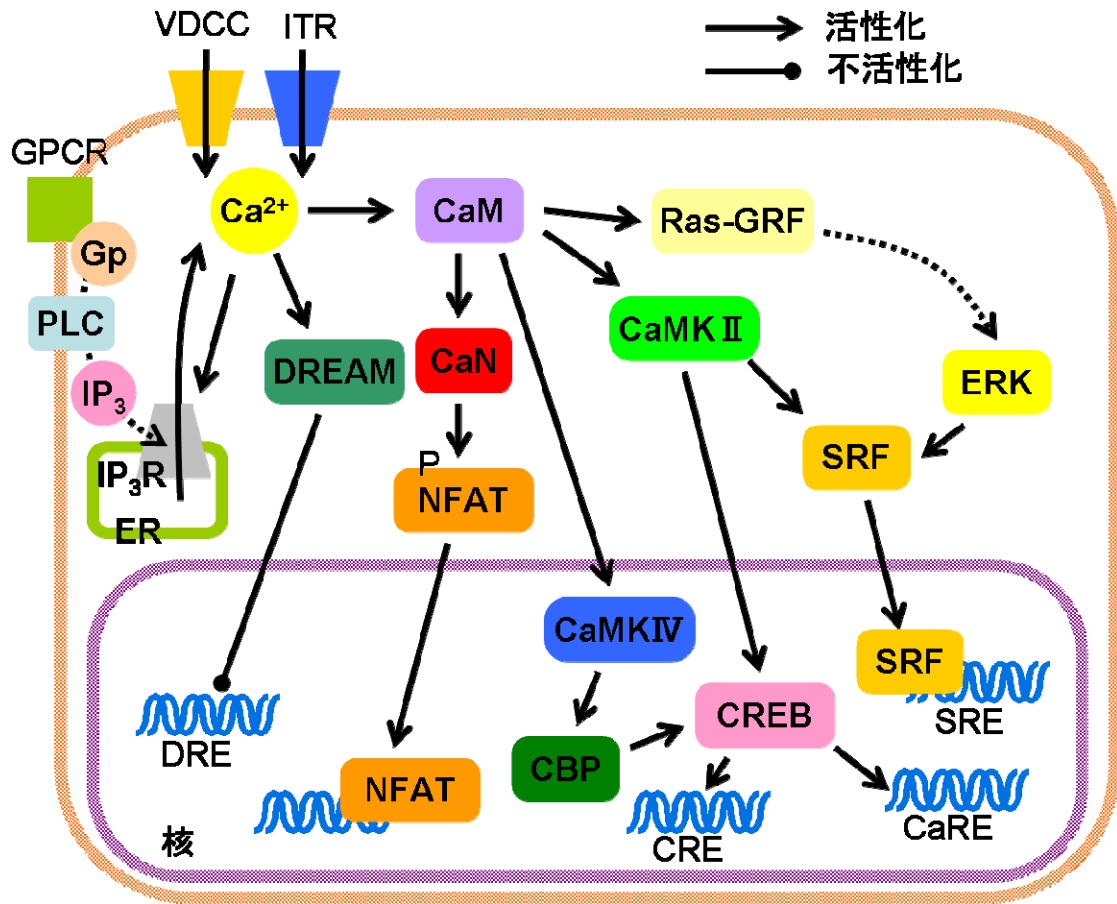


図1.1 Ca^{2+} シグナルによる遺伝子発現制御

カルシウムイオンとシグナル伝達, 御子柴克彦・遠藤實・宮本英七編, 1998

(Nakanishi and Okazawa, 2006)

より作成

VDCC, voltage-dependent calcium channel; ITR, ionotropic receptor; GPCR, G-protein coupled receptor; Gp, G-protein; CaM, calmodulin; CaN, calcineurin, CaMK, calmodulin-dependent kinase; Ras-GRF, Ras guanine-nucleotide release factor; PLC, phospholipase-C, IP_3 , inositol-trisphosphate; ER, endoplasmic reticulum DRE, downstream regulatory element; DREAM, DRE antagonist modulator; NFAT, nuclear factor of activated T cell; ERK, extracellular signal-regulated kinase; SRE, serum response element; SRF, serum response factor; CaRE, calcium response element; CRE, cAMP response element; CREB, CRE-binding protein; CBP, CREB-binding protein

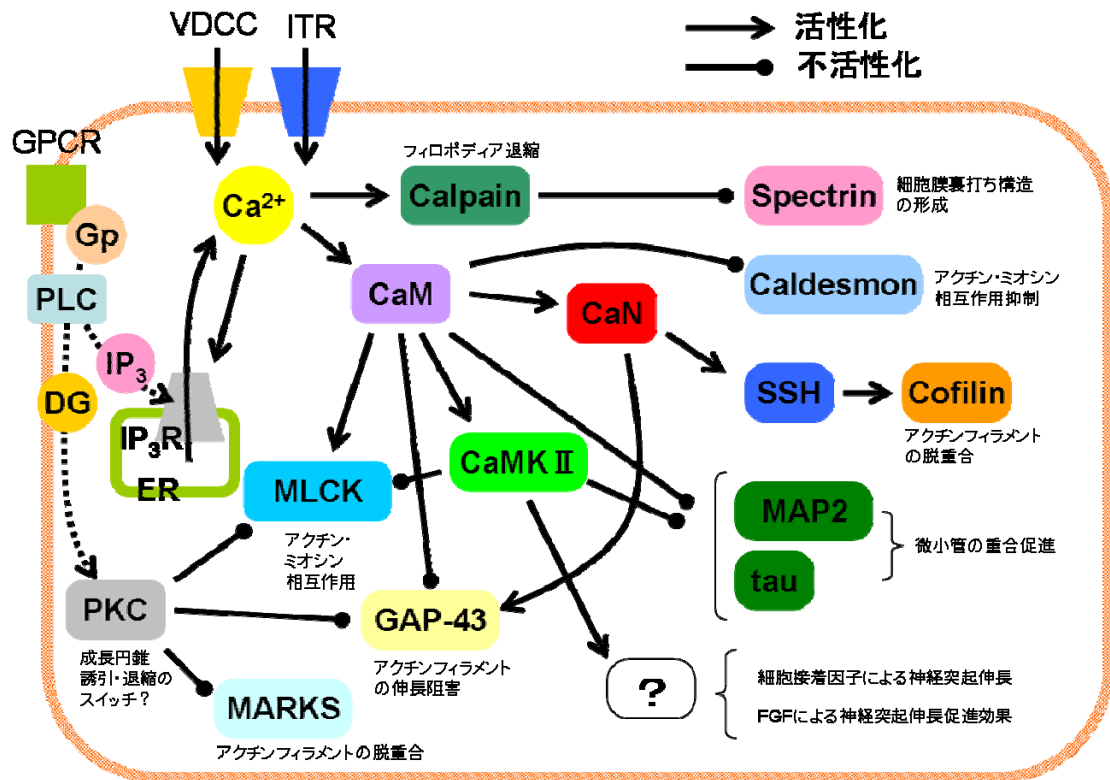


図1.2 Ca²⁺シグナルによる細胞骨格制御

カルシウムイオンとシグナル伝達, 御子柴克彦・遠藤實・宮本英七編, 1998

(Bolsover, 2005; Nakanishi and Okazawa, 2006; Oertner and Matus, 2005)

より作成

VDCC, voltage-dependent calcium channel; ITR, ionotropic receptor; GPCR, G-protein coupled receptor; Gp, G-protein; CaM, calmodulin; CaN, calcineurin, CaMK, calmodulin-dependent kinase; PLC, phospholipase-C, IP₃, inositol-trisphosphate; ER, endoplasmic reticulum; DG, diacyl glycerol; PKC, protein kinase C; MLCK, myosin light chain kinase; MAP2, microtubule associate protein-2; GAP-43, growth associated protein-43; MARKS, myristoylated alanine-rich C kinase substrate; SSH, slingshot

第2章 蛍光による細胞内分子動態測定

2.1 蛍光イメージング技術

2.1.1 蛍光のメカニズム

分子を構成している電子のエネルギーレベルは飛び飛びの値をとっている。ある分子の電子が、外的要因により、励起状態になり基底状態に戻るときに光を放出するとき、この光を発光 (emission) といい、これには熱放射とルミネッセンス (luminescence) の二つがある。ルミネッセンスの中で、励起状態と基底状態のスピン多重度が同じときに起こるものを蛍光 (fluorescence)、異なるものを燐光 (phosphorescence) という。

たとえば蛍光分子の電子は、一重項の基底状態 S_0 から入射光の光子エネルギーを吸収して (スピン多重度が同じ) 一重項の第一励起状態 S_1 に遷移する。励起された電子はフランク・コンドン状態と呼ばれる不安定な状態で、その後過剰な振動エネルギーは散逸して、 10^{-13} ~ 10^{-11} 秒程度で第一励起状態 S_1 の最低次の振動レベルに落ちる (分子内緩和過程)。第一励起状態 S_1 の最低次の振動レベルでは電子は安定な状態であり、 10^{-9} ~ 10^{-8} 秒程度で基底状態に遷移し、この過程で光子エネルギーを放出し、蛍光分子は発光する (発光過程; 図2.1)。このような吸収・発光の過程で、励起の際に吸収した光子のエネルギーと比較して蛍光として発光する光子のエネルギーは、分子内緩和過程で失った分低くなっているため、蛍光波長は吸収波長よりも長波長側にシフトする (Stokes' sift)。また、基底状態 S_0 と第一励起状態 S_1 の振動レベルのエネルギー準位の相似性により、吸収スペクトルと発光スペクトルは近似的に鏡像関係を持つ (図2.2)。

2.1.2 蛍光物質の種類

生体内部分子プローブ

生体内で自然に合成される分子に蛍光団を含むものがあり、これを内部プローブ (intrinsic fluorophore) という。たとえば、タンパク質中に含まれるトリプトファンは280 nm付近の光

を吸収して320~350 nmに極大をもつ蛍光を出す。神経伝達物質のセロトニン (5-HT) は、280 nm付近の光を吸収して350 nm付近の蛍光を出す。他に、補酵素のNADHは340 nm付近の光を吸収し、450 nmに極大の蛍光を出す、フラビンモノヌクレオチド (FMN)、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) は450 nm付近の光を吸収し、515 nm付近の蛍光を出す、などが知られる (図2.3)。これらの蛍光は基質結合、タンパク質同士の相互作用、タンパク質変性などによって、その蛍光スペクトルを変化させる。

蛍光色素物質

生体内に外部から蛍光色素を加えることによって、タンパク質、核酸、細胞膜、細胞骨格、細胞内小器官などを選択的にラベルする方法が確立されており、多くの蛍光色素が市販されている (図2.4)。これらの蛍光色素は、蛍光を出す蛍光団と生体分子に結合する反応基とからなり、用いる蛍光団の蛍光波長と反応基の種類を組み合わせることによって、多重染色が可能となる。また、細胞内イオン、膜電位、酵素活性などに対する反応基を用いることによって、反応基の共鳴構造変化による蛍光スペクトルの変化を利用して蛍光プローブとして用いることができる (図2.5)。

蛍光タンパク質

オワンクラゲ由来のタンパク質green fluorescence protein (GFP)は、1960年代に下村脩によって発見・分離精製されたExtraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea. *J Cell Comp Physiol.* 1962. さらに1992年 Prasherらによって遺伝子が単離されてその有用性が非常に高まったPrimary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene.* 1992. GFPは、11個の β シートで編まれたバレル構造の中に1本の α ヘリックスが上下に含まれる。蛍光団はポリペプチドが折りたたまれるときに α ヘリックス上に形成される (図2.6)。このタンパク質の合成に酵素的な合成過程は必要ないので、どのような細胞内でもGFPの蛍光を観察できる。また、GFPの遺伝子を特定のタンパク質の遺伝子に組み込むことによって、GFPとの融合タンパク質を細胞内で発現させることができる。野生型のGFPでは400 nmと475 nm付近の光を吸収し、505 nm付近に極大の蛍光をもつが、近年これをアミノ酸置換により変異させ、他の吸収・蛍光波長領域を持つ、BFP(青)、CFP(シアン)、YFP(黄)などが作製されている (図2.7)。これらの改変GFPを用いて蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET, 2.4参照) を測定することによって、タンパク質の構造変化、タンパク質同士の相互作用を計測や、タンパク質の反応基を用いて、細胞内イオン濃度などのシグナルに対するタンパク質蛍光プローブとして用いることができる。

量子ドット

数nm程度の球状構造の半導体を加工することによって蛍光団として用いることができる (量子ドット, quantum dot, Qdot)。生体内ではポリマーコーティングして親水性を高めて

用いる。量子ドットは、1) 発光強度が強い、2) 長時間の励起光照射でもほとんど褪色しない、3) Stokes' siftが大きいいためバックグラウンドが抑えられる、4) 蛍光波長スペクトル領域が狭いのでUV励起で数種類の異なる波長領域の量子ドットが同時に使用できる、などの利点があり、新しい蛍光色素として今後様々な応用が期待されている。現在では、量子ドットと抗体を結合させ、免疫抗体染色などに利用されている。

2.1.3 蛍光測定技術

落射蛍光顕微鏡

現在では最も一般的な蛍光顕微鏡で、レーザー光または特定の波長の励起光をダイクロイックミラーで反射させ、試料を照明する。試料から出た蛍光は対物レンズによって集められ、ダイクロイックミラーと吸収フィルターを通すことによって散乱光と分離された後、結像レンズによって像を結ぶ (図2.8)。

全反射蛍光顕微鏡 (TIRF microscope)

電磁波 (光) が反射するときに、強度が指数関数的に減衰する局在化した電磁場を形成し (エバネッセント場)、微小領域を局所励起できる。この現象を利用した顕微鏡が全反射顕微鏡 (TIRF microscope, total internal reflection fluorescence microscope) である (図2.9)。

エバネッセント場は、境界面からの深さ方向に指数関数的に減衰する局所場であり、強度を I 、深さを z とすると、次のように表せる。

$$I(z) = I(0)e^{-z/d} \quad (1)$$

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi} [n_2^2 \sin^2 \theta - n_1^2]^{-1/2} \quad (2)$$

ここで λ_0 は真空中の波長、 n_1 は溶液の屈折率、 n_2 はガラスの屈折率、 θ は入射角である。

エバネッセント場で蛍光物質を励起すると、散乱光や蛍光のみを伝播光として検出できるので、バックグラウンドの光が極めて少なく、1分子の蛍光イメージングによく用いられる。また、本研究のように入射角を調整して、臨界角付近にすると、境界面での光強度が4倍近くに増強されるので、その分レーザー光の強度を下げてもバックグラウンド光を抑えることもできる。

共焦点レーザー顕微鏡

通常の蛍光顕微鏡では試料全体を一様に励起したが、共焦点蛍光顕微鏡ではレーザー光を試料の一点に集光させて、その位置を走査することによって画像を取得する。レーザー

光で励起した点から出た蛍光は、ダイクロイックミラーで反射され、吸収フィルターを通過した後、結像レンズでピンホールの位置で像を結び検出器で検出される。レーザー光を集光した点以外から出た蛍光はピンホールで排除されるため検出器には到達しない。レーザー光の集光点を走査することによって試料の二次元断層像を得ることができる。また、これらの二次元像を重ね合わせて三次元立体画像を構築することができる。レーザー光を走査する方法として、(1) ガルバノミラーでレーザーの集光位置を変えて走査する方法、(2) ニポウディスクと呼ばれる多数のピンホールの空いた円盤を回転させる方式がある。前者は単一のピンホールを用いるため、漏れ蛍光の影響が少なく、高分解能の画像を取得するのに適しているのに対して、後者はディスクを高速回転させることにより、高速スキャンが可能になる (図2.10)。

2光子励起レーザー顕微鏡

1つの蛍光分子に2つの光子を同時に吸収させることによって、光子エネルギーの2倍のエネルギー準位に励起することができる (2光子励起, 一般に複数の光子で励起することを多光子励起という.)。2光子励起は1931年にM. Gpertz-Mayerによって予言されていたが、高い光子密度が得られるレーザーの発明によって確かめられた。2光子励起を用いることによって近赤外光で可視域に吸収を持つ蛍光分子を励起することができる。このため光の透過性が高く、厚い試料の内部を励起することができる利点がある。また、光子密度が高い焦点でのみ蛍光分子の励起が起きるので、共焦点レーザー顕微鏡のように断層像を取得ことができ、観察している面しか励起しないので蛍光色素の褪色が遅く、細胞へのダメージも少ない (図2.11)。

2.2 蛍光指示薬による細胞内イオン濃度測定法

2.2.1 イオン濃度感受性蛍光指示薬

Ca²⁺蛍光指示薬

細胞内Ca²⁺はセカンドメッセンジャーとして、様々なシグナル伝達に関わっていることが明らかになってきているが、それらの多くの研究に、細胞内Ca²⁺蛍光指示薬は用いられている。反応基にCa²⁺キレーターであるEGTA, APTRA, BAPTAなどを用いてRoger TsienらがCa²⁺選択的な蛍光指示薬を作製して以来(Tsien, 1980), 彼らやその他の研究者によって, fura-2, fluo-3, calcium-green, fura-redなど, 多くのCa²⁺蛍光指示薬が開発されている(Katerinopoulos and Foukaraki, 2002). これらのCa²⁺蛍光指示薬は, 化学的性状 (塩, AM複合体, dextran複合体), 実験系との相性 (励起波長, 蛍光波長), Ca²⁺との解離定数(K_d), などにより選択することができる (表2.1)。

pH蛍光指示薬

細胞内 Ca^{2+} 濃度変化が100倍程度にもなるのに対して、細胞内pHの変化はそれほど大きくないが、多様な生理過程、病理現象に関係している。BCECFは、Roger Tsienらによって作製されたpH蛍光指示薬で(Rink et al., 1982)、2波長の照射光に対する蛍光比によってpHを測定することができる。その後、1波長の照射光で発する2種類の蛍光波長によってpHを計測できるSNARFが開発された(Whitaker et al., 1991)。

 Mg^{2+} 蛍光指示薬

細胞内マグネシウムは、酵素反応、DNA合成、ホルモン分泌、筋収縮などに重要である。選択的 Ca^{2+} 蛍光指示薬の開発後、mag-fura-2、mag-indo-1など細胞内 Mg^{2+} を測定するための蛍光指示薬も開発された(Katerinopoulos and Foukaraki, 2002)。しかし、これらは全て基本となる Ca^{2+} 蛍光指示薬の分子構造によく似ているため、 Ca^{2+} に対しても弱い応答性を示す。このため最近、より Mg^{2+} に選択的な蛍光指示薬である、KMGシリーズが開発されている(Komatsu et al., 2004; Suzuki et al., 2002)。

その他の細胞内イオン蛍光指示薬

また、 Na^+ (Minta and Tsien, 1989)、 K^+ (Meuwis et al., 1995)、 Cl^- (Illsley and Verkman, 1987)、 Zn^{2+} (Maruyama et al., 2002)などの蛍光指示薬も開発されている。

2.2.2 細胞内イオン濃度測定

細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定する方法は、Roger Tsienらによって確立されている(Grynkiewicz et al., 1985)。これについてfura-2を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度測定を例に簡単に説明する。Fura-2は、照射光の波長340 nm, 380 nmのそれぞれにおいて、 Ca^{2+} 濃度に依存して、550 nm付近で観察される蛍光強度が変化する。まず、 Ca^{2+} と結合していないfura-2濃度と、結合しているfura-2濃度をそれぞれ、 c_f , c_b とする。波長340 nmにおける、 Ca^{2+} と結合していないときのfura-2の蛍光強度を表す因子を S_{f1} 、結合しているときのfura-2の蛍光強度を表す因子を S_{b1} として表し、波長380 nmにおいても同様に、 S_{f2} , S_{b2} とすると、ある Ca^{2+} 濃度における波長340 nm, 380 nmにおけるfura-2の蛍光強度 F_1 , F_2 は以下のように表せる。

$$F_1 = S_{f1} \cdot c_f + S_{b1} \cdot c_b \quad (3)$$

$$F_2 = S_{f2} \cdot c_f + S_{b2} \cdot c_b \quad (4)$$

また, c_f , c_b の関係は, Ca^{2+} 濃度 $[\text{Ca}^{2+}]$ と, fura-2の解離定数 K_d を用いて

$$c_b = c_f \cdot [\text{Ca}^{2+}] / K_d \quad (5)$$

と表せるから, ある Ca^{2+} 濃度 $[\text{Ca}^{2+}]$ における波長340 nm, 380 nmのfura-2の蛍光強度比 $R(=F_1 / F_2)$ は, (3), (4), (5) の式から以下のようなになる.

$$R = \frac{S_{f1} + S_{b1} \cdot [\text{Ca}^{2+}] / K_d}{S_{f2} + S_{b2} \cdot [\text{Ca}^{2+}] / K_d} \quad (6)$$

これから, $[\text{Ca}^{2+}]$ について解くと

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \left(\frac{R - S_{f1} / S_{f2}}{S_{b1} / S_{b2} - R} \right) \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad (7)$$

が得られる. ここで, S_{f1}/S_{f2} は, Ca^{2+} が全く結合していない状態のfura-2の蛍光強度比 R_{\min} であり, S_{b1}/S_{b2} は, Ca^{2+} と全てのfura-2が結合しているときの蛍光強度比 R_{\max} であるからこれで置き換えると,

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad (8)$$

ここで, K_d と S_{f2}/S_{b2} の値は色素の特性によって決定される値で, $K_d=135$ nm, $S_{f2}/S_{b2}=15.3$ であることがわかっている(Grynkiewicz et al., 1985). そこで, 蛍光強度比 R_{\min} と蛍光強度比 R_{\max} を, 実験系であらかじめ求めることで, 波長340 nm, 380 nmにおけるfura-2の蛍光強度比 R から細胞内 Ca^{2+} 濃度を求めることができる (図2.12). これは一般的に他の色素にも適用することができる.

また, Ca^{2+} 濃度と蛍光比 R のキャリブレーションカーブから Ca^{2+} 濃度を求める方法もある. 本研究において, fura-2による細胞内 Ca^{2+} 濃度測定は (8) の式から求め (図2.13), BCECFによる細胞内pHを測定については, キャリブレーションカーブから求められた (図2.14).

2.3 蛍光タンパク質によるタンパク質動態の測定

2.3.1 目的タンパク質遺伝子cDNAのサブクローニング

PCR (Polymerase chain reaction) 法は、特定のDNA断片を指数関数的に増幅させることができる方法であり、現在では分子生物学の分野において研究者が行う実験の基本の一つとなっている。本研究においてもPCR法は多用されているため、簡単にその原理を説明する。

PCR反応は3つのステップを1サイクルとし、これを繰り返すことによってDNAを増幅する。始めの反応液には、テンプレートDNA、増幅部分の両端に当たる2種類の合成オリゴDNAプライマー、デオキシリボヌクレオチド、塩(MgCl₂)、耐熱性DNAポリメラーゼ、が混合されている。

- (1) 93~95°Cの熱変性によりテンプレートDNAを二本鎖から一本鎖にする。(熱変性)
- (2) プライマーがテンプレートに結合する温度 (T_m) まで冷却し、それぞれの一本鎖DNAに相補的なプライマーを結合させる。(アニーリング)
- (3) プライマーを起点として耐熱性DNAポリメラーゼがDNA合成を始め、DNAの二本鎖が合成される。(伸長反応)

このサイクルは、全て温度によって制御され、例えばnサイクル繰り返すとすると、目的のDNAは2ⁿコピー程度にまで増幅することができる(図2.15)。このときプライマーの両端を修飾する事により任意のDNA配列を付加することができる(図2.16)。

本研究では、市販のcDNAライブラリーの目的DNAを認識するプライマーの両端に特定の制限酵素サイトを付加してこれを増幅し、制限酵素で切断後、(同じく制限酵素で切断した) 適当なタンパク質発現用ベクターの制限酵素サイトにライゲーションして挿入した。

2.3.2 修飾タンパク質のDNA作製

上記に示したのと同様にPCR法で目的タンパク質に制限酵素サイトを付加して増幅し、GFP関連タンパク質が挿入されているベクターの適切な部位に挿入することによって、GFP標識された標的タンパク質のDNAを作製することができる(図2.16)。

また、標的タンパク質の変異体DNAをプライマーの修飾によって作製できる。まず、部分的に変異を加えた配列を付加したプライマーと変異の次の配列から読み始めるプライマーの5'端をリン酸化する必要がある。このためにプライマーとT4 polynucleotide kinaseを反応させる。(市販のプライマーで、すでに5'端リン酸化修飾されているものを注文することもできる。) このプライマーを用いて標的タンパク質の挿入されているベクターごとPCR法を適用する。できた標的PCR産物をセルフライゲーションさせる(図2.17)。

2.4 蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)測定技術

蛍光共鳴エネルギー転移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) は, ある蛍光分子 (donor) によって吸収されたエネルギーが, 発光現象を介さずに別の分子 (acceptor) に移動する物理現象である (図2.18). この現象は1920年代に発見されFrösterが紹介したことから, Fröster resonance energy transfer (FRET)とされることもある(Vogel et al., 2006). 近年, 各生物種のゲノム解析によるタンパク質工学の発展や, GFP関連タンパク質の改良などにより, タンパク質-タンパク質の相互作用を計測する技術としてFRETが有用になってきている.

FRETが起こる効率は以下に示す要素によって決定される (図2.19).

- (a) donorの蛍光スペクトルが, acceptorの吸収スペクトルと重なっていること.
- (b) donorの蛍光双極子が, acceptorの吸収双極子に垂直に傾いていないこと.
- (c) donorとacceptorの分子間距離が, $\sim 10 \text{ nm}$ (100 \AA) 以内であること.

(a) の条件によって, donorとacceptorを選び目的タンパク質との融合タンパク質を作製し, (c) の条件にあるタンパク質, すなわちタンパク質同士が近傍にあるものをFRETによって測定することができる. しかし, タンパク質が近傍にあったとしても, (b) の条件により, FRETが効率的に起こらない可能性も考慮に入れる必要がある(Vogel et al., 2006).

FRETの計測には, 以下の4つの方法がある (図2.20).

- (1) donorの蛍光強度の減少を測定する方法
- (2) acceptorの蛍光強度の増加を測定する方法
- (3) donorとacceptorの両方の蛍光変化をスペクトルイメージングによって測定する方法
- (4) 偏向した照射光での蛍光の偏向の解消を測定する方法

本研究では, (1)と(2)を組み合わせFRETを計測した (第4章, 4.2.5).

表2.1 蛍光指示薬一覧

蛍光指示薬	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)	解離定数 (K_d)
<Ca ²⁺ 蛍光指示薬>			
fura-2	340 / 380	505	Ca ²⁺ : 135 nM
inodo-1	330	400 / 475	Ca ²⁺ : 250 nM
fluo-3	506	526	Ca ²⁺ : 325 nM
fluo-4	494	516	Ca ²⁺ : 345 nM
Rhod-2	552	581	Ca ²⁺ : 570 nM
Calcium-green-1	506	526	Ca ²⁺ : 190 nM
fura-red	440 / 480	660	Ca ²⁺ : 570 nM
<pH蛍光指示薬>			
BCECF	440 / 490	535	pK _a (K _a , 酸解離定数): 6.5
SNARF	488 / 534	580 / 640	pK _a : 7.3-7.4
<Mg ²⁺ 蛍光指示薬>			
mag-fura-2	330 / 369	491	Mg ²⁺ : 1.9 mM; Ca ²⁺ : 25 μM
mag-indo-1	330	482 / 505	Mg ²⁺ : 2.7 mM; Ca ²⁺ : 35 μM
KNG-20	440	535	Mg ²⁺ : 10 mM; Ca ²⁺ : 33 mM
KMG-104	500	535	Mg ²⁺ : 2.1 mM; Ca ²⁺ : 7.5 mM

<http://probes.invitrogen.com/handbook/>

久保田健, 博士論文 (2004)

より作成

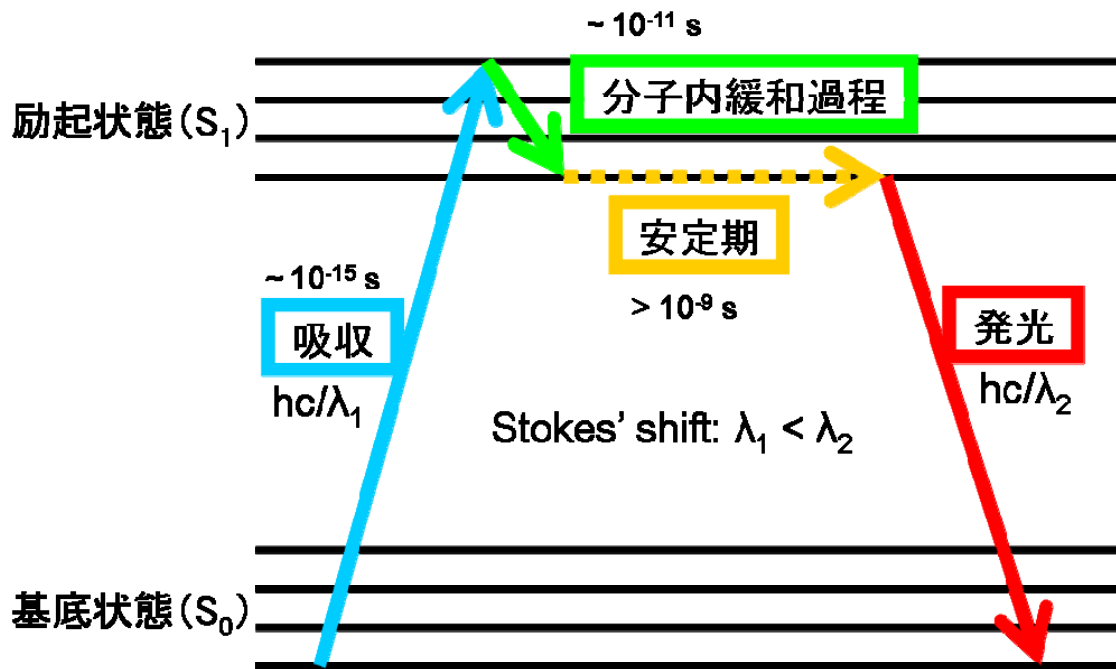


図2.1 光吸収から発光までのプロセス

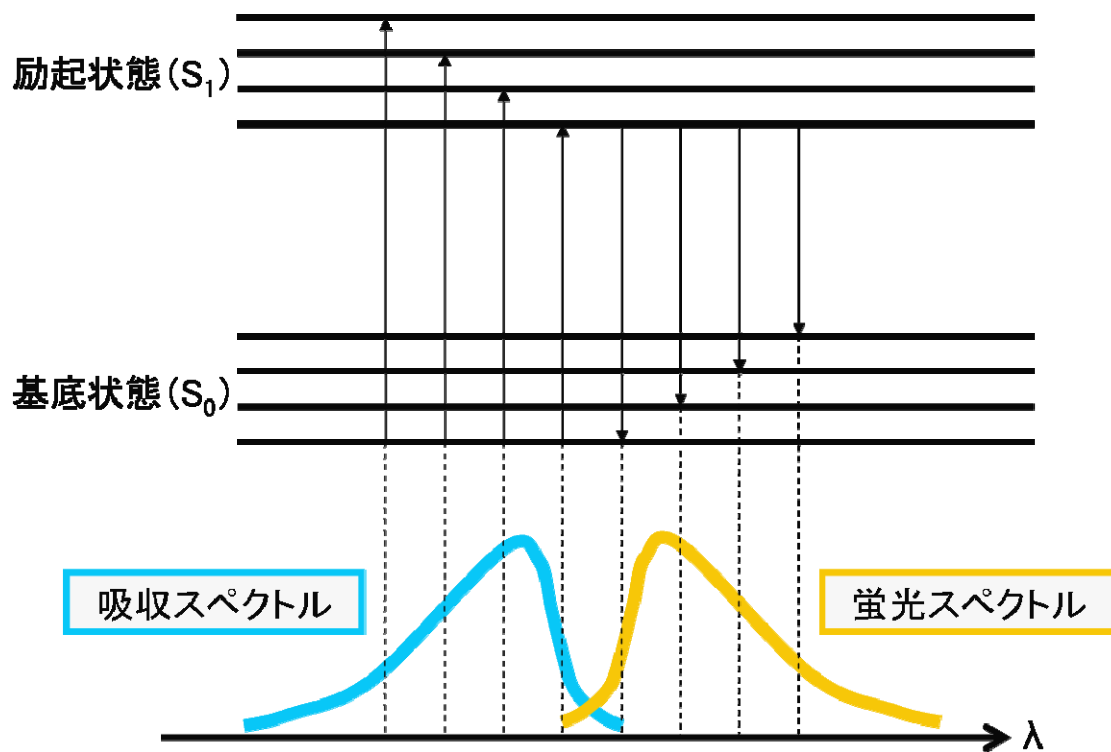
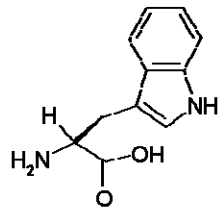
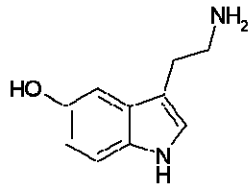


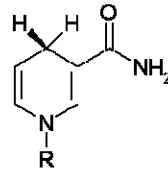
図2.2 エネルギーレベルと吸収・発光スペクトル



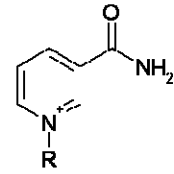
トリプトファン
 吸収: 280 nm
 蛍光: 350 nm



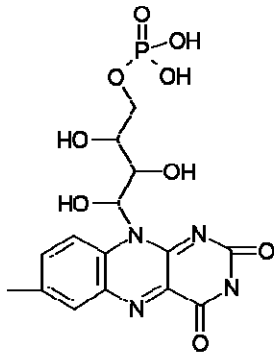
セロトニン(5-HT)
 吸収: 280 nm
 蛍光: 350 nm



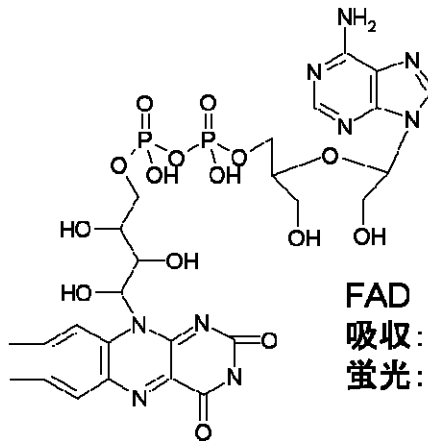
NADH
 吸収: 340 nm
 蛍光: 450 nm



NAD⁺
 蛍光持たない

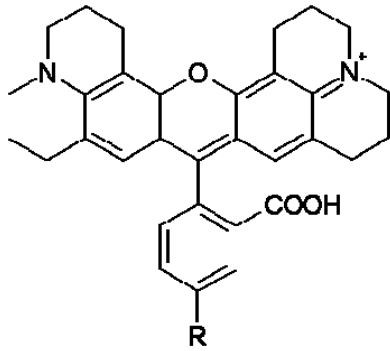


FMN
 吸収: 450 nm
 蛍光: 515 nm

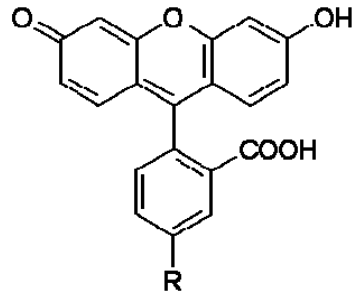


FAD
 吸収: 450 nm
 蛍光: 515 nm

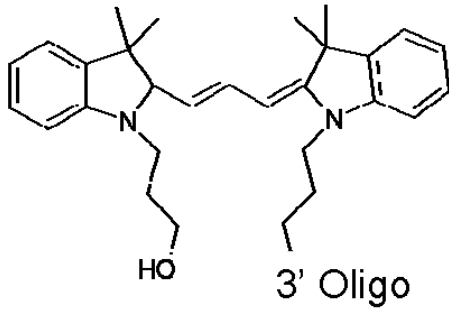
図2.3 生体内分子プローブ



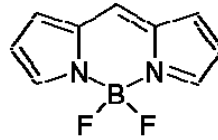
Rhodamine
励起: 502 nm
蛍光: 527 nm



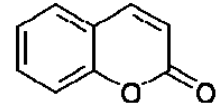
Fluorescein
励起: 494 nm
蛍光: 518 nm



Cy3
励起: 550 nm
蛍光: 565 nm



BODIPY
励起: 493 nm
蛍光: 503 nm



Coumarin
励起: 384 nm
蛍光: 470 nm

図2.4 蛍光団の化学構造式

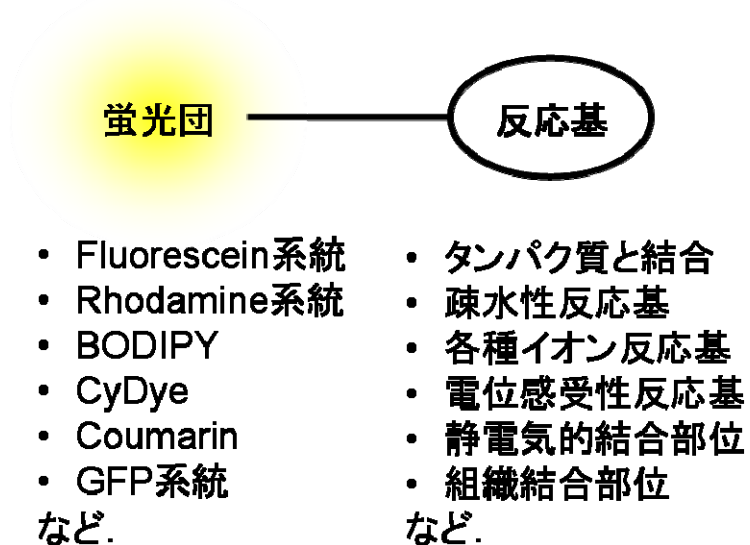
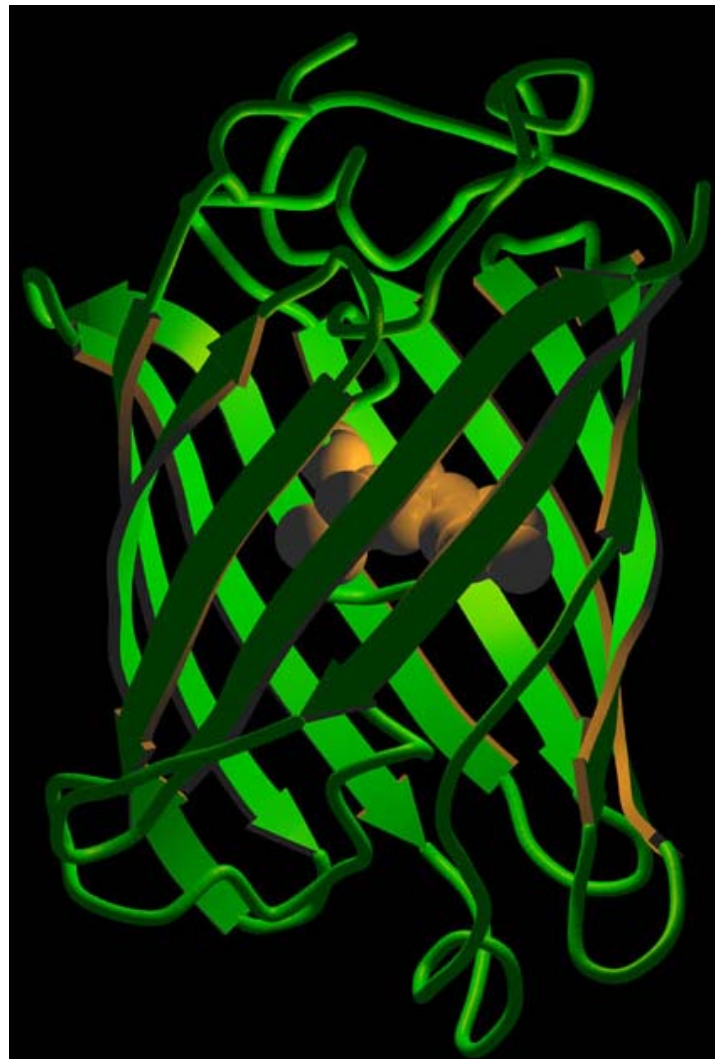


図2.5 生体外部分子プローブ

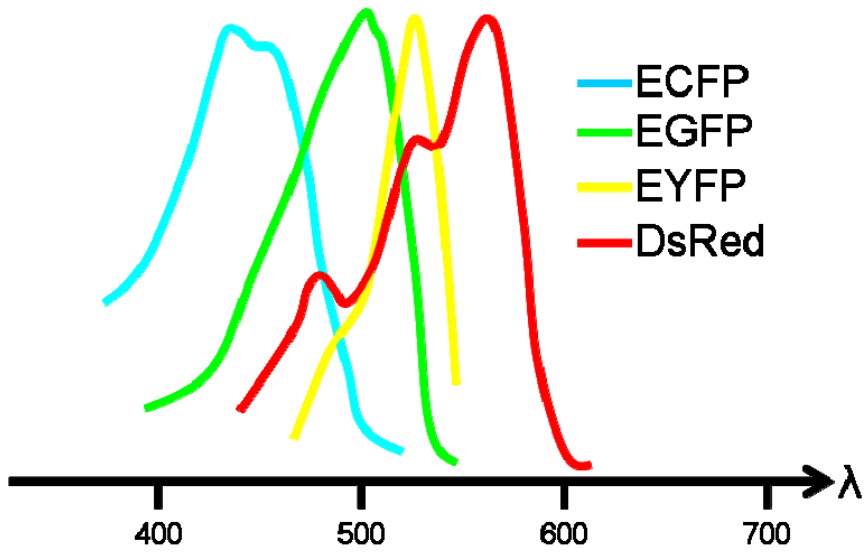


tsienlab.ucsd.edu/Images.htmより

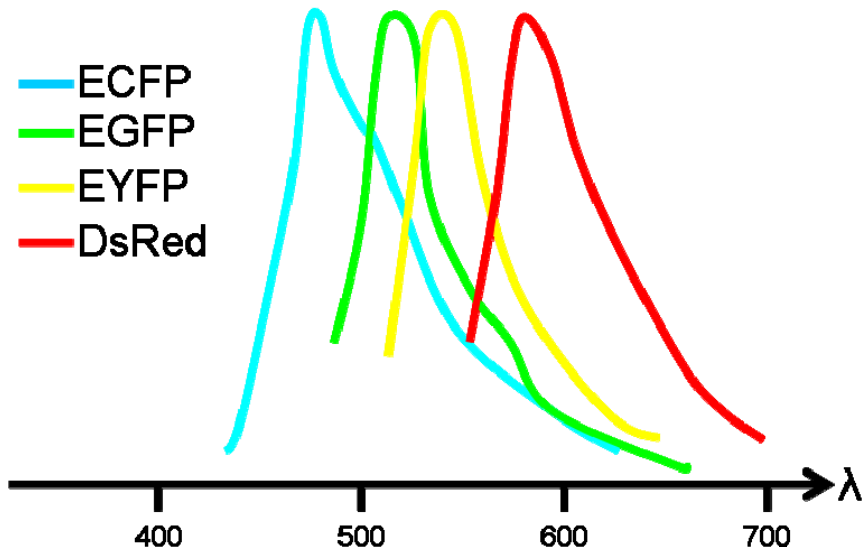
図2.6 GFPの構造

タンパク質の中心にある蛍光団はバレル構造に囲まれており，蛍光団形成に関与するアミノ酸残基を変異させ，蛍光強度を増幅させたタンパク質（EGFP）や，蛍光波長を変化させたタンパク質（CFP, YFP, RFP）などが作製されている．

(A) GFP変異体の吸収スペクトルの相対値



(B) GFP変異体の蛍光スペクトルの相対値



home.ncifcrf.gov/ccr/flowcore/Spectra/FPspec.htmより作成

図2.7 GFP変異体のスペクトル特性

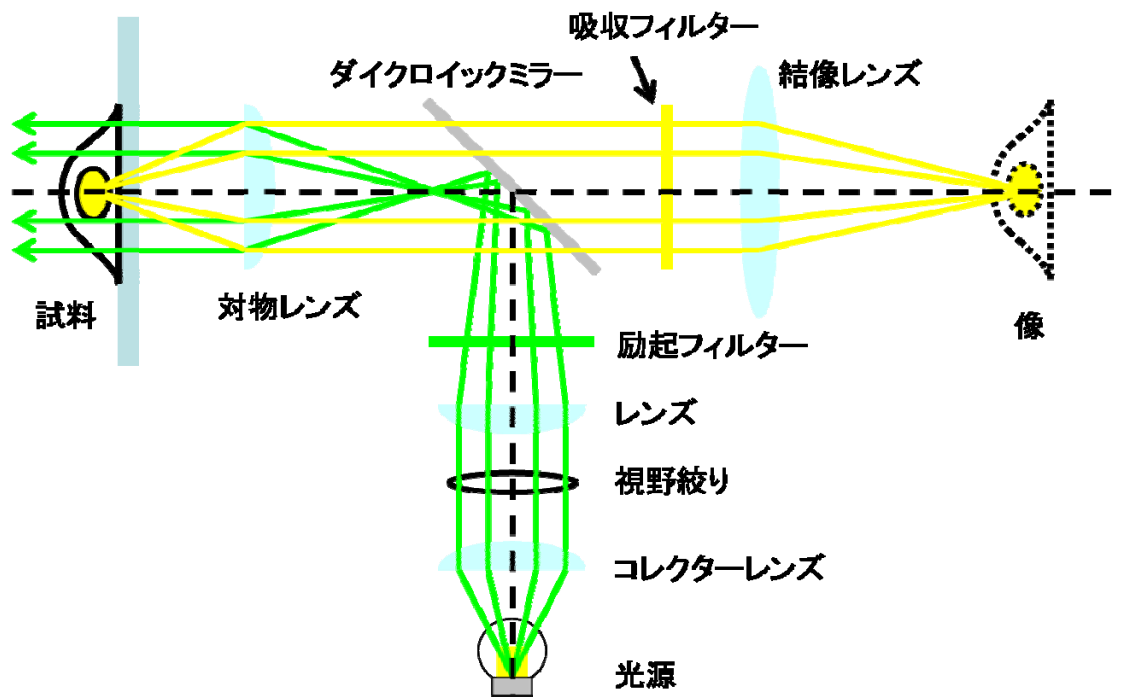


図2.8 落射蛍光顕微鏡

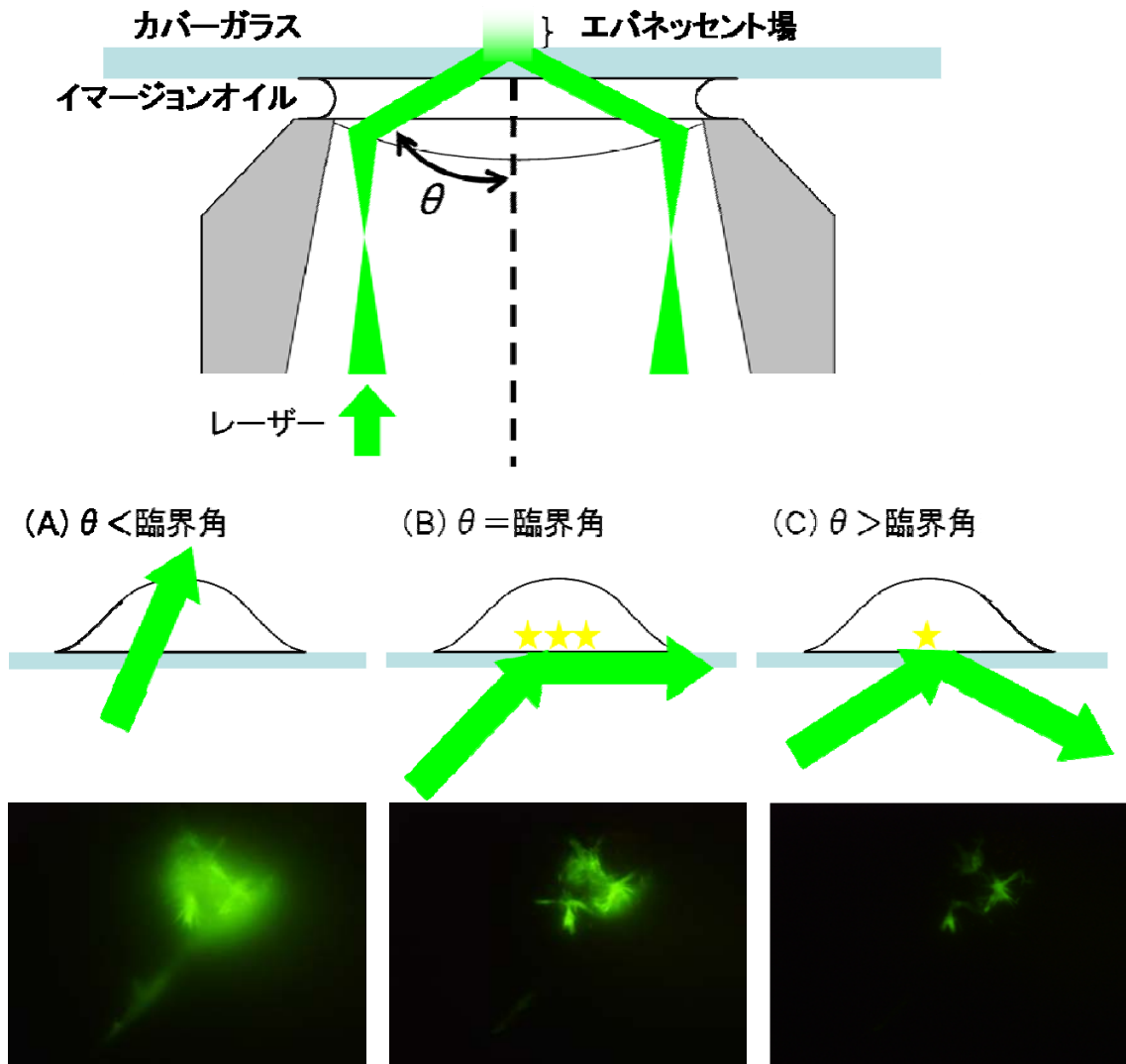


図2.9 全反射蛍光顕微鏡 (TIRF顕微鏡)

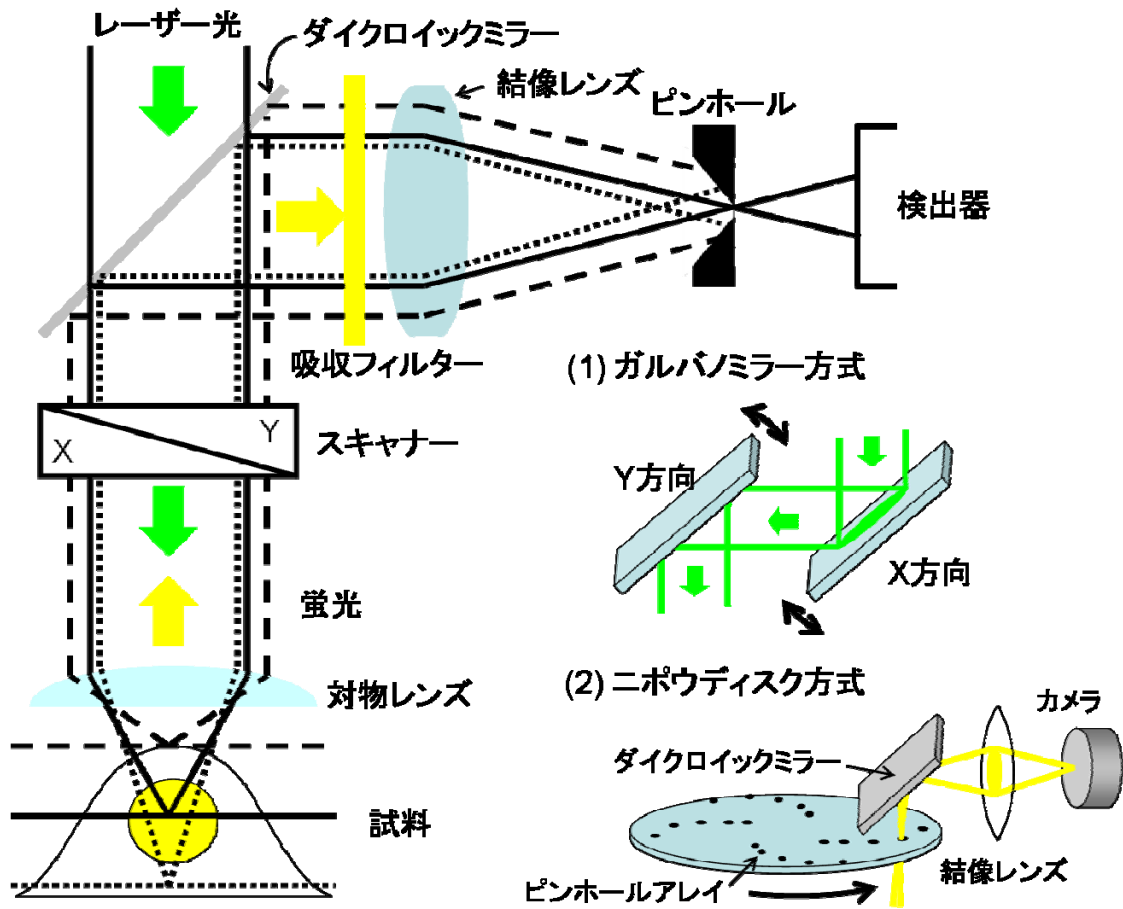


図2.10 共焦点蛍光顕微鏡

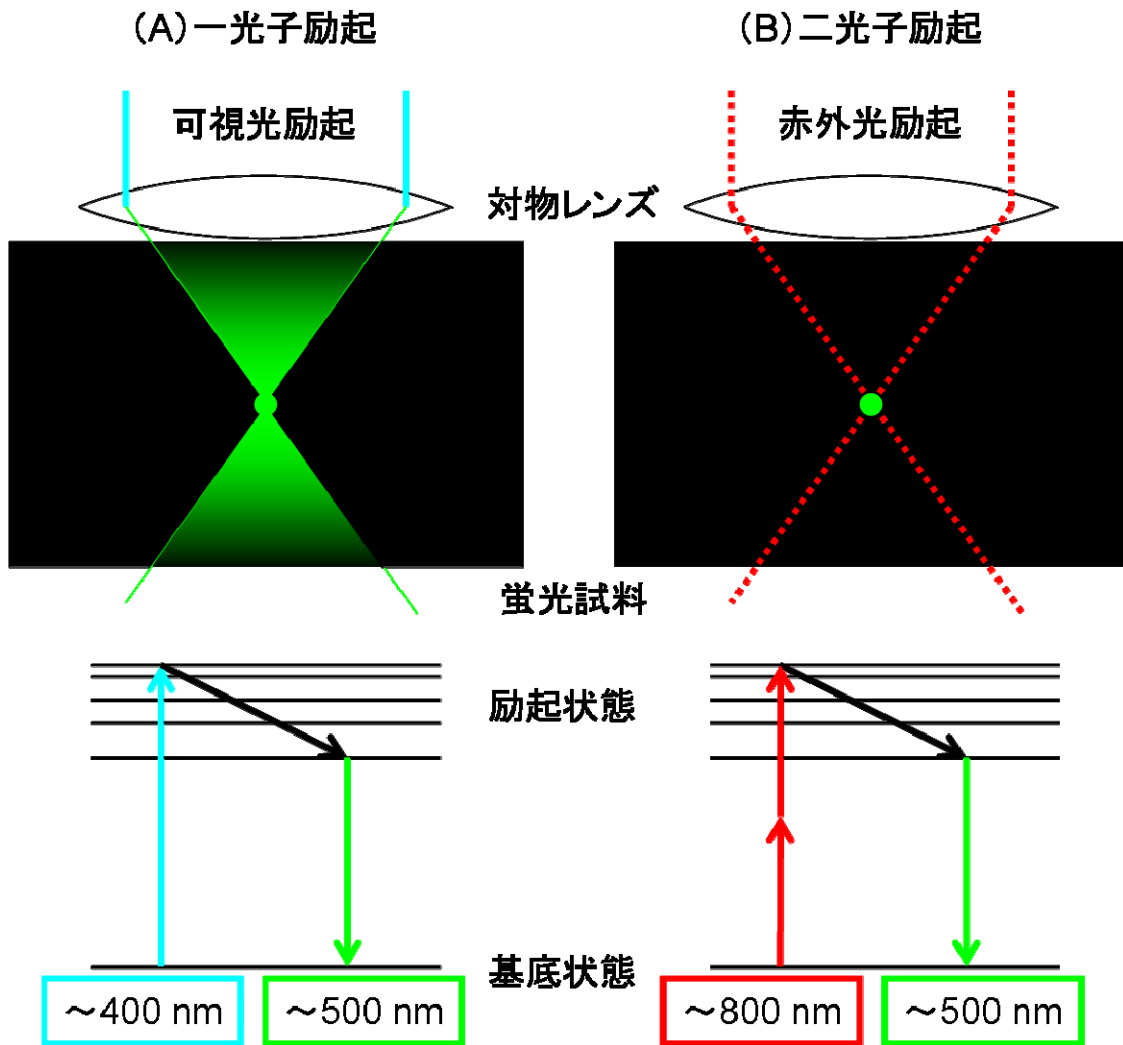


図2.11 2光子励起蛍光顕微鏡

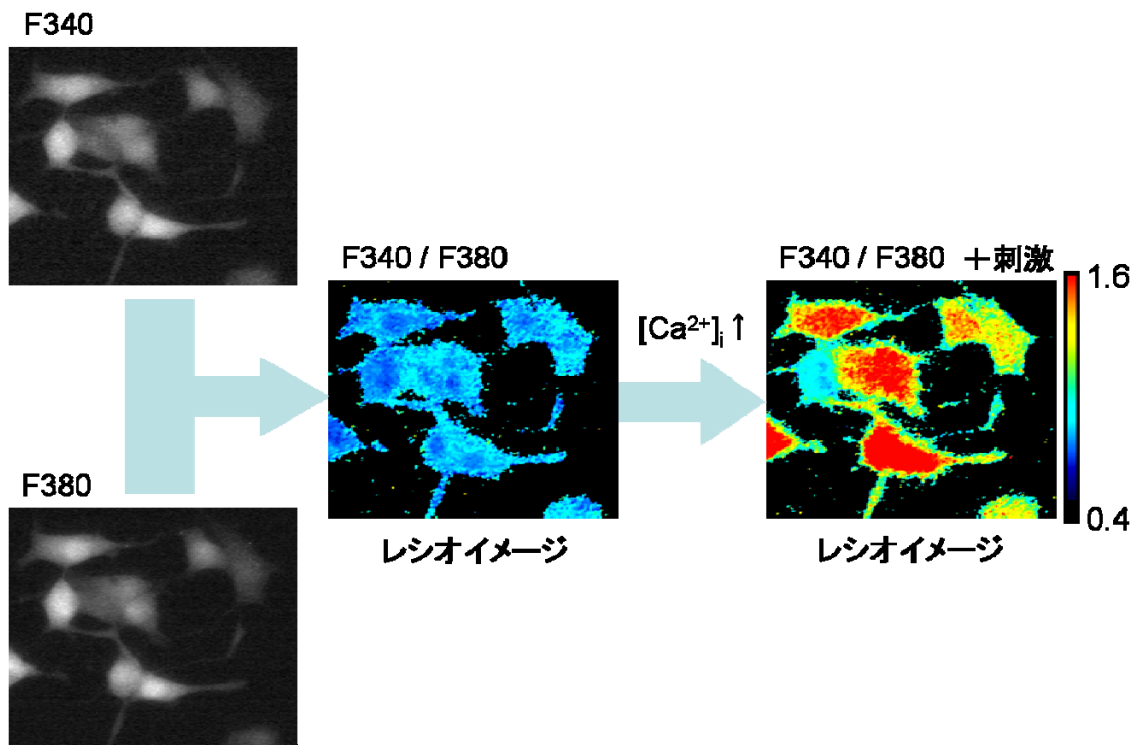


図2.12 fura-2によるレシオイメージング取得の流れ

F340, F380は, それぞれ340 nm, 380 nmの照射光で励起したときの蛍光画像を表している.

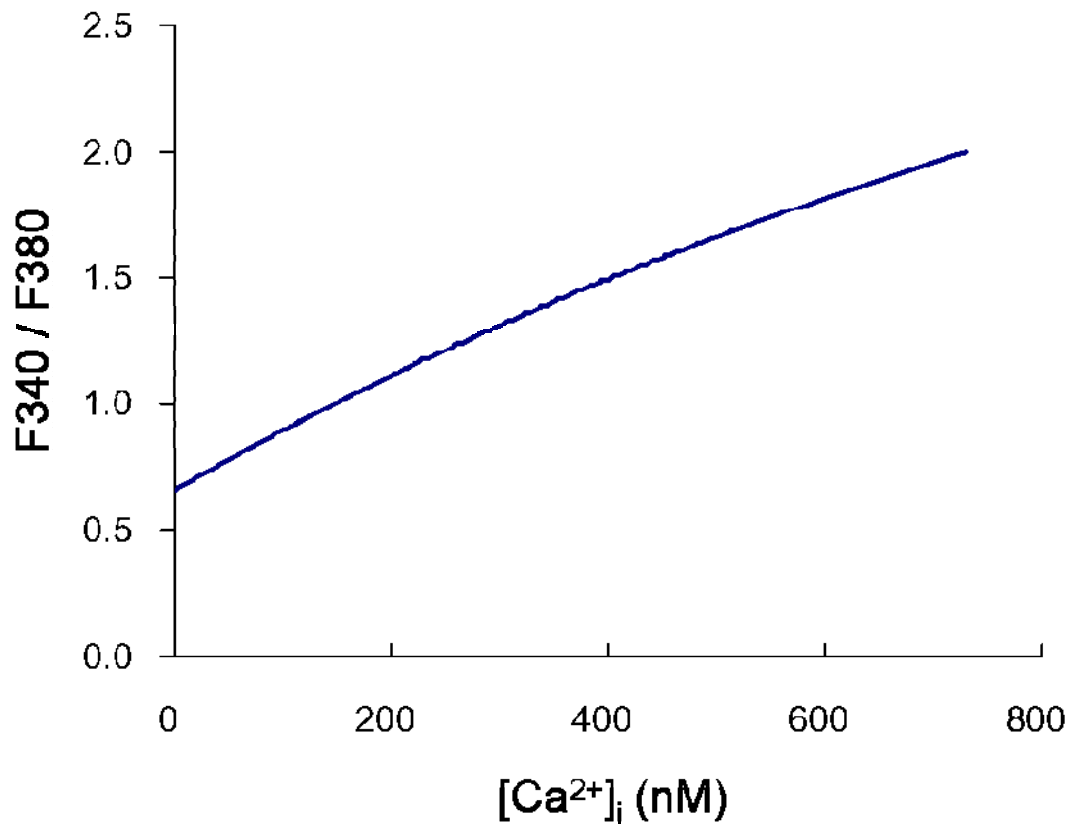


図2.13 fura-2によるCa²⁺濃度キャリブレーション

F340, F380は、それぞれ340 nm, 380 nmの照射光で励起したときの蛍光強度を表している。 $R_{\max}=5.80$, $R_{\min}=0.66$ で計算した。

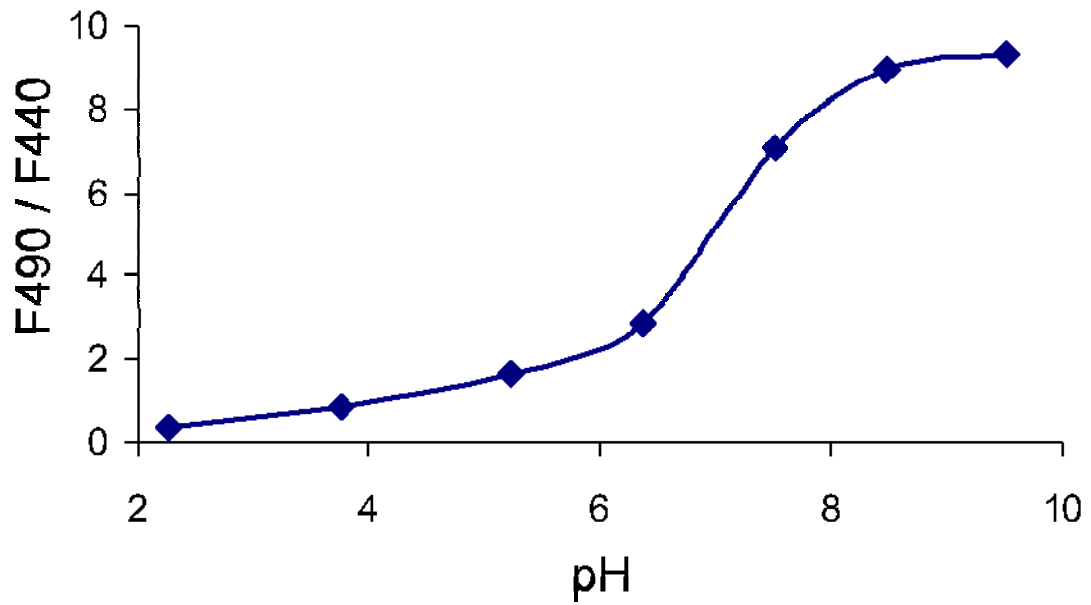


図2.14 BCECFによるpHキャリブレーションカーブ

F490, F440は、それぞれ490 nm, 440 nmの照射光で励起したときの蛍光強度を表している。

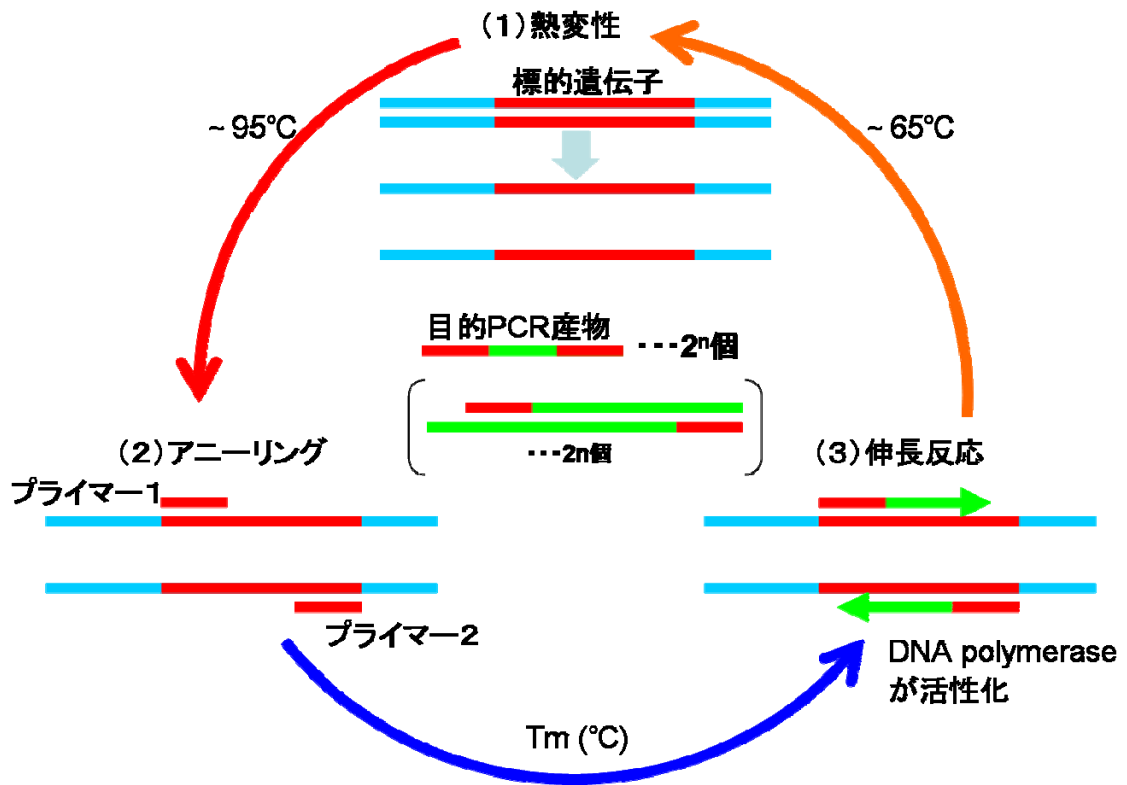


図2.15 PCRの原理

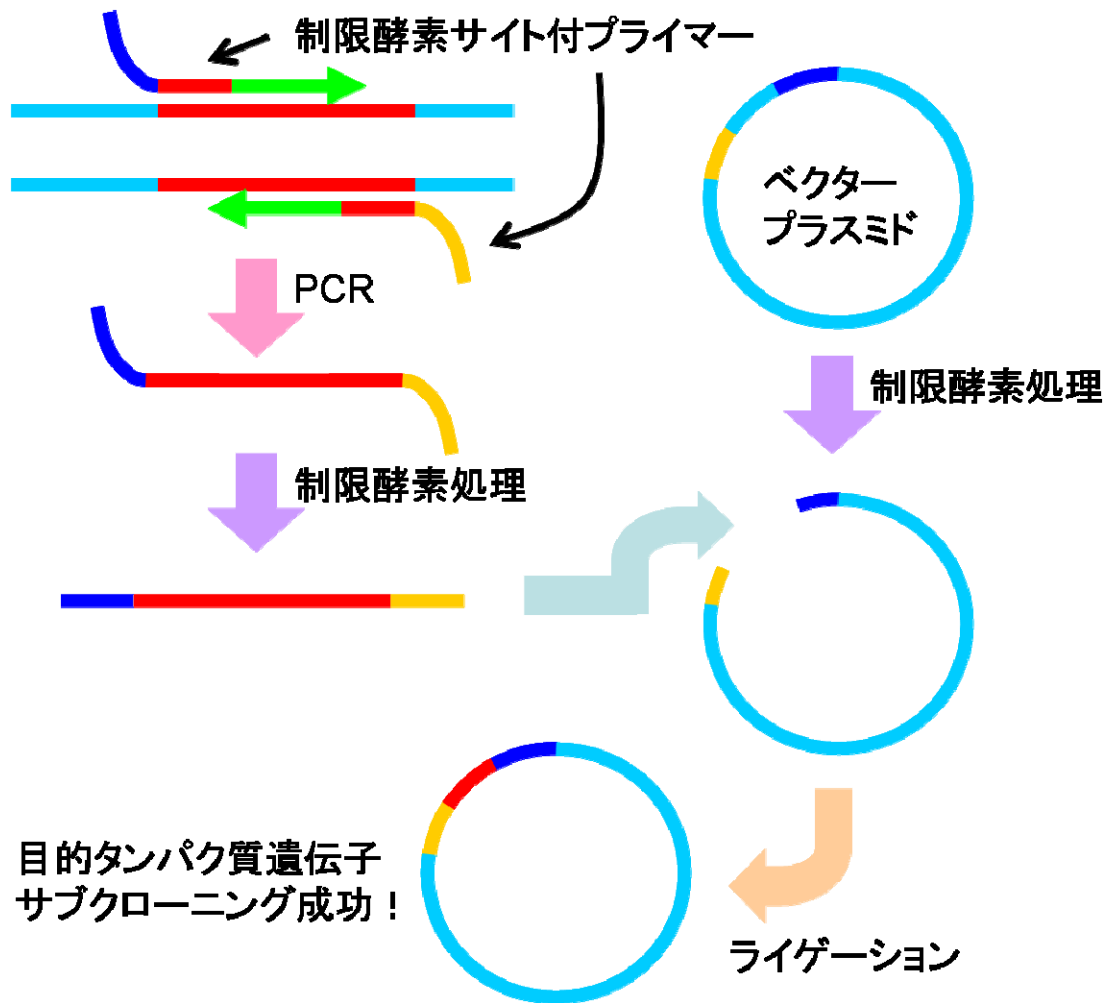


図2.16 タンパク質DNAのサブクローニング

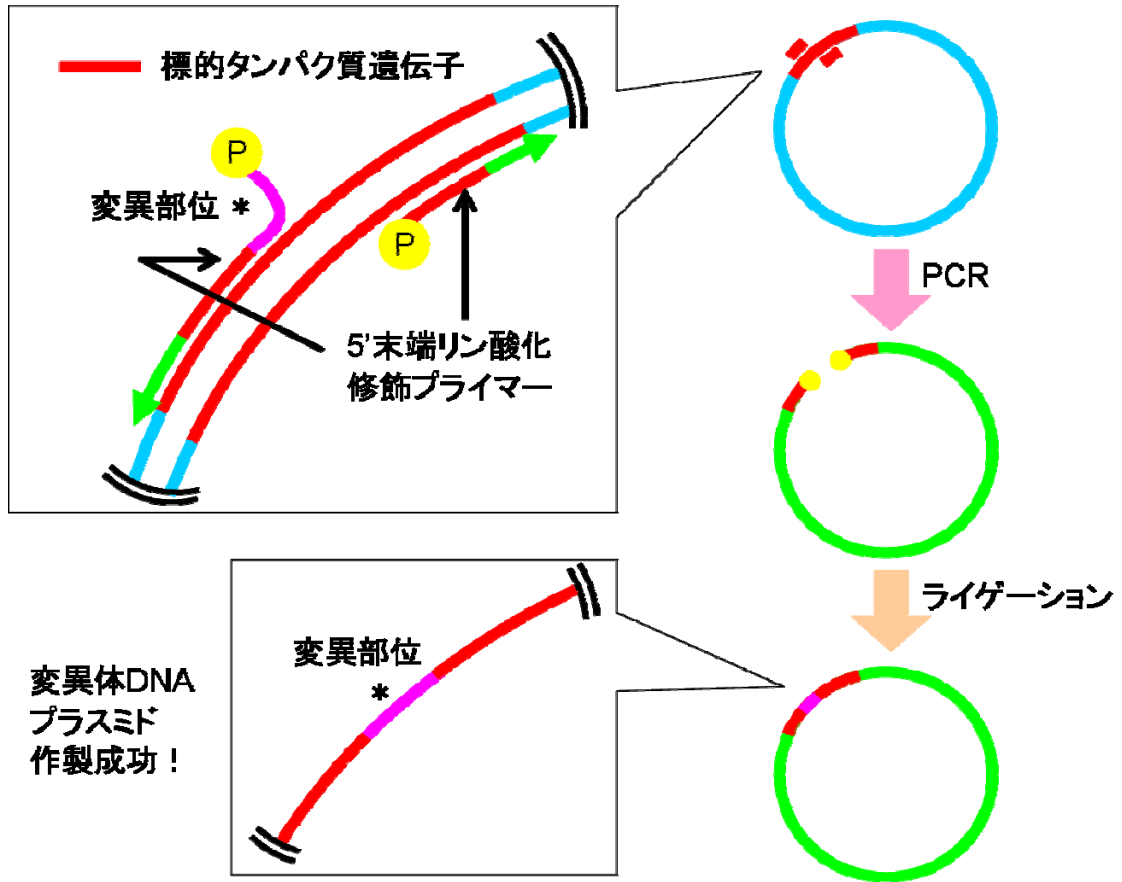


図2.17 PCRによる変異体タンパク質DNAの作製

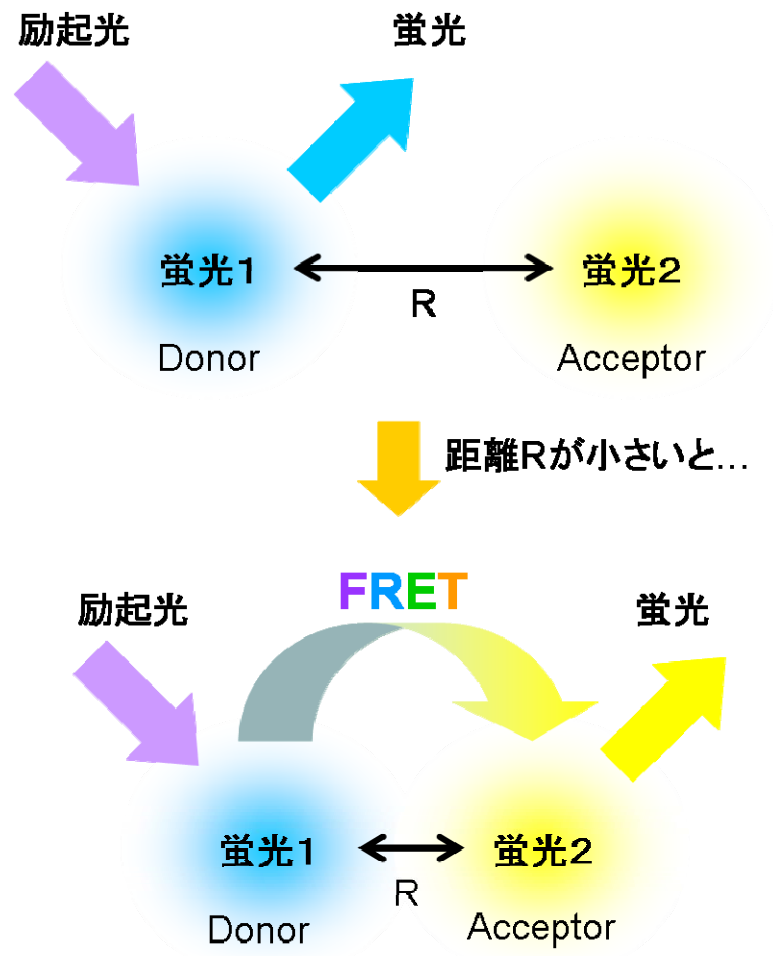


図2.18 FRETの原理

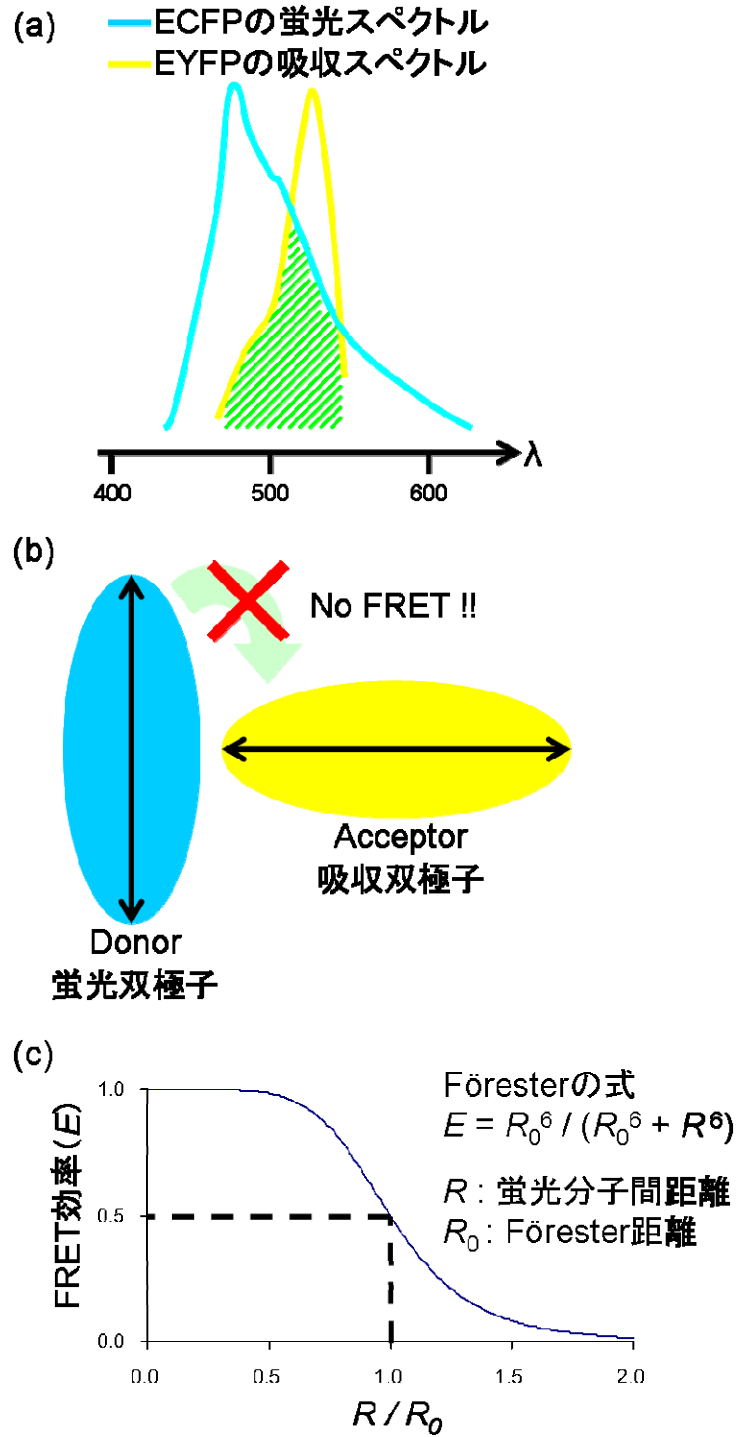


図2.19 FRET効率を決定する要素

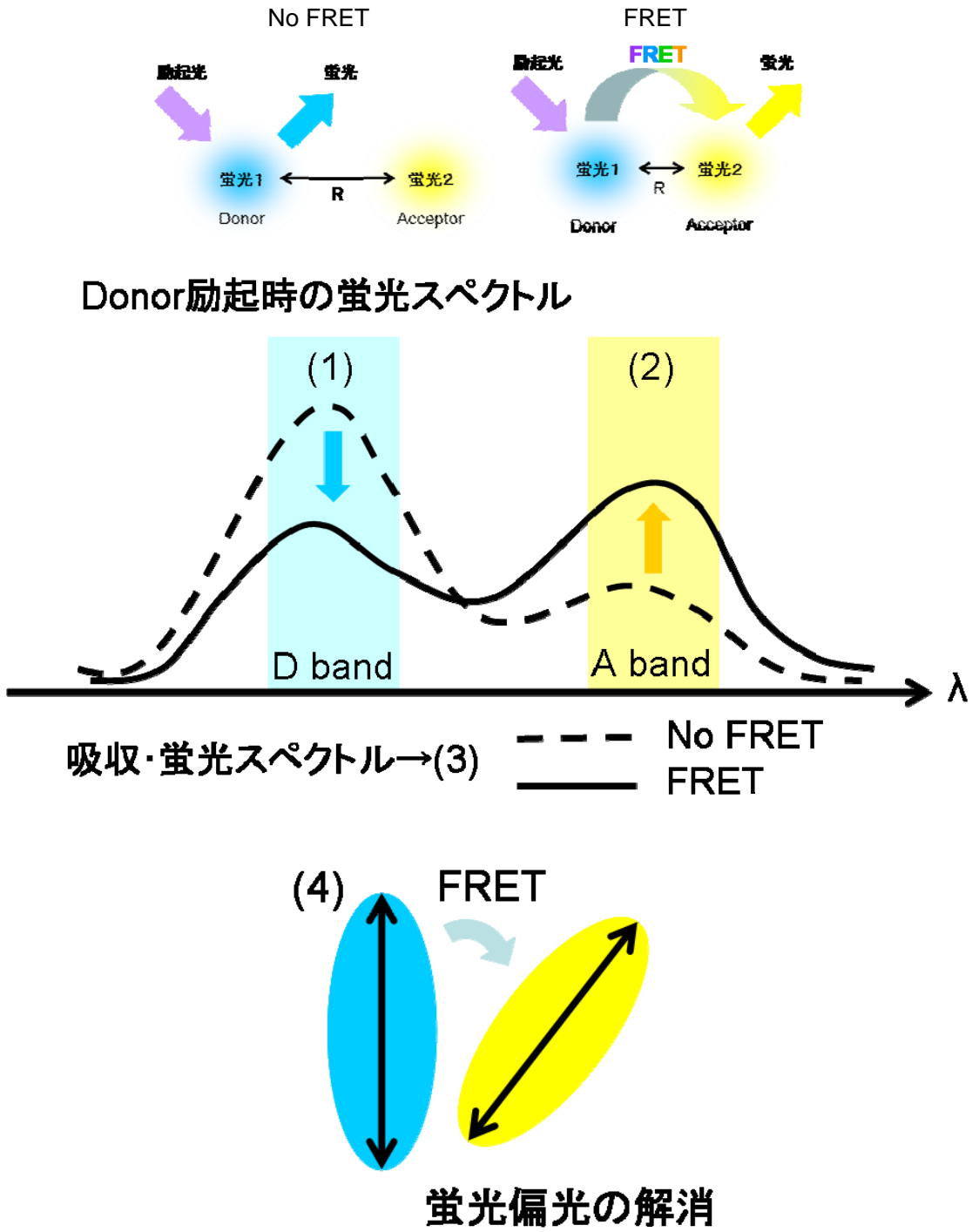


図2.20 FRETの計測方法

第3章 細胞内Ca²⁺による神経突起伸展促進効果

3.1 はじめに

セロトニン (5-HT) は神経伝達物質, 神経修飾物質としてよく知られており, 中枢・末梢神経系において様々の生体機能に関わっていることが知られている(Saudou and Hen, 1994). 先行研究で, 脊椎動物(Igarashi et al., 1995; Lieske et al., 1999; Lima et al., 1994; Lotto et al., 1999; Mazer et al., 1997)や無脊椎動物(Haydon et al., 1984; Mercer et al., 1996; Schachtner et al., 1999; Zhou and Cohan, 2001)において, 5-HTが神経突起の伸展や, シナプス形成に影響を与えることが報告されている. 本論文で用いたPC12細胞においても, 5-HT(Severin and Kondratyev, 1988)や, 5-HTと神経成長因子 (Nerve Growth Factor, NGF(Angeletti et al., 1968))の同時刺激(Zachor et al., 2000)によって神経突起伸展が促進されることが報告されているが, この5-HTによる神経突起伸展促進効果の作用機序については明らかではない.

PC12細胞はラット副腎髄質より単離されたクロム親和性褐色細胞腫であり(Greene and Tischler, 1976), NGFに応答して交感神経様に分化することから神経分化や突起伸展のモデル細胞として有用である(Severin and Kondratyev, 1988). この神経様分化に伴って, いくつかのチャンネル(Bouron et al., 1999; Furukawa et al., 1993)や受容体(Bush et al., 1991; Rossino et al., 1990; Zhang et al., 1993)が発現されることが知られており, その一つに5-HT₃型受容体(Gordon and Rowland, 1990; Hanna et al., 2000; Isenberg et al., 1993)がある. この5-HT₃型受容体は, 他のものが全て代謝依存型受容体であるのに対して, 5-HT受容体のサブタイプの中で唯一のイオンチャンネル型受容体である.

分化したPC12細胞に5-HTを加えると, 5-HT₃型受容体を介した内向き電流が流れることが知られており(Furukawa et al., 1992), これによって, 電位依存型のCa²⁺チャンネルを介した細胞内Ca²⁺動員が起こることは十分に考えられる. また一方で, PC12細胞はGqタンパクに結合した5-HT_{2A}型受容体を未分化な細胞において発現することが知られており(Quinn et al., 2002), この受容体の活性化によってイノシトール3リン酸 (Inositol 1,4,5-trisphosphate, IP₃)を介した, 細胞内小胞からのCa²⁺放出が起こる可能性がある. しかし, 5-HTによって, 5-HT₃型受容体, もしくは5-HT₂型受容体を介して, 細胞内Ca²⁺動員が起こるかどうかについて,

未だ明らかではない。

細胞内Ca²⁺は生体での重要なセカンドメッセンジャーであり、神経突起伸展などを含む、様々の生命現象に関わっている(Bolsover, 2005)。PC12細胞においても高濃度KCl刺激(Solem et al., 1995)、ATP(Behrsing and Vulliet, 2004)、GTP(Gysbers et al., 2000)等の刺激による細胞内Ca²⁺動員と神経突起伸展への効果が示されている。もし5-HTによって細胞内Ca²⁺動員が起これば、これが神経突起伸展の効果に関わっている可能性がある。

本章ではPC12細胞を用いて、5-HTの神経突起伸展促進効果と5-HTによる細胞内Ca²⁺動員との関係を明らかにし、Ca²⁺シグナルの下流がどのように神経突起伸展促進効果に関わっているかを議論した。

3.2 実験方法

3.2.1 細胞培養

本研究で対象としたPC12細胞は筑波の理化学研究所バイオリソースセンターCELL BANKより入手した。培養液としてDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies USA) にCO₂濃度の平衡剤として44 mM NaHCO₃, pHの緩衝剤として15 mM HEPES, 10% ウマ血清 (Life Technologies USA), 5% ウシ胎児血清 (Life Technologies USA), 50 U/ml ペニシリン-50 µg/ml ストレプトマイシン (Wako, Japan) を加えたものを用いた。37°C, 5% CO₂, インキュベータ内において50 mlカルチャーフラスコ (BD Falcon, USA) にて培養した。実験に用いる際には0.01 µg/ml poly-D-lysine (nacalai tesque, Japan) で、4°Cに一晩コーティングしたガラスベースディッシュ (Iwaki, Japan) に1×10⁴ cell/cm²の濃度で細胞を撒き、一晩インキュベートした後、培養液をDMEMに50 ng/ml NGFを添加した培養液と交換した。その後、NGFを添加した培養液を一日おきに交換した。

3.2.2 神経突起伸展測定

PC12細胞を35×10mmカルチャーディッシュ (Falcon, USA) に撒いた後、一晩インキュベートした後、その培養液を、50 ng/ml NGFを添加した培養液と交換した。PC12細胞を、5-HT濃度 (5 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM; Sigma, USA) と5-HT添加時間 (10 min, 1 day, 3 days) を変えて刺激した。また、必要に応じて、MDL 72222 (1 µM; 5-HT₃型受容体阻害剤; Tocris, UK), Ketanserin (1 µM; 5-HT₂型受容体阻害剤; Tocris, UK), Nifedipine (1 µM; L型Ca²⁺チャネル阻害剤; nacalai tesque, Japan), Trifluoperazine (50 µM; calmodulin阻害剤; LKT laboratories, USA), Cypermethrin (1 µM; calcineurin阻害剤; Santa Cruz Biotech., USA), Cyclosporin A (1 µM; calcineurin阻害剤; Santa Cruz Biotech, USA), KN-62 (1 µM, calmodulin依存型キナーゼ

(Calmodulin-dependent kinase, CaMK) の阻害剤; Tocris, UK) を添加した. 3日間のインキュベーションの後, 細胞をブアン固定液 (Bouin's solution; 15 ml 飽和ピクリン酸, 5 ml ホルマリン, 1 ml 氷酢酸) によって固定した. 細胞を固定した後に位相差顕微鏡によって観察し, Aquacosmosイメージングシステム (Hamamatsu Photonics, Japan) を用いて画像を取得した. 神経突起の数や長さを, Aquacosmosイメージングソフトウェア (Hamamatsu Photonics, Japan) によって測定し, 画像ごとに細胞一つから伸びている神経突起の全長を計測した.

3.2.3 細胞内Ca²⁺イメージング

PC12 細胞が撒かれたガラスベースディッシュの培養液に, 5 μ M の Fura-2-AM (Molecular Probes, USA) を添加し, 37°Cで 30 分間インキュベートした. その後, Krebs-Ringer-HEPES (KRH: 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM, 6 mM glucose, 25 mM HEPES; Wako Japan) または Ca²⁺-free KRH (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 3.2 mM KH₂PO₄, 6 mM glucose, 0.1 mM EGTA, 25 mM HEPES) と培養液を交換し, AM の加水分解の為に 15 分間さらにインキュベートした. Fura-2 により染色された細胞の蛍光画像を Aquacosmos イメージングシステムによって取得した. 細胞を 340 nm と 380 nm の波長の励起光で照射し, 蛍光シグナルを 535/55 nm のバンドパスフィルターによって検出した. これらの画像データによって, 細胞内 Ca²⁺濃度を計算した (2.2 節参照). 蛍光画像を 2-3 秒ごとに取得し, その間に PC12 細胞を 5-HT (10 μ M) または SR 57227 (10 μ M; 5-HT₃ 型受容体選択的作動薬; Tocris, UK) によって刺激した. また必要に応じて, MDL 72222 (1 μ M), Ketanserin (1 μ M), Nifedipine (1 μ M), ω -conotoxin (1 μ M, nacalai tesque, Japan), Thapsigargin (1 μ M, Sigma, USA) を刺激前に添加した.

3.3 実験結果

3.3.1 神経伝達物質5-HTによる神経突起伸展促進

5-HTの神経突起伸展に与える影響を調べるために, PC12細胞を, NGFのみで処理したものの (図3.1A) とNGFと5-HTの同時刺激で処理したものの (図3.1B) で神経突起伸展を比較した. 図に見られるように (図3.1A,B) 一つの細胞体に対する神経突起がどれかを特定することが困難であるため, 画像に見られる神経突起の全長を細胞数で割った値を突起伸展の指標として定め, NGFのみで処理した時の値に対する割合を計算した. すると, 未分化のPC12細胞においては (図3.1C), 5-HTが5 μ M, 10 μ Mのときでは突起伸展は促進されず, 50 μ Mで初めてその効果が見られたのに対して, NGFにより前もって3日間処理して分化誘導させたPC12細胞 (以下NGF分化PC12細胞) においては (図3.1D), 低濃度の5 μ M, 10 μ Mにおいて

も突起伸展促進効果が見られることがわかった。

3.3.2 5-HTの短期刺激による神経突起伸展促進

5-HTが突起伸展に与える効果には、5-HTの投与後どのくらいの時間が有効であるかを調べるために、PC12細胞をNGFと50 μM の5-HTで処理する期間を変えてインキュベートした後、その培養液をNGFのみの培養液に交換し、刺激後3日目で細胞を固定した(図3.2A)。この実験から、未分化のPC12細胞では、10分間、1日間の5-HT処理ではその突起伸展促進効果は見られず、3日間の処理でようやくその効果が見られることがわかった(図3.2B)。これに対して、NGF分化PC12細胞では、初めの10分間のみの5-HT処理で(したがって1日間、3日間の処理でも)十分に突起伸展促進効果が見られることがわかった(図3.2C)。

3.3.3 神経成長因子(NGF)による分化と5-HTによる Ca^{2+} 動員

5-HTによる神経突起伸展促進効果に細胞内 Ca^{2+} 動員が関わっている可能性を検証するために、Fura-2による Ca^{2+} イメージングにより、5-HT刺激時における細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)の測定をおこなった。未分化PC12細胞ではみられなかったが、NGF分化PC12細胞では10 μM 5-HTによって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が観測された(図3.3A, B, 表3.1)。5-HTによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の大きさは、NGFによる細胞分化の過程で増加した(図3.3C)。NGF添加後2日目において明らかな5-HTによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が観測され、さらなるNGF処理期間によって、より大きな $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇がみられた(図3.3B, C)。また、5-HTによって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を見せた細胞の割合は、NGF添加後2日目において増加して、3日目以降には一定になった(表3.1)。高濃度KCl刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の大きさもNGF分化によって増加していることがわかった(図3.3C)。

3.3.4 Ca^{2+} 動員の経路

5-HTによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の経路を調べるために、NGF分化PC12細胞における5-HTによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を調べた。NGF分化PC12細胞は5-HTによって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を引き起こすが(図3.4A)、5-HT₃型受容体のアゴニストである、SR 57227 (10 μM)の添加で同様の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が起こることがわかった(図3.4B)。また5-HT₃型受容体のアンタゴニストであるMDL 72222 (1 μM)を添加すると、5-HTによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は見られなかった(図3.4C)。これらの試薬によって高濃度KCl刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は影響を受けなかった(図3.4A-C)。5-HT₂型受容体の阻害剤であるKetanserin (1 μM)を添加しても5-HTによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇(表3.2)や細胞の応答率(68.3% \pm 4.9%)は影響を受けなかった。細胞内小胞における Ca^{2+} -ATPaseの阻害剤である、Thapsigargin (1 μM)を添加すると、細胞内小胞から Ca^{2+} が漏出し、30分程度で細胞内小胞内の Ca^{2+} が枯渇する。そこでPC12細胞をThapsigargin (1 μM)で30分間処理した後5-HTで刺激

したが、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の大きさは低下した(表3.2)が、細胞の応答率はそれほど低下しなかった($52.5\% \pm 4.0\%$)。また Ca^{2+} -free KRH中では5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はみられなかった(表3.2)。電位依存性 Ca^{2+} チャネルが5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に関わっているかを調べるために、L型とN型 Ca^{2+} チャネルのブロッカーでPC12細胞を処理した。L型 Ca^{2+} チャネルのブロッカーである、Nifedipine (1 μ M)の存在下では5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は抑制された(図3.4D)。一方でN型 Ca^{2+} チャネルのブロッカーである ω -conotoxin (1 μ M)の存在下では、明らかな抑制は認められなかった(図3.4E)。細胞の応答率はNifedipine ($18.0\% \pm 11.8\%$)においても ω -conotoxin ($31.1\% \pm 6.3\%$)においても減少した。これら Ca^{2+} チャネルのブロッカーによって高濃度KCl刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は抑制された(図3.4D, E)。以上のことから、5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、5-HT₃型受容体の活性化とL型 Ca^{2+} チャネルを介して起こることがわかった。

3.3.5 Ca^{2+} 動員と神経突起伸展促進

5-HTによる突起伸展促進効果に5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が関わっているかどうかを調べるために、5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を起こさない未分化PC12細胞と、NGF分化PC12細胞において、 Ca^{2+} イメージングをおこなったときと同様な条件で、神経突起伸展への効果を調べた。50 μ M 5-HTで処理した未分化PC12細胞では、MDL 72222 (1 μ M), Nifedipine (1 μ M), Ketanserin (1 μ M)の全てにおいて、5-HTによる神経突起伸展促進効果は抑制された(図3.5A)のに対して、10 μ Mまたは50 μ M 5-HTで処理したNGF分化PC12細胞では、MDL 72222 (1 μ M), Nifedipine (1 μ M)によって突起伸展促進は抑制されたが、Ketanserin (1 μ M)では抑制されなかった(図3.5B)。なお、これらの薬理処理そのものによる突起伸展への影響がないことを確認した。

3.3.6 神経突起伸展促進に関わる Ca^{2+} 関連シグナル

5-HTによって $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起こることにより、CaMが活性化して、さらにCaN, CaMKが活性化されると考えられることから、これらのタンパク質の5-HT神経突起伸展促進効果への関与を調べた。未分化PC12細胞(図3.6A)においても、NGF分化PC12細胞(図3.6B)においても、calmodulin阻害剤であるTrifluoperazine (1 μ M), calcineurin阻害剤であるCyclosporin A (1 μ M)とCypermethrin (1 μ M)によって突起伸展促進は抑制されたが、CaMK阻害剤であるKN-62 (1 μ M)では抑制されなかった。このときCyclosporin A, Cypermethrin, KN-62の添加においては突起伸展自体への影響はみられなかったが、Trifluoperazineは、細胞の球状化や神経突起退縮を引き起こしたので、評価には用いられなかった。おそらくCalmodulinを抑制することによって5-HTの効果を抑制するだけでなく、それとは別の副次的な作用によって神経突起を退縮させてしまったと考えられる。

3.4 考察

3.4.1 5-HT₃型受容体によるCa²⁺動員

本研究では、NGF分化PC12細胞において5-HTによる[Ca²⁺]_i上昇を確認した(図3.3)。PC12細胞において細胞内Ca²⁺動員を起こす5-HT受容体の候補は、IP₃経路で細胞内小胞からのCa²⁺動員を起こす5-HT₂型受容体と、電位依存性Ca²⁺チャネルもしくはそれ自身を通して細胞外からのCa²⁺動員を起こす5-HT₃型受容体である(Saudou and Hen, 1994)。本研究の結果より、5-HTによる[Ca²⁺]_i上昇は、5-HT₃型受容体により引き起こされ、5-HT₂型受容体は関与していないことが明らかになった。また、この[Ca²⁺]_i上昇がL型Ca²⁺チャネルを介していることから、5-HT₃型受容体が活性化されることによって膜電位が脱分極し、これによって電位依存性Ca²⁺チャネルであるL型Ca²⁺チャネルを通してCa²⁺が流入することがわかった。Thapsigarginによって細胞内Ca²⁺貯蔵を枯渇させると5-HTによる[Ca²⁺]_i上昇が小さくなることから、Ca²⁺依存性Ca²⁺放出(Ca²⁺ induced Ca²⁺ release, CICR)も関与していると考えられる。

3.4.2 NGFによる分化における5-HTによるCa²⁺動員増強

本研究で確認された、NGF分化の過程における5-HT₃型受容体を介したCa²⁺動員の応答増強(図3.3)は、先行研究で見られる、NGFにより分化したPC12細胞での5-HT₃型受容体の認識部位増加(Gordon and Rowland, 1990)や、5-HT₃型受容体のmRNA発現の増加(Hanna et al., 2000; Isenberg et al., 1993)の結果と一致している。また、応答増強には、電位依存性Ca²⁺チャネルの発現(Bouron et al., 1999; Furukawa et al., 1993)も関与していると考えられる。実際、本研究においても、電位依存性Ca²⁺チャネルを通じた高濃度KCl刺激による[Ca²⁺]_i上昇もNGF分化によって増強している(図3.3B)。また、表3.1より必ずしもNGF分化後期の細胞でもすべての細胞が応答するわけではないことがわかった。これはNGF添加の最中にも分裂中の未分化の細胞が存在するため一定の応答を見せない細胞がいるためであると考えられる。一方でNGFにより分化がより進むとさらに5-HTによるカルシウム応答を示すようになると考えられる。

3.4.3 Calcineurinを活性化による神経突起伸展の促進

本研究では5-HTによる神経突起伸展促進効果が確認された(図3.1)。これは5-HTによって突起をもつ細胞の割合を調べた先行研究に一致している(Severin and Kondratyev, 1988; Zachor et al., 2000)。また、NGF分化PC12細胞で5-HTに対する感受性が増加していることが

示された (図3.1C,D). これは5-HTの神経突起伸展促進のシグナル伝達に変化したか、または増強されたものと考えられる. また、NGF分化細胞では5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が増強されていることがわかった (図3.3). このことから5-HTによる神経突起伸展促進には、5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が関わっていると仮説を立てた. 実際、5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制する、Nifedipine, MDL 72222によって5-HTの神経突起伸展促進を抑制することがわかった. このことから、5-HTの神経突起伸展促進効果は5-HT3型受容体とL型 Ca^{2+} チャネルを介した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇によることが示された (図3.5).

未分化PC12細胞を5-HTで処理すると、Extracellular signal-regulated kinase (ERK)が活性化され(Quinn et al., 2002), さらに*TIS8/egr-1*, *c-fos*遺伝子が発現誘導される(Humblot et al., 1997)が、これには5-HT2型受容体が関与していることが知られている. NGFでPC12細胞を処理すると持続的なERKの活性化(Agell et al., 2002)や、*c-fos*遺伝子の発現誘導(Bonni et al., 1995)が起こることから、5-HT2型受容体の突起伸展への影響も考えられる. 本研究でも未分化PC12細胞において、5-HT2型受容体を介した、5-HTによる神経突起伸展促進効果が確認された (図3.5A). しかし、未分化PC12細胞では、5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を示さないこと (図3.3) や、一過的な5-HT処理は突起伸展促進を引き起こさないことから (図3.2B), 5-HT2型受容体を介した突起伸展促進は、一過的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇によるシグナル伝達によるものではないと考えられる. これにはPLCからの IP_3 シグナルと別経路であるDGを経由するPKCの活性が関わっているかも知れない (図1.2). 一方で、5-HT3型受容体を介した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、未分化PC12細胞、NGF分化PC12細胞の両方で突起伸展促進を引き起こすことがわかった (図3.5). このことから、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、5-HTによる神経突起伸展促進効果の主要なシグナルであるということがわかった. $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はATP(Behrsing and Vulliet, 1999)やGTP(Gysbers et al., 2000)によるPC12細胞の神経突起伸展促進効果のシグナルでもある.

本研究では、5-HTによる刺激が一過的であっても神経突起伸展促進効果があることがわかった (図3.2C). この結果は神経突起伸展促進では持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は必要がなく、一過的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がその後の細胞の運命を決定するというを示している. 実際一過的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇によりCaMKとERKを短時間 (数分程度) で活性化させることが知られている (Behrsing and Vulliet, 2004; Mark et al., 1995). 高濃度KCl刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はCaMKを活性化して突起伸展を誘発することが知られている(Solem et al., 1995)が、5-HTによる神経突起伸展促進にはCaMKは関与していないと考えられる (図3.6). この結果はATPによる神経突起伸展促進の結果と一致している (Behrsing and Vulliet, 2004). また本研究の結果から5-HTによる神経突起伸展促進にはcalmodulinとcalcineurinが関与していることがわかった (図3.6). calcineurinの活性化はActin depolymerizing factor (ADF)/cofilinを活性化することが知られている (Meberg et al., 1998; Wang et al., 2005).

3.4.4 生体内における5-HTの神経突起伸展への影響

5-HTは胚発生期に成長因子として、またBrain-derived neurotrophic factor (BDNF), S100 β などの他のメッセンジャーと協同的にも働くことが知られている(Sodhi and Sanders-Bush, 2004). また5-HT神経系の発生阻害は、脳機能の変化を引き起こし、自閉症やダウン症などが発症する可能性がある(Whitaker-Azmitia, 2001).

これらの中で、5-HT₃型受容体を介した神経の発生のメカニズムもいくつか報告されている. 5-HT₃型受容体の活性化はマウス視床神経の神経突起を伸展させる(Lotto et al., 1999). また、ラット大脳皮質のGABA介在性ニューロンは5-HT₃型受容体の活性化によって形態を変化させる(Vitalis and Parnavelas, 2003). しかし、これらの形態変化に関するシグナル伝達経路については未だ明らかではない. これらの形態変化においても本研究で見られた伝達経路を用いている可能性があると考えられる.

3.5 第3章のまとめ

5-HTは、様々な生物における神経発生に関わっているが、そのシグナルについては明らかではない. 本章では、5-HTでPC12細胞を処理するとNGFによる神経突起伸展が促進されることを示した. また、5-HTに対する感受性は、NGFによる分化によって高まった. NGF分化PC12細胞では、5-HT₃型受容体と電位依存型Ca²⁺チャンネルを介して、5-HTによる細胞内Ca²⁺動員が観察された. 5-HTによる[Ca²⁺]_i上昇はNGFによる分化の過程で増大した. 5-HT₃型受容体と電位依存型Ca²⁺チャンネルを介した5-HTによる[Ca²⁺]_i上昇は、5-HTの神経突起伸展促進効果に必要なことがわかった. またこの効果には、Ca²⁺シグナルの下流のcalmodulinとcalcineurinが関わっていることがわかった. このようにCalcineurinは長期的には神経突起を伸展させるはたらきをすることがわかったが、一方で、ADF/cofilinの脱リン酸化を制御することによって、より直接的に細胞骨格を制御している可能性がある. 次章では、同じPC12細胞における細胞内Ca²⁺シグナルが、短期的には神経突起の退縮を制御していることを示し、そのシグナル伝達機構を調べた.

表3.1 NGF分化過程における5-HTによるCa²⁺応答を示した細胞の比率

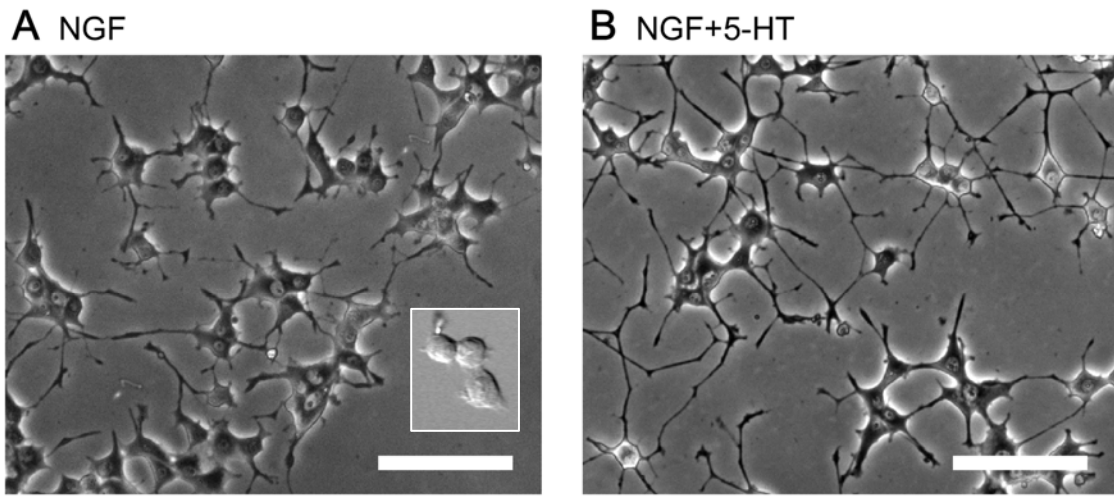
NGF 処理期間	Percentage of responded cells (%)
0 day	0.5 ± 0.5
1 day	4.5 ± 1.5
2 days	59.8 ± 2.1*
3 days	65.7 ± 7.9*
4 days	52.8 ± 3.8*
5 days	66.8 ± 2.5*
6 days	59.2 ± 9.6*

5-HTによって応答を示した細胞の比率（平均±標準誤差）を表している。この結果は、N=3~7の独立な実験による。コントロール（0 day）と比較したときのP値<0.05のときを*で示している。

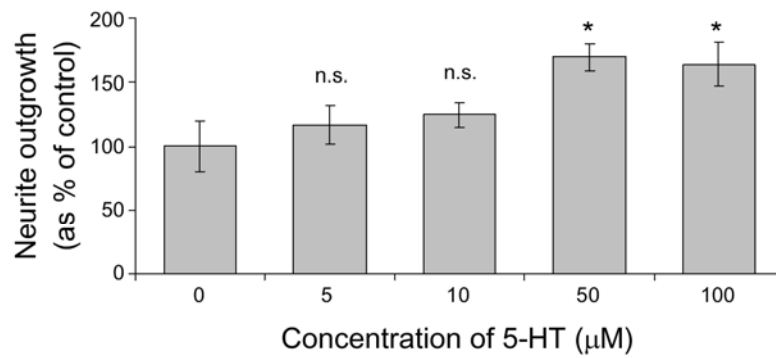
表3.2 様々な条件におけるPC12細胞のCa²⁺応答の振幅の大きさ

薬理処理	5-HT-induced [Ca ²⁺] _i increase (nM)
Controls	108.7 ± 8.6 (100%)
MDL 72222 (1 μM)	N.D.
Ketanserin (1 μM)	108.7 ± 10.2 (100%)
Nifedipine (1 μM)	21.9 ± 2.6* (20%)
ω-CgTX (1 μM)	104.4 ± 7.6 (96%)
Ca ²⁺ -free medium	N.D.
Thapsigargin (1 μM)	76.1 ± 3.8* (70%)

これらの値は、応答した細胞の平均±標準誤差を示している (n = 25-138). 括弧の中の値はコントロールに対するパーセンテージを表している. N.D.: 測定不能, MDL 72222: 5-HT₃型受容体阻害剤, Ketanserin: 5-HT₂型受容体阻害剤, Nifedipine: L型Ca²⁺チャネルブロッカー, ω-CgTX (ω-conotoxin GVIA): N型Ca²⁺チャネルブロッカー. コントロール (0 day) と比較したときのP値<0.05のときを*で示している.



C Undifferentiated cells



D Differentiated cells

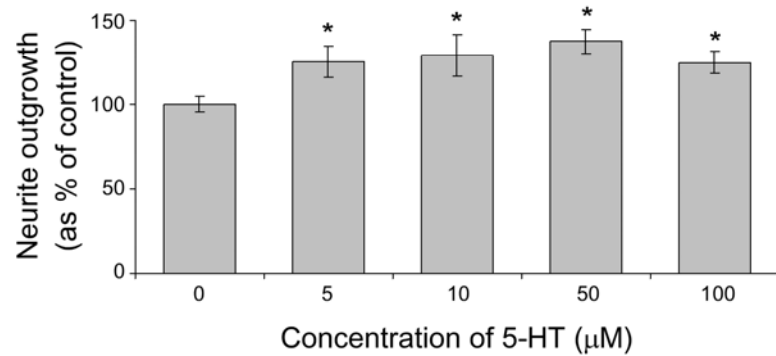


図3.1 5-HTはPC12細胞のNGF神経突起伸展を促進する

NGFのみで3日間処理したPC12細胞に比較して (A), NGF+5-HT (50 μM) で3日間処理

第3章 細胞内カルシウムによる神経突起伸展促進効果

した細胞は (B), 神経突起の数も長さも増大した. (A) の挿入図はNGF添加前のPC12細胞の微分干渉顕微鏡画像. 未分化な細胞 (C) 及び, 3日間NGFで処理した分化PC12細胞において (D), 5-HTは, NGF神経突起伸展を濃度依存的に促進した. PC12細胞は3日間, NGFと5-HT (5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M) で処理された. 無作為にPC12細胞の画像が取得後, 画像ごとに全神経突起の長さや細胞数を測定し, 一細胞あたりの伸ばしている神経突起の長さを計算した. 神経突起伸展はNGFのみでの突起伸展に対する比率で表されている. それぞれの画像において86-398細胞の神経突起の長さを測定した. データは, 平均 \pm 標準偏差で表されている (N=5-17). コントロールと比較したときのP値<0.05のときを*で示している. スケールバー: 100 μ m

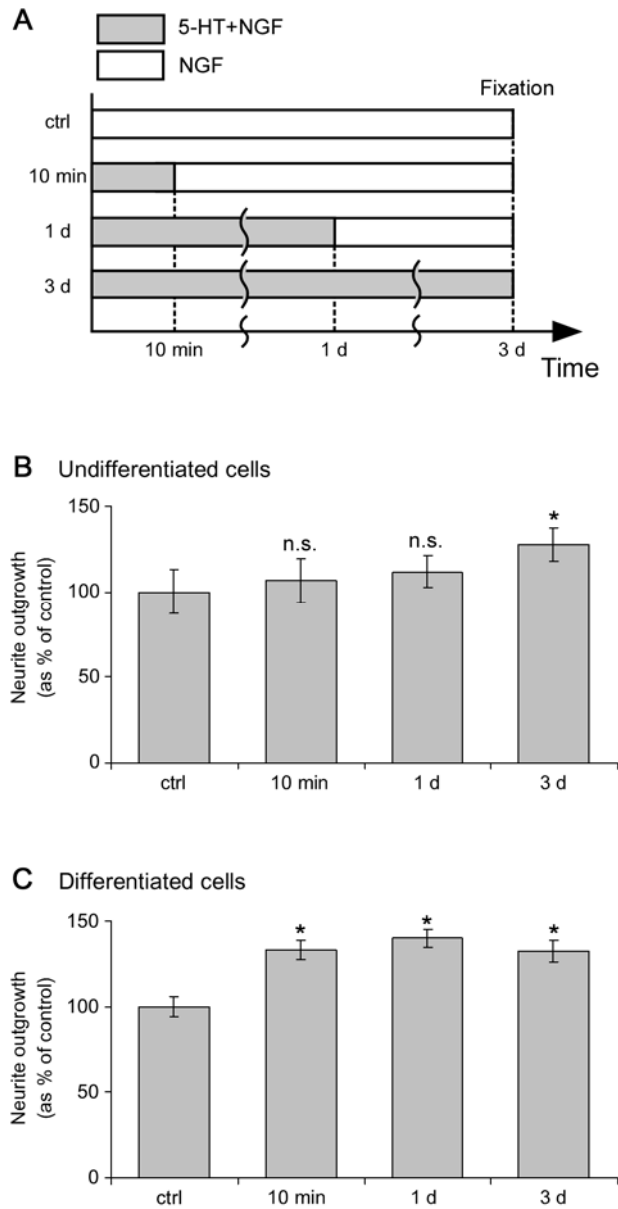


図3.2 短期間の5-HT刺激はNGF分化PC12細胞の神経突起伸展を促進する

PC12細胞は5-HT (50 μ M) とNGFによって期間を変えて (10 min, 1 day, 3 days) 処理し、Bouin固定した (A)。未分化PC12細胞では5-HTの神経突起伸展促進効果は10 min, 1 dayでは確認されなかったが (B)、NGF分化PC12細胞では、10 min, 1 day, 3 daysの全てにおいて5-HTによる神経突起促進効果が確認された。コントロールと比較したときのP値<0.05のときを*で示している。

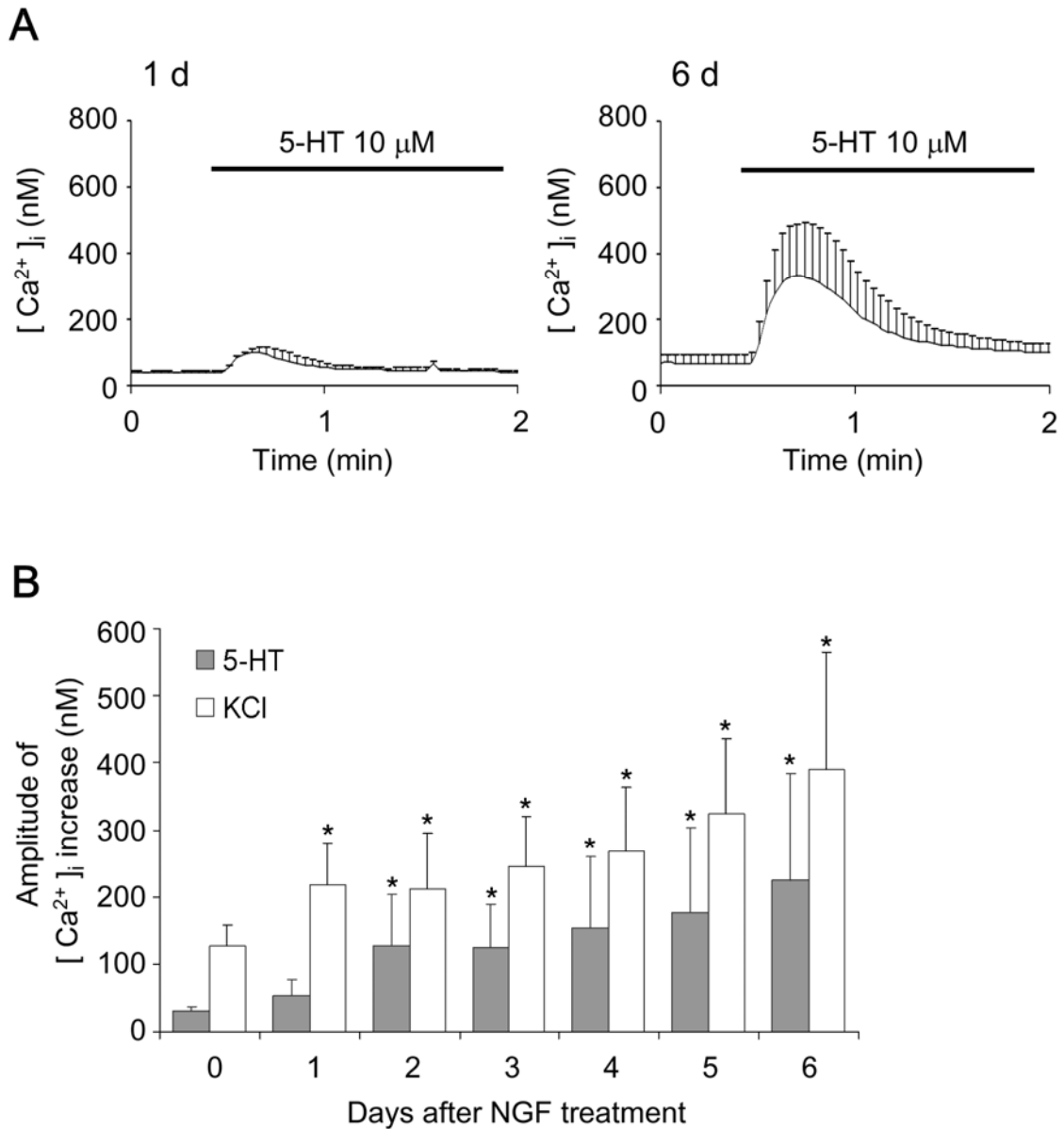


図3.3 NGF分化によって5-HTによるCa²⁺応答が大きくなる

PC12細胞を, fura-2によって染色し, 5-HTによるCa²⁺応答を測定した(実験方法参照). NGF添加後, 1 day (n = 10; A), 6 days (n = 98; B)における典型的な5-HTによるCa²⁺応答を示す. データは, 平均±標準偏差を示している. NGF分化過程における5-HTによるCa²⁺応答と高濃度KCl刺激によるCa²⁺応答の強度変化を示した(C). データは, 平均±標準偏差(n = 119-645)を示している. コントロールと比較したときのP値<0.05のときを*で示している.

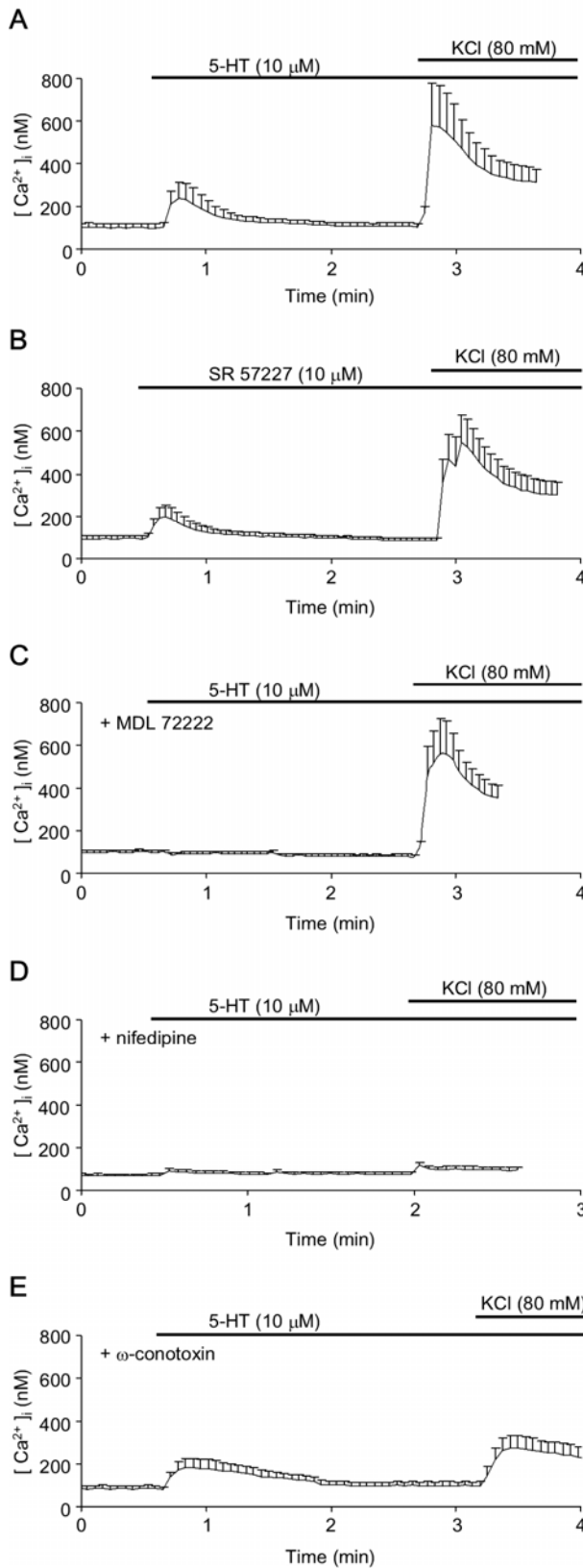


図3.4 NGF分化したPC12細胞における5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は5-HT3型受容体とL型 Ca^{2+} チャネルを介している

(A) NGF分化したPC12細胞では5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察される (n = 48). (B) 5-HT3型受容体のアゴニストであるSR 57227 (10 μ M)を添加すると5-HTと同様の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察された (n = 30). (C) 5-HT3型受容体のアンタゴニストであるMDL 72222 (1 μ M)の存在下では5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は観察されなかった (n = 17). (D) L型 Ca^{2+} チャネルのブロッカーであるnifedipine (1 μ M)存在下では、5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇もKClによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇も観察されなかった (n = 18). (E) N型 Ca^{2+} チャネルのブロッカーである、 ω -conotoxin GVIA (ω -CgTX, 1 μ M)では5-HTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は抑制しなかったが、KClによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制した (n = 27). データは、平均 \pm 標準偏差を表している.

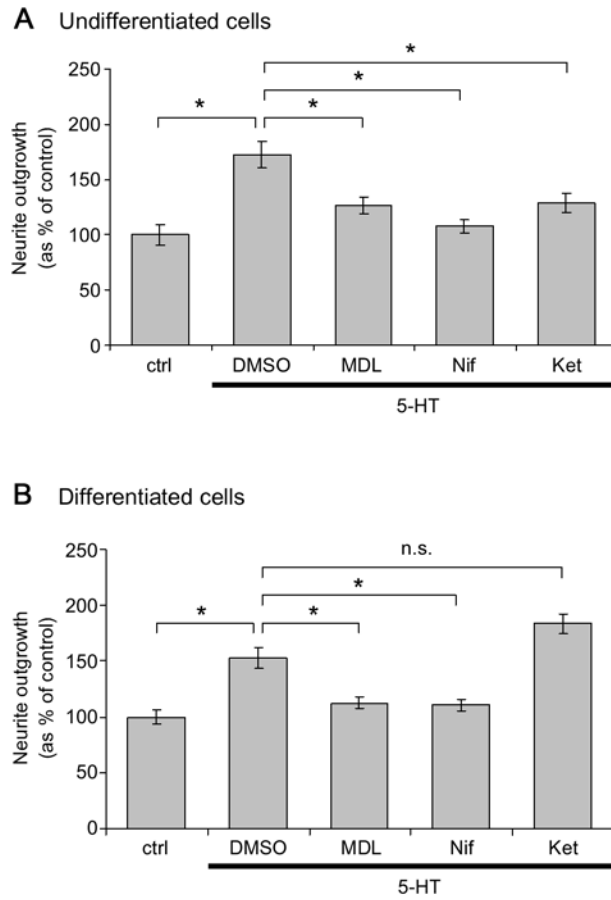


図3.5 5-HTは5-HT₃型受容体とL型受容体を介してNGF神経突起伸展を促進する

未分化PC12細胞 (A) とNGF分化PC12細胞 (B) はMDL 72222 (MDL, 1 μ M), nifedipine (Nif, 1 μ M), ketanserin (Ket, 1 μ M)で前処理した後, NGFと5-HT (50 μ M) によって刺激した. NGFのみによって刺激した細胞 (ctrl) と比較して, 5-HTによって処理した細胞では神経突起伸展は促進された. 未分化PC12細胞において神経突起伸展促進はMDL, Nif, Ketにおいて阻害されたが, NGF分化PC12細胞において, Ketは神経突起伸展促進を阻害しなかった. データは, 平均±標準誤差を表している (N = 20-30). コントロールと比較したときのP値<0.05のときを*で示している.

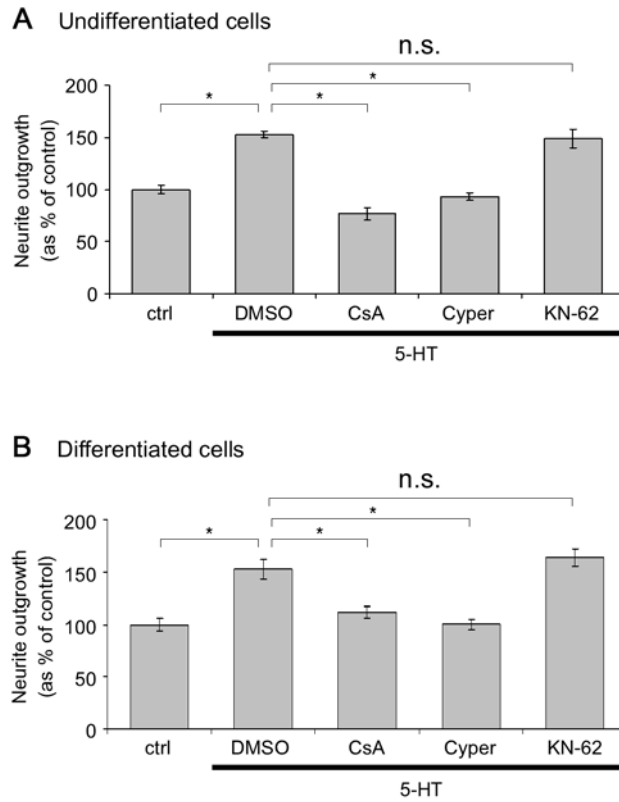


図3.6 5-HTはcalcineurin活性を介してNGF神経突起伸展を促進する

未分化PC12細胞 (A) とNGF分化PC12細胞 (B) を, 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO), cyclosporine A (CsA; 1 μ M), cypermethrin (Cyper; 1 μ M), KN-62 (1 μ M)で前処理後, NGFと5-HT (50 μ M)で刺激した. データは, 平均±標準誤差を表している (N = 10-14). コントロールと比較したときのP値<0.05のときを*で示している.

第4章 細胞内Ca²⁺によるアクチン細胞骨格の制御

4.1 はじめに

アデノシン3リン酸 (ATP) は、細胞内のエネルギーとしてだけでなく神経伝達物質として、様々な細胞種で細胞分化や神経突起伸展に関わる(Franke and Illes, 2006) (図4.1)。また、ATPは成熟神経細胞において、細胞死や神経変性を引き起こすことが知られている(Franke et al., 2006)。これらの現象では、プリン作動性受容体 (P2受容体) の活性化を介してアクチン細胞骨格系が制御されていると考えられる。

PC12細胞は、P2受容体のサブタイプであるP2X受容体とP2Y受容体を発現することが知られている(Arslan et al., 2000; Hur et al., 2001; Kim and Rabin, 1994)。P2X受容体は、イオンチャネル型受容体であり、活性化すると、受容体を通して (または膜電位を脱分極させることによる、電位依存型Ca²⁺チャネルを活性化して、) [Ca²⁺]_i上昇を引き起こす。一方で、P2Y受容体は、Gタンパク質結合型受容体であり、ホスホリパーゼC (PLC) を活性化してイノシトール3リン酸 (IP₃) を産生することで細胞内小胞からの[Ca²⁺]_i上昇を引き起こす(Arslan et al., 2000)。P2受容体を介して、プリン(Arthur et al., 2005; Behrsing and Vulliet, 2004; D'Ambrosi et al., 2001; Gysbers et al., 2000)やピリミジン(Pooler et al., 2005)は、他のいくつかの神経伝達物質のようにPC12細胞のNGFの感受性を高め、神経突起伸展を促進することが知られている(Grumolato et al., 2003; Homma et al., 2006; Severin and Kondratyev, 1988; Tagliatela et al., 1991)。しかし、これら長期的なATPの効果とは別に、短期的かつ直接的にアクチン細胞骨格系に与えるATPの効果については未だ明らかでない。

本研究では、アクチン細胞骨格系の重要な制御タンパク質として、Actin depolymerizing factor (ADF)とcofilinに注目した。この2つのタンパク質は、類似性の高い構造をしており、同様の働きをするので(Hotulainen et al., 2005)、“ADF/cofilin”と総称されるが、ここでは以下コフィリンと記述する。

コフィリンはアクチン結合タンパク質であり、アクチンの脱重合やアクチンフィラメントの切断に関わっている。これらの活性により、コフィリンは様々な生理過程に関わっている(Sarmiere and Bamburg, 2004)。

第4章 細胞内カルシウムによるアクチン細胞骨格の制御

コフィリンは3番目のセリンのリン酸化で不活性になる(Agnew et al., 1995; Morgan et al., 1993). このコフィリンのリン酸化は, LIM-kinase (LIMK) (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998) と, Testis-specific protein kinase (TESK) (Toshima et al., 2001a; Toshima et al., 2001b)によって制御される. LIMK(Edwards et al., 1999; Maekawa et al., 1999)とTESK(Toshima et al., 2001a)は, いくつかの低分子量Gタンパク質Rhoファミリーによって制御される. 一方でコフィリンの脱リン酸化は, Slingshot (SSH) (Niwa et al., 2002)やChronophin(Gohla et al., 2005)によって制御される. SSHは, p21-activated kinase-4 (PAK4) (Soosairajah et al., 2005), 14-3-3 proteins(Nagata-Ohashi et al., 2004), phosphoinositid 3-kinase (PI3K) (Nishita et al., 2004)によって不活性化し, F-actinの結合(Nagata-Ohashi et al., 2004)やcalcineurinの脱リン酸化(Wang et al., 2005)によって, 活性化する. これらコフィリンの活性, 不活性をATPが制御している可能性がある.

本研究では, NGF分化PC12細胞をATPのアクチン細胞骨格制御のモデルとして用い, ATPを添加したときの即時的なアクチン動態への影響を調べた. コフィリンとアクチンの動態を調べるために, ヒト由来のcofilin-1とVenus (Cofilin-Venus), Ceruleanとヒト由来の β -actin (Cerulean-actin)の融合タンパク質を作製した. またこれらのタンパク質同士の相互作用をFRETを用いて見積った. さらにこれらの相互作用を制御するシグナル伝達経路について議論した.

4.2 実験方法

4.2.1 蛍光融合タンパク質の作製

Venus-pCS2は, 宮脇敦史氏 (Laboratory for Cell Function Dynamics, Advanced Technology Development Group, Brain Science Institute, RIKEN)よりいただいた (図4.2A). pmCerulean-C1は, Dr. Piston (Department of Molecular Physiology and Biophysics, Vanderbilt University Medical Center)よりいただいた (図4.2B). human cofilin-1のcDNAは, SuperScript Premade cDNA library (human heart; Invitrogen, USA)から単離したものを, PCRで増幅し, Venus-pCS2のHindIII/BamHIサイトに挿入した (Cofilin-Venus, 第2章2.3.2参照). このときCofilinとVenusの間に付加的なリンカーとしてLAAT (注: アミノ酸表記) を挿入している(Bernstein et al., 2000). またプライマーの端に変異を加えてプラスミド全体をPCRすることで, コフィリンのSer(3)をAlaに変異させた (第2章2.3.2参照). pEYFP-actin (Clontech, USA)のhuman- β -actinをPCRで増幅し, pmCerulean-C1のXho I/BamHIサイトに挿入した (Cerulean-actin).

4.2.2 細胞培養と遺伝子導入

第4章 細胞内カルシウムによるアクチン細胞骨格の制御

本章の実験で用いたPC12細胞は、本論文第3章に記載されていると同様な方法で培養した。PC12細胞への遺伝子導入はLipofectamin 2000 (invitrogen, USA)を用いた。まず、DNA 8.0 μg (正味を換算)とOpti-MEM I (500 μl ; invitrogen, USA), Lipofectamin 2000 20 μl とOpti-MEM I (500 μl)をそれぞれ混合し、5分間室温で放置、さらに両者を混合し20分間室温で放置、(その間、PC12細胞を培養している50ml培養フラスコの培養液を無血清、無抗生物質のDMEMに交換しておいた。) 20分経過したら混合液を培養フラスコに加えて、4-6時間、37°C, 5% CO₂の環境でインキュベートした。その後、細胞を前もって一晚PDLでコートしておいたガラススペースディッシュに撒いた。

4.2.3 タイムラプスビデオ蛍光観察

NGF分化PC12細胞は、蛍光イメージングシステム (TE300, Nikon, Japan; Aquacosmos imaging system, Hamamatsu Photonics, Japan) と全反射蛍光顕微鏡 (TIRF microscope, total internal reflection fluorescence microscope; TE2000-U Nikon, Japan) イメージングシステム (Aquacosmos imaging system, Hamamatsu Photonics, Japan)により観察した(第2章2.1.3参照)。

細胞は、20倍 (S Fluor, Nikon, Japan), 60倍 (Plan Apo, Nikon, Japan), または、60倍 (Plan Apo, TIRF, Nikon, Japan), 100倍 (Plan Apo, TIRF, Nikon, Japan)の対物レンズで観察し、10秒毎に蛍光画像を取得した。蛍光イメージング中は細胞を、Microscope incubation system (Tokai Hit, Japan)によりインキュベートした。PC12細胞を100 μM ATP (Junsei chemical, Japan), 100 μM 2-MeSATP (P2X受容体の選択的作動薬; SIGMA, USA) または100 μM UTP (P2Y受容体の選択的作動薬; nacalai tesque, Japan) により刺激し、この時の蛍光を観察した。また必要に応じて、suramin (200 μM ; P2受容体阻害剤; TOCRIS, USA), ionomycin (1 μM ; Ca²⁺イオン透過担体; nacalai tesque, Japan), HCl (1 mM; nacalai tesque, Japan), thapsigargin (1 μM ; 選択的細胞内小胞Ca²⁺ポンプ阻害剤; SIGMA, USA), trifluoperazine (100 μM ; calmodulin阻害剤; LKT Laboratories, USA), cypermethrin (1 μM ; calcineurin阻害剤; SANTA CRUZ BIOTECHNO, USA), KN-92 (1 μM ; CaMK阻害剤; CALBIOCHEM, USA)を投与した。

4.2.4 細胞内イオン濃度測定

細胞内Ca²⁺濃度測定のために (3.2.3参照), NGF分化PC12細胞を5 μM Fura-2-AMによって染色した。細胞内pH測定には、2 μM BCECF-AM (Molecular probe, USA)が用いた。BCECFは、440 nm, 480 nmの波長の光で励起し、535/55 nmのバンドパスフィルターで蛍光を観察した。この蛍光画像データから細胞内pHを測定した (第2章参照)。蛍光イメージング中に、PC12細胞を、ATP (100 μM), 2-MeSATP (100 μM), UTP (100 μM)で刺激し、必要に応じて、suramin (200 μM), thapsigargin (1 μM)で処理した。

4.2.5 FRET測定

蛍光タンパク質を発現しているPC12細胞は、Metamorphイメージングシステム (Molecular Devise, USA) を用いて観察した。Ceruleanを、440 nmの波長の照射光で励起し、480 nm, 535 nmのバンドパスフィルターを通して蛍光を観察した。Venusを、480 nmの波長の照射光で励起し、535 nmのバンドパスフィルターを通して蛍光を観察した。これらの蛍光画像データからFRET効率 E は以下の式で計算した。

$$E = (F_{440-535} - \alpha \cdot F_{480-535}) / F_{440-480} \quad (1)$$

ここで、 $F_{440-535}$ は、440 nmの照射光で励起して535 nmのバンドパスフィルターで観察した時の蛍光強度、 $F_{480-535}$ は、480 nmの照射光で励起して535 nmのバンドパスフィルターで観察した時の蛍光強度、 $F_{440-480}$ は、440 nmの照射光で励起して480 nmのバンドパスフィルターで観察した時の蛍光強度を表している。 α は、440 nmの照射光でVenusを励起したとき蛍光と480 nmの照射光でVenusを励起したとき蛍光の比を表しており、あらかじめVenusのみを発現しているPC12細胞を440 nmと480 nmの照射光で励起した画像データから、 $\alpha = 0.095$ という値を求めた。画像計算には、MATLAB (Mathworks, USA), Aquqcosmosイメージングソフトウェア (Hamamatsu Photonics, Japan) を用いた。

4.2.6 ウェスタンブロットティング法

PC12細胞を、各条件で培養後、PBSで2回洗浄し、セルスクレイパーで細胞を単離し、氷上の15mlの遠沈管に移し、800 rpm (80×g) で、0°C、5分間遠心して、細胞を沈殿させた。その後、上清をとり、タンパク質可溶化バッファー (50mM HEPES, pH7.4, 1% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1mM EDTA, 1mM dithiothreitol), プロテアーゼ阻害剤カクテル (nacalai tesque, Japan) を加え、超音波ホモジナイザーを用いて破砕した。タンパク質溶解液を、等量のサンプルバッファーと混合し、100°Cで3分間加熱した。得られたサンプルを、18%SDSゲルで40分間、250Vで電気泳動した。ゲルのタンパク質をセミドライブロットティングにより、60分間、15Vで、ニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンを、3%スキムミルクでブロッキング後、1%ヤギ血清で1/1000希釈した抗リン酸化コフィリンのウサギ抗体 (SANTA CRUZ BIOTECHNO, USA) で4°C一晩振とうした。その後0.1%Tween-PBSで5分間3回洗浄し、抗ウサギIgGのHRP抗体 (Amersham Bioscience, USA) で1時間染色し、これを化学発光試薬 (ECL, Amersham Bioscience, USA) で発光させX線フィルムで検出した。

4.3 実験結果

4.3.1 融合タンパク質Cofilin-Venusの作製

細胞内におけるコフィリンの動態を調べるために、human cofilin-1と、そのリン酸化されない変異体を、Venusと連結させて融合タンパク質を作製した（Cofilin-Venus, Cof(S3A)-Venus; 図4.3A）。PC12細胞に遺伝子導入されたCof-Venusは、PC12細胞に一樣に発現されていた（図4.3B）が、全反射顕微鏡を用いた観察により、NGF分化PC12細胞の細胞辺縁でフィラメント状の構造が観察された（図4.3C）。このフィラメント状の構造はVenus-actinを発現したPC12細胞で観察されたアクチンフィラメントの構造に良く似ていた（図4.3D）。また、コフィリンの逆行性輸送も観察された。このコフィリンの逆行性輸送の速度は、Venus-actinを遺伝子導入した細胞で見られた値よりも大きかった（図4.3E）。おそらく外来的に発現されたコフィリンの活性によりアクチンフィラメントの脱重合が促進され、アクチンフィラメントのサイクルが活性化されたか、コフィリンによって切断されたアクチンフィラメントの小断片が輸送されるのが観察されたためと考えられる。Cof(S3A)-Venusの一部では、細胞の全体でコフィリンがフィラメント状の構造で観察された（図4.3F）。Cerulean-actin（図4.3G）とCof(S3A)-Venus（図4.3H）を共発現させると、Cof(S3A)-Venusのフィラメント構造がアクチンフィラメントとよく共局在していることがわかった（図4.3I）。また、神経突起の先端部ではアクチンとコフィリンの結合が少ないことがわかった（図4.3I）。これらのことにより、脱リン酸化されたコフィリンはアクチンフィラメントに結合しやすく、アクチンフィラメントと共に逆行性に輸送されることが示唆された。

4.3.2 ATP刺激によるコフィリンロッド形成

NGF分化PC12細胞をATP (50 μ M)で刺激すると、細胞全体に棒状構造のコフィリン（先行研究に倣って、以下コフィリンロッドと記述）が観察された（図4.4B, 矢頭）。このコフィリンロッドは神経突起の先端から幹を逆行性に輸送された（図4.4C, 矢頭）。またコフィリンロッド形成は、しばしば一時的な神経突起の退縮を伴った（図4.4）。コフィリンロッドの数はATPによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の5分ほど後に増加し、次第に減少した（図4.4D）。

4.3.3 コフィリンロッドによるアクチン細胞骨格の再編成

上記で述べたとおり、コフィリンはアクチン結合タンパク質であるため、ATPによるコフィリンロッド形成はコフィリンとアクチンの過剰な結合によるものである可能性がある。

この可能性を検証するために、Cofilin-VenusとCerulean-actinの同時イメージングをおこなった。ATPにより刺激した5分後形成されたコフィリンロッドはアクチンフィラメントと共局在していた（図4.5A, 矢頭）。ATP刺激の15分後にはコフィリン付着の割合が小さいアクチン構造が新しく形成された（図4.5A, 矢印）。

4.3.4 FRETによるコフィリン-アクチン相互作用の測定

コフィリンとアクチンの共局在は別のタンパク質との相互作用によっても起こる可能性があるため、次にコフィリンとアクチンの直接的な分子相互作用を、Cofilin-VenusとCerulean-actinを用いたFRETの測定（4.2.5参照）によって見積った。ATPによってコフィリンロッドが形成されると、大きなFRETシグナルが測定された（図4.5B）。コフィリンロッドと他の部位を比較すると、コフィリンロッドで有意なFRETシグナルの上昇が測定された（図4.5C）。Cofilin-VenusとCeruleanを共発現させたPC12細胞ではこのFRETシグナルの上昇は測定されなかった（図4.5D）。これらの結果により、ATPによってコフィリンとアクチンの分子的な相互作用が活性化されたということがわかった。

4.3.5 ATPによるCa²⁺動員

コフィリンロッド形成には、ATPによる[Ca²⁺]_i上昇がシグナルとして関連している可能性がある。そこでATPの受容体であるP2受容体のアゴニストによる[Ca²⁺]_i上昇をカルシウムイメージングによって調べた。ATP刺激は[Ca²⁺]_i上昇を引き起こした（図4.6A）。このATPによる[Ca²⁺]_i上昇は、Ca²⁺-free KRH中では低下した（図4.6B）。この結果より、ATPによる[Ca²⁺]_i上昇は、主に細胞外からのCa²⁺流入によるものであるということが示唆された。いくつかのP2Y受容体のサブタイプに対する選択的作動薬である(Ralevic and Burnstock, 1998)UTPも[Ca²⁺]_i上昇を引き起こした（図4.6C）。しかし、UTPによる[Ca²⁺]_i上昇は、Ca²⁺-free KRH中에서도よく観察された（図4.6D）。また、P2X受容体の選択的作動薬である2-MeSATP（100 μM）を添加しても、[Ca²⁺]_i上昇を引き起こした（図4.6E）。この[Ca²⁺]_i上昇はCa²⁺-free KRHでは、ほとんど見られなかった（図4.6F）。非選択的なプリン作動性受容体の阻害剤であるsuramin（200 μM）は、ATPによる[Ca²⁺]_i上昇を低下させた。この低下した[Ca²⁺]_i上昇は、Ca²⁺-free KRH中では観察されなかったため、P2X受容体由来のものであると考えられる。PC12細胞を、thapsigargin（1 μM）で30分前に処理すると細胞内Ca²⁺ストアを枯渇させることができるが、この状態においてもATPによる[Ca²⁺]_i上昇が観察された。また、ATP刺激によって細胞内pHは変化しなかった。これらの結果を表4.1にまとめた。

4.3.6 Ca²⁺動員とコフィリンロッド形成

次にATPによるコフィリンロッド形成と Ca^{2+} 動員との関係を調べた。 Ca^{2+} -free KRH中では、ATPはコフィリンロッド形成を引き起こさなかった(図4.7, 表4.2)。Thapsigargin (Tg, 1 μM)によって細胞内 Ca^{2+} ストアを枯渇させてもATPによるコフィリンロッドは形成された(図4.7 矢頭, 表4.2)。また細胞内からの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を引き起こすUTPはコフィリンロッド形成を引き起こさなかった(図4.7, 表4.2)。一方で、P2X受容体を介して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を引き起こす2-MeSATPはコフィリンロッドを形成した(図4.7, 表4.2)。Suraminで処理したPC12細胞は、ATPでP2X受容体による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を引き起こす(表4.1)が、この細胞においてもコフィリンロッドは形成された(表4.2)。 Ca^{2+} イオン透過担体であるionomycin (1 μM)は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を引き起こし(表4.1)、コフィリンロッドの形成を引き起こすが、形成したコフィリンロッドの数とコフィリンロッド形成の頻度は低かった(表4.2)。このことにより単なる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、コフィリンロッド形成には効果的ではないことがわかった。また、HCl (1 mM)により細胞内pHを下げてても効果的なコフィリンロッドの形成は確認されなかったことから(表4.2)、細胞内pHはコフィリンロッドの形成には関与しないことが示唆された。

4.3.7 コフィリンロッド形成に関わる Ca^{2+} 関連シグナル

これまでの結果から、ATPによるコフィリンロッドの形成には細胞内 Ca^{2+} シグナルが必須であるということがわかった。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇はいくつかのタンパク質の活性を制御していることが知られており、この中にcalmodulin, calcineurin, CaMKが含まれている(図1.2)。ここではこれらのタンパク質がATPによるコフィリンロッド形成に関与しているかどうかを、薬理学的実験によって明らかにした。すると、calmodulin阻害剤である, trifluoroperazine (100 μM ; 図4.8, 表4.2), calcineurin阻害剤であるcypermethrin (1 μM ; 図4.8, 表4.2)で処理した細胞ではATPによるコフィリンロッド形成は観察されなかったが、CaMK阻害剤である, KN-92 (1 μM)で処理した細胞ではATPによるコフィリンロッド形成が確認された(図4.8, 表4.2)。コフィリンのリン酸化を受けない変異体であるCof(S3A)-Venusを発現させたPC12細胞ではATPによるコフィリンロッド形成は観察されなかった(図4.8, 表4.2)。これらによりcalcineurinを介したコフィリン脱リン酸化過程がコフィリンロッド形成にかかわっていることが示唆された。

4.4 考察

4.4.1 ATP刺激によるコフィリン-アクチンロッド形成

コフィリンとアクチンの動的な相互作用を調べるために、human cofilin-1とVenusの融合タンパク質を作製した。全反射顕微鏡を使った実験により、細胞の辺縁でフィラメント状の

コフィリンの構造が観察された (図4.3C). Venus-actinが遺伝子導入されたPC12細胞で同様のフィラメント状の構造が観察されたことから (図4.3D), これらのコフィリンの構造はコフィリンとアクチンの共局在と考えられる. Cof(S3A)-Venusを発現している細胞のうちいくつかの細胞で, フィラメント状のコフィリンの構造が観察された (図4.3F). Cof(S3A)-Venusのフィラメント構造は, Cerulean-actinを共発現させたPC12細胞では, よく共局在していることから (図4.3G-I), 脱リン酸化されたコフィリンはアクチンフィラメントに結合しやすいということが示された. この結果は先行研究とも一致する(Agnew et al., 1995).

本研究では, ATP刺激を受けた細胞の細胞質, 特に神経突起において一過的なコフィリンロッドの形成が確認された (図4.4). コフィリンロッドは, 熱ショック(Ono et al., 1996)やDMSO(Bernstein et al., 2000; Ono et al., 1993)などのストレスによって, 細胞核にコフィリン-アクチンロッドを形成することが知られている. またATPの枯渇や, グルタミン酸刺激などの神経変性を引き起こす刺激によりコフィリン-アクチンロッドが神経突起で形成されることが知られている(Minamide et al., 2000). ATPによって一過的に形成されたコフィリンロッドは, 神経突起の幹に沿って逆行性に輸送された (図4.4C). コフィリンロッド形成はしばしば神経突起の退縮を伴った (図4.4). ATPは長期的には神経突起伸展を促進させることから (図4.9), この神経突起の退縮は短期的, 一過的なものと考えられる. そして, コフィリンロッドがなくなった神経突起の先端に, 新しく編成されたアクチンの構造が観察された (図4.5A). この新しく編成されたアクチン構造はコフィリンとはあまり結合していなかった (図4.5A).

先行研究では, 固定した細胞においてFluorescein標識のアクチンとCy5標識のコフィリンによるFRET測定によって, コフィリン-アクチンの複合体が解析された(Chhabra and dos Remedios, 2005). 本研究では, 生細胞におけるコフィリンとアクチンの相互作用をFRET測定によって解析し, ATPによるコフィリンロッド形成におけるコフィリンの活性化と動的なコフィリン-アクチン相互作用を観察することに成功した (図4.5B).

4.4.2 ATPによるCa²⁺動員で誘導されるコフィリンロッド形成

ATP刺激はPC12細胞の[Ca²⁺]_i上昇を引き起こす (図4.6A). そして, Ca²⁺-free KRH中ではコフィリンロッドは観察されなかった (図4.7A). これらの結果は, 細胞外からのCa²⁺流入がコフィリンロッドの形成には必要であることを示している. 細胞内pHも, コフィリンのリン酸化を制御して, コフィリンの局在を変えることが知られているが(Bernstein et al., 2000), ATP刺激は細胞内pHを変化させないことと, HCl (1 mM)による細胞内pHの変化によっても明らかなコフィリンロッドの形成は起こらなかったことから (表4.2), ATPによるコフィリンロッド形成に, 細胞内pHは関与していないと考えられる.

4.4.3 コフィリンロッド形成へのP2X受容体の関与

UTP は、P2Y 受容体の選択的作動薬である(Ralevic and Burnstock, 1998). 本研究では、ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と同等の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を UTP 刺激によって観察した (図 4.6C). この UTP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、 Ca^{2+} -free KRH 中でも観察された (図 4.6D). そして、この UTP 刺激によってはコフィリンロッドの形成は起こらなかった (図 4.7). これらのことから、P2Y 受容体の活性化による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、コフィリンロッド形成に関与しないと考えられる. 一方で、P2X 受容体の選択的作動薬である(Ralevic and Burnstock, 1998), 2-MeSATP は、PC12 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こし (図 4.6E), コフィリンロッドを形成した (図 4.7). Suramin は、一般的な P2 受容体の阻害剤であるが、普遍的な P2 受容体の阻害剤ではない(Ralevic and Burnstock, 1998). 実際、本研究で NGF 分化 PC12 細胞を suramin で処理した後も ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察された. これは Ca^{2+} -free KRH 中では見られなかったことから(表 4.1), suramin は P2Y 受容体を抑制するが、P2X 受容体は抑制しないと考えられる. そして suramin で処理された細胞においても、ATP によるコフィリンロッドが形成された (表 4.2). また、thapsigargin で処理した PC12 細胞において ATP によるコフィリンロッド形成が見られることから (図 4.7), P2Y 受容体や Ca^{2+} 依存性 Ca^{2+} 放出 (CICR) は、ATP によるコフィリンロッド形成には関与していないと考えられた. PC12 細胞を ionomycin で処理しても ATP の場合のように明らかなコフィリンロッドを形成しないことから、一般的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇ではコフィリンロッドの形成に効果的ではないことがわかった (表 4.2). これらの結果から、ATP によるコフィリンロッドの形成には P2X 受容体を介した Ca^{2+} 流入が必要であることがわかった.

4.4.4 Calcineurinの活性化とコフィリンロッド形成

$[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、急速なコフィリンの脱リン酸化を引き起こし、これにcalcineurinが関わっていることが知られている(Meberg et al., 1998). また、本研究の結果から、calcineurinの阻害剤を処理した細胞(図4.8B, 表4.2)や、コフィリンのリン酸化部位の欠損した変異体である、Cof(S3A)-Venusを発現した細胞 (図4.8D, 表4.2) では、ATPによるコフィリンロッド形成は見られなかった. 最近、ATPなどの刺激による、 Ca^{2+} 依存性のcalcineurinを介したコフィリンの脱リン酸化にSSHが関与していることがわかった(Wang et al., 2005). またSSHは、この直接的なコフィリンフォスファターゼとしての働きのほかに、LIMKを脱リン酸化することによって不活性化させ、間接的にコフィリンを制御することも明らかになっている(Soosairajah et al., 2005). ゆえにこれらの制御メカニズムがATPによるコフィリンロッド形成にも働いていると考えられる. また、本研究ではコフィリンロッドの形成がATPによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のおよそ5分後から観察されている (図4.4D) が、これはATPによるコフィリンの脱リン酸化にみられる時間遅れと良く対応している(Wang et al., 2005). しかし、ATP刺激の15分

後に、細胞体における大部分のコフィリンロッドは消失している（図4.4）のに対して、その時間帯においてもコフィリンは脱リン酸化したままであった（図4.12）。このことは他の細胞種における先行研究にも一致している(Wang, Shibasaki et al. 2005)。また、ionomycinによるコフィリンロッド形成はATPによるものよりも明らかではなかった（表4.2）。これらのことより、ATPによるコフィリンロッド形成には、脱リン酸化とは別の、または付加的な制御が関わっている可能性がある。

P2X受容体は、タンパク質複合体を形成していてアクチン細胞骨格とのコミュニケーションを促進している可能性がある(Erb et al., 2006)。また、P2X受容体のC末端はRhoやその他の低分子量Gタンパク質を制御している可能性がある(Erb et al., 2006)。ATP刺激によるP2X受容体の活性化によって起こる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、PKC α を細胞膜上に移動させる(Marin-Vicente et al., 2005)。興味深いことに、このPKC α の移動は、本研究で見たコフィリンロッド形成と同様、UTP刺激によっては起こらない(Marin-Vicente et al., 2005)。ATPによるP2X受容体を介した Ca^{2+} 流入はWRK-1細胞においてアクチン細胞骨格の分解を引き起こす(Pubill et al., 2001)、この現象にはコフィリンが関与しているかもしれない。

4.5 第4章のまとめ

第4章ではコフィリンの動態とATPによるコフィリンロッド形成をCofilin-Venusを用いて観察した。また、Cofilin-VenusとCerulean-actinの同時イメージングとFRET測定により、コフィリンロッドの形成時においてコフィリンとアクチンの結合が促進されることを明らかにした。ATPによるコフィリン形成はP2X受容体を介した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に依存しており、 Ca^{2+} シグナルの下流のタンパク質であるcalmodulinとcalcineurinが関与していることがわかった。

ATPは、神経伝達物質として神経発生や神経損傷に関わることが知られている。これら現象には、本章で見られたようなATP刺激によるコフィリンロッド形成を介したアクチン細胞骨格の再編成が関与している可能性がある。

表4.1 様々な薬理刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇

薬理刺激	$[Ca^{2+}]_i$ 上昇 (nM)
ATP (50 μ M; Controls)	249.8 \pm 97.4
Ca ²⁺ -free, ATP (50 μ M)	115.9 \pm 77.8*
Suramin (200 μ M), ATP (50 μ M)	129.7 \pm 97.9*
Ca ²⁺ -free, Suramin (200 μ M), ATP (50 μ M)	14.1 \pm 6.0*
Thapsigargin (1 μ M), ATP (50 μ M)	387.3 \pm 88.5*
UTP (50 μ M)	310.0 \pm 114.9*
Ca ²⁺ -free, UTP (50 μ M)	191.9 \pm 57.4*
Ionomycin (1 μ M)	363.6 \pm 109.7*

データは、平均 \pm 標準偏差 (n =45-110) で表されている。コントロールと比較したときのP値<0.05のときを*で示している。

表4.2 各種薬理処理によってコフィリンロッドを形成した細胞の比率

薬理刺激	コフィリンロッドの形成率 (%)
ATP (50 μ M; Controls)	96.3 \pm 6.7 (n = 55)
Ca ²⁺ -free, ATP (50 μ M)	0.0 \pm 0.0 (n = 28)
Suramin (200 μ M), ATP (50 μ M)	80.0 \pm 24.7 (n = 11)
Thapsigargin (1 μ M), ATP (50 μ M)	100.0 \pm 0.0 (n = 6)
UTP (50 μ M)	0.0 \pm 0.0 (n = 22)
Ionomycin (1 μ M)	33.3 \pm 38.8 (n = 25)
HCl (1 mM)	17.3 \pm 28.9 (n = 26)
Cypermethrin (1 μ M), ATP (50 μ M)	12.5 \pm 21.7 (n = 30)
Trifluoperazine (100 μ M), ATP (50 μ M)	18.6 \pm 11.7 (n = 28)
KN-93 (1 μ M), ATP (50 μ M)	87.5 \pm 25.0 (n = 13)
Cof(3A)-Venus, ATP (50 μ M)	0.0 \pm 0.0 (n = 17)

データは、独立な3回以上の実験結果より得た。

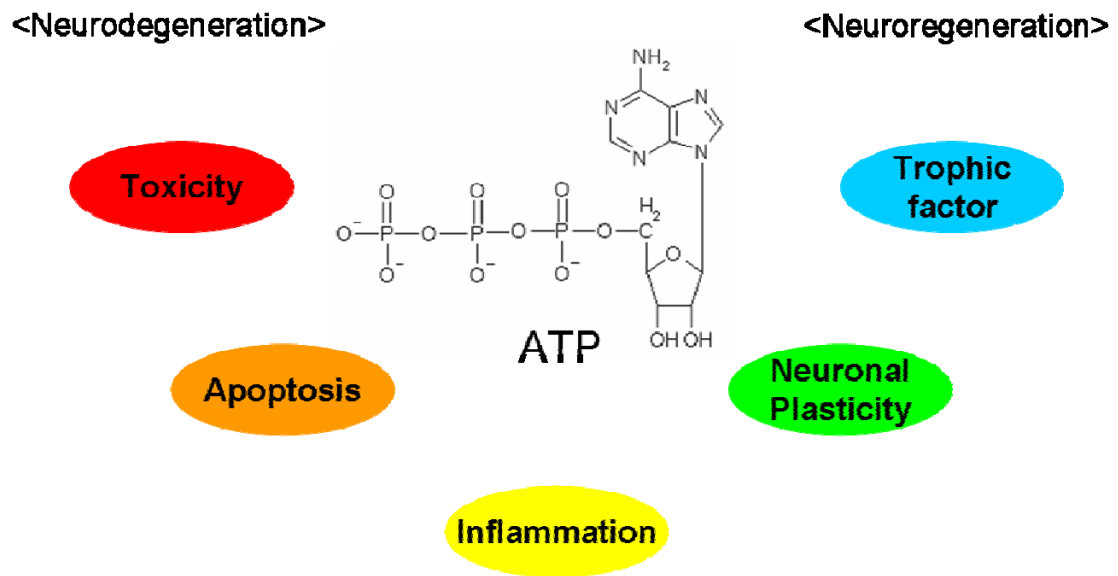


図4.1 ATPの作用

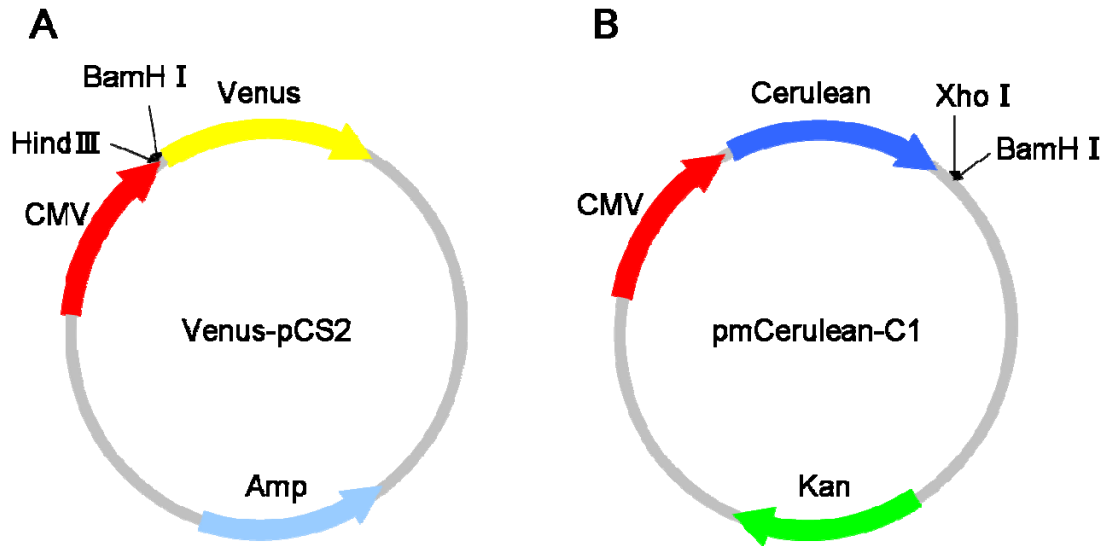


図4.2 GFP変異体プラスミド

CMVはCMVプロモーター領域，AmpはAmpicillin耐性領域，KanはKanamycin耐性領域を表している。

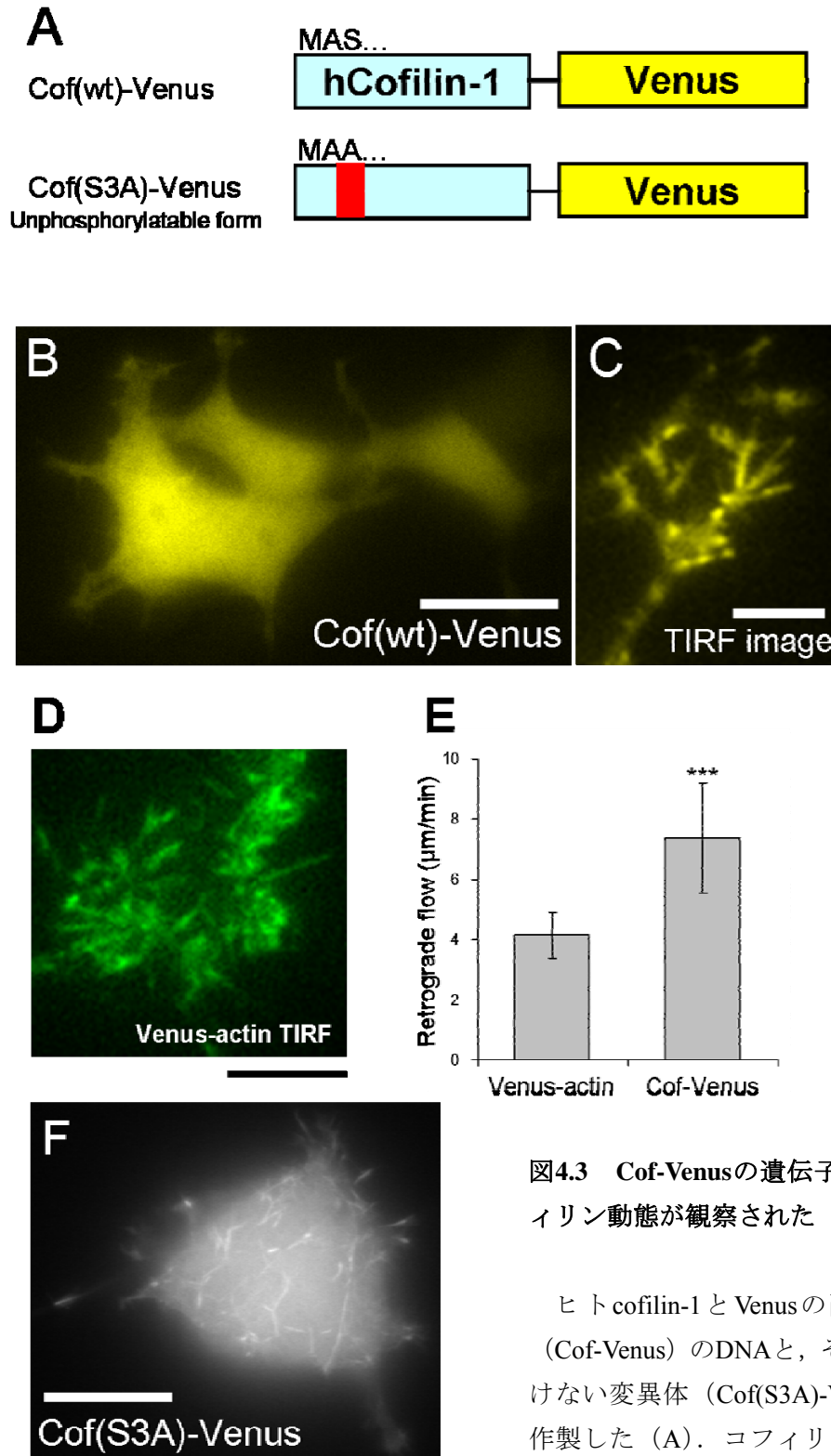
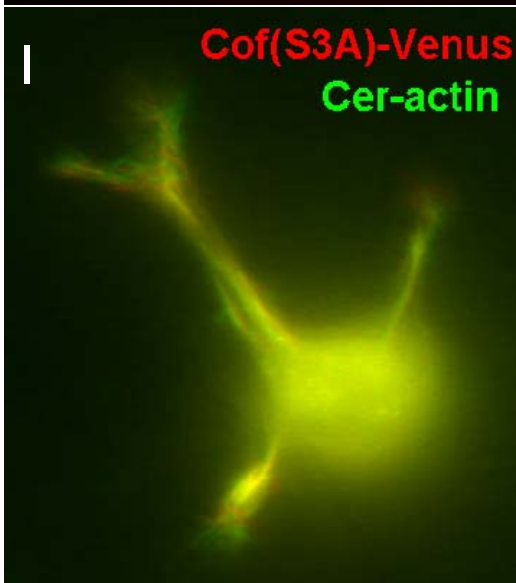
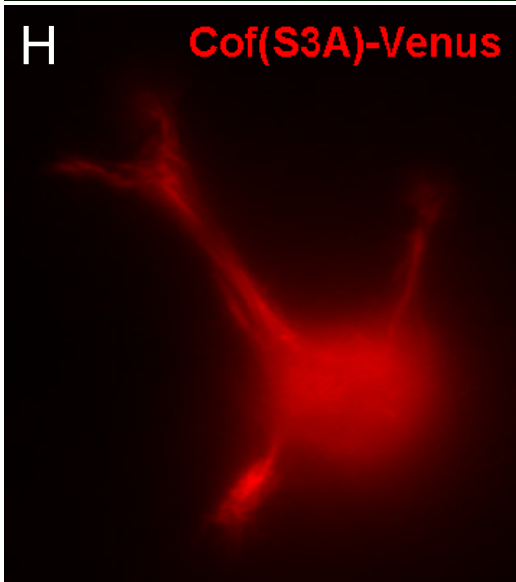
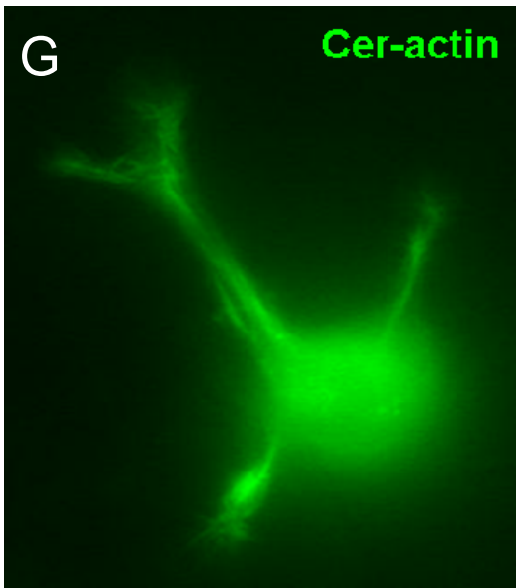


図4.3 Cof-Venusの遺伝子導入によりコフィリン動態が観察された

ヒト cofilin-1 と Venus の融合タンパク質 (Cof-Venus) の DNA と、そのリン酸化を受けない変異体 (Cof(S3A)-Venus) の DNA を作製した (A)。コフィリンの活性は Ser(3) のリン酸化によって抑制され、Cofilin-Venus は細胞全体に分布していた (B)。スケールバーは、30 μm 。



全反射蛍光顕微鏡（TIRF顕微鏡）を用いて細胞底面に観察されるリーディングエッジのコフィリン動態を観察することができた（C）。このときコフィリンの逆行性輸送が観察された。スケールバーは、5 μm 。コフィリンのフィラメント構造は、Venus-actinを発現したPC12細胞において観察されるアクチンフィラメントの構造によく似ている（D）。スケールバーは、10 μm 。Cofilin-Venusで観察された逆行性輸送の速度（Retrograde flow）は、Venus-actinで観察された逆行性輸送速度より大きかった（E）。Cof(S3A)-Venusを発現している細胞のうちいくつかは、細胞全体にフィラメント状のコフィリン構造を示した（F）。スケールバーは、20 μm 。Cerlean-actin（G）とCof(S3A)-Venus（H）をPC12細胞に共発現させたところ、Cof(S3A)-Venusのフィラメント構造はアクチンフィラメントと共局在していることがわかった（I）。神経突起の先端ではアクチンフィラメントへのコフィリンの結合が少ない部分が見られる。スケールバーは、30 μm 。

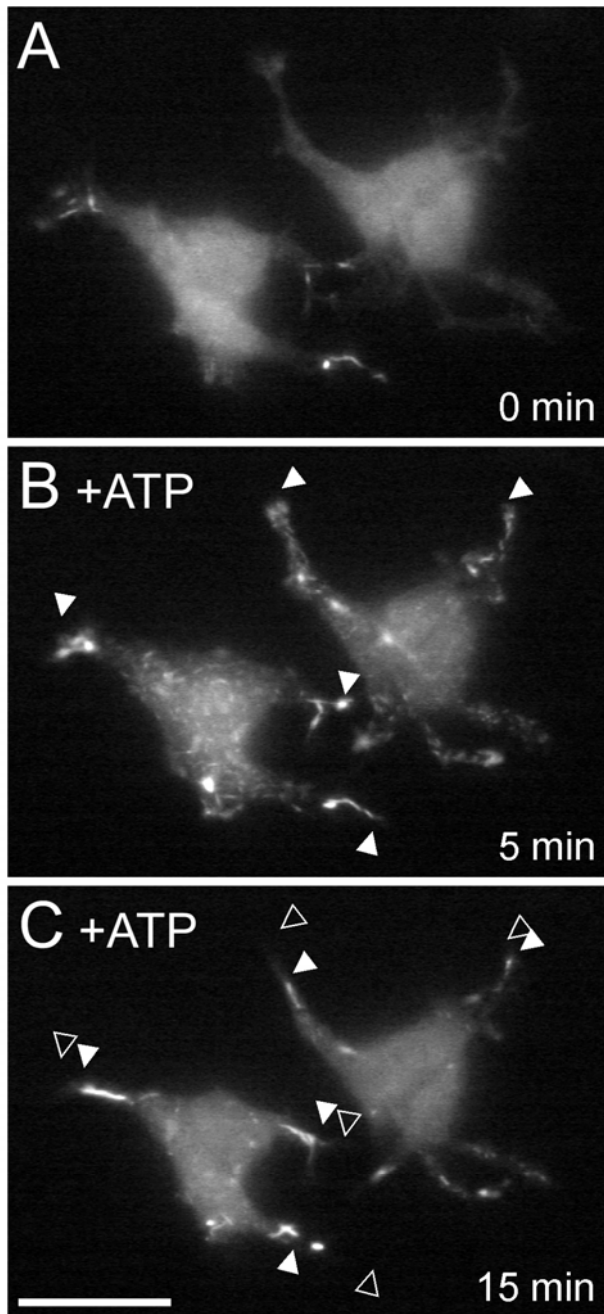
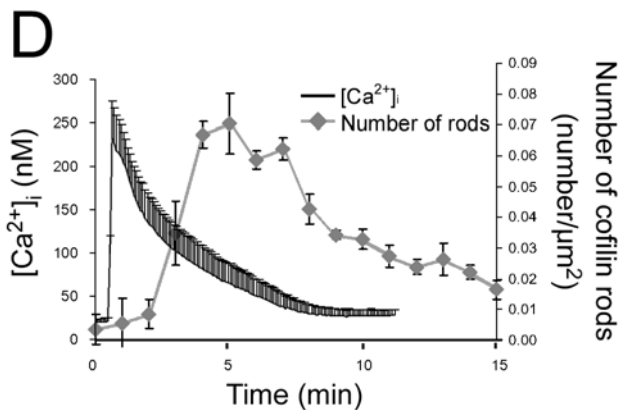


図4.4 ATP刺激はコフィリンロッド形成を引き起こす

Cofilin-Venusは、NGF分化PC12細胞の細胞全体に分布していた (A). ATP (50 μ M)刺激によって特に神経突起の部分においてコフィリンロッドが形成された (矢頭, B). 細胞体におけるコフィリンロッドは、ATP刺激後15分程度のうちに分散した (C). 一方で神経突起のコフィリンロッドは、ATP刺激15分でも見られ、逆行性に輸送されているのが観察された. (内抜きの矢頭は (B) における矢頭の位置を示している.) コフィリンロッドの形成はしばしば神経突起の退縮を伴った. スケールバーは、30 μ m. コフィリンロッドの数はATP刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇 (n=50) 後、約5分で増加して、徐々に減少した (D).



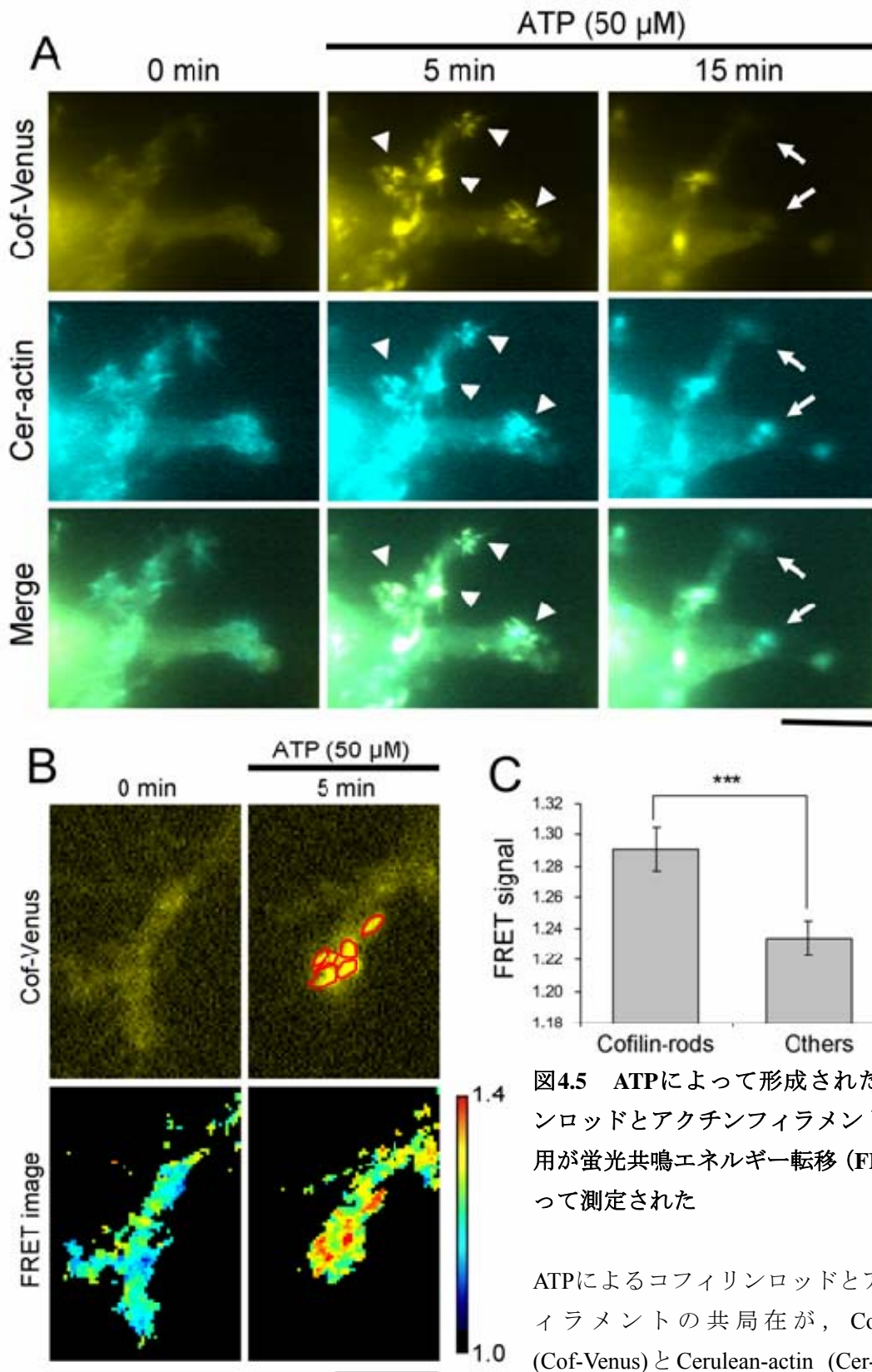
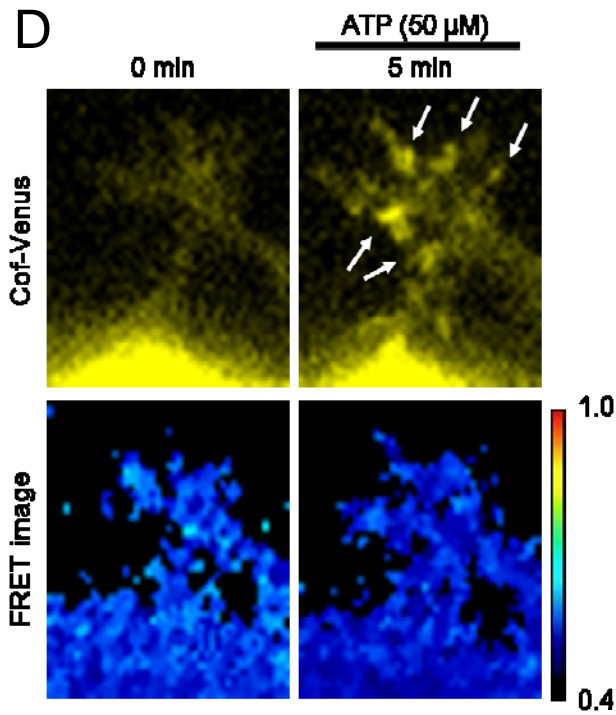


図4.5 ATPによって形成されたコフィリンロッドとアクチンフィラメントの相互作用が蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) によって測定された

ATPによるコフィリンロッドとアクチンフィラメントの共局在が, Cofilin-Venus (Cof-Venus) と Cerulean-actin (Cer-actin) の共発現実験によって観察された (A).



コントロール (0 min) ではアクチンフィラメントとコフィリンの共局在は少ないが, ATP刺激によって形成されたコフィリンロッドはアクチンフィラメントと共局在を示した (矢頭). コフィリンロッドが逆行性に輸送された後には新しく形成されたアクチン細胞骨格が観察された (矢印). スケールバーは, 20 μ m. 赤で領域を囲ったコフィリンロッド形成部分では強いFRETシグナルが測定された (B). FRETシグナルはMATLABとAqua-cosmosイメージングソフトウェアによって計算した. スケールバーは, 5 μ m. コフィリンロッドにおけるFRETシグナル (n = 6) と他の

部位 (n = 5) を比較した (C). データは, 平均 \pm 標準偏差を表している. コントロールと比較したときのP値<0.001のときを***で示している. Cofilin-VenusとCeruleanのFRET測定ではコフィリンロッド形成 (矢印) でのFRETシグナル上昇は見られなかった (D).

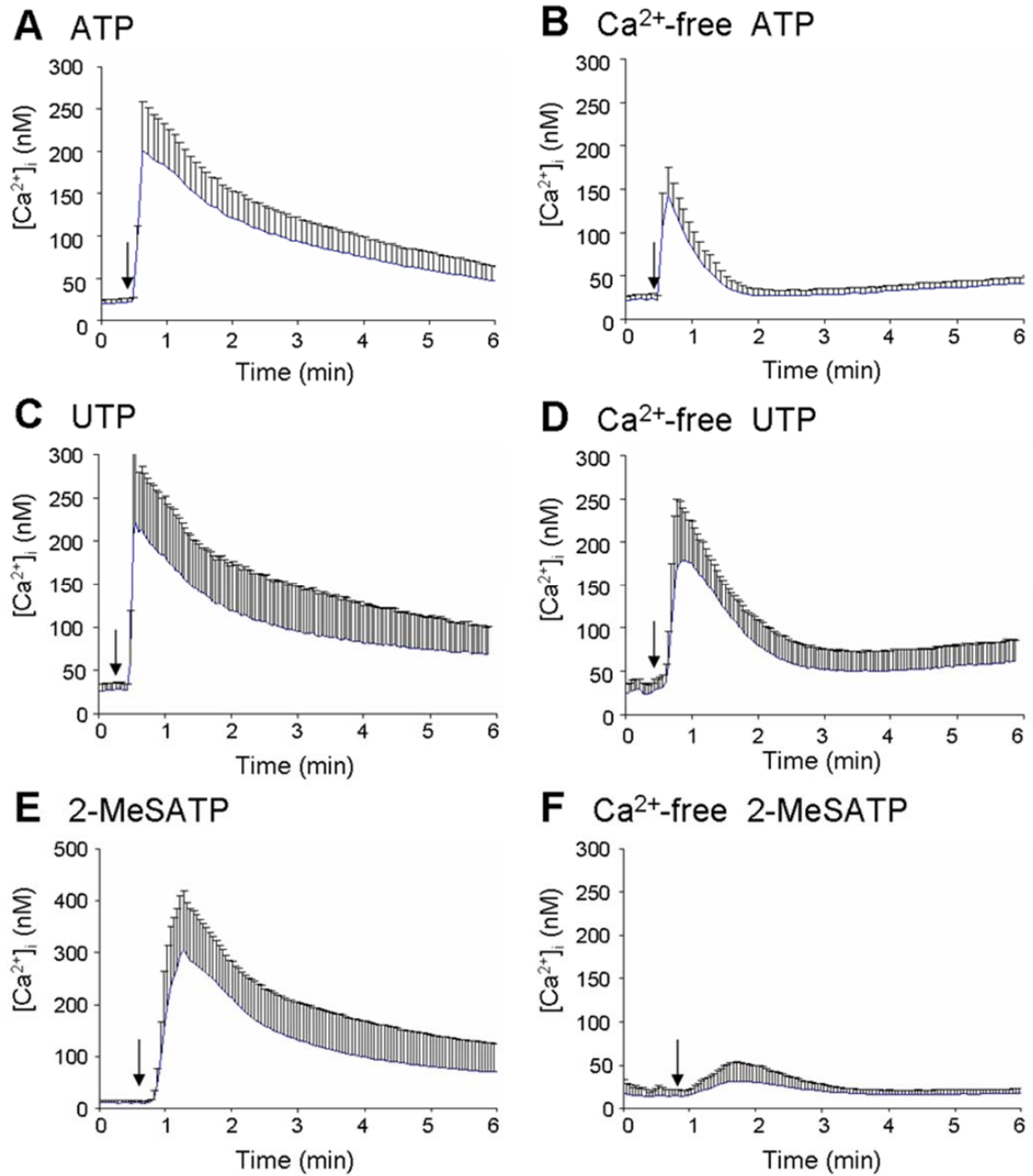


図4.6 ATP, UTP, 2-MeSATPは異なる経路で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こす

ATP (50 μ M) 刺激はPC12細胞で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こした (A, n = 55). Ca^{2+} -free KRH中においてATPによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は減少した (B, n = 46). UTP (50 μ M)刺激はPC12細胞で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こした (C, n = 46). Ca^{2+} -free KRH中においてもUTPによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は, それほど減少せず, 明らかな $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が確認された (D, n = 30). 2-MeSATP (50 μ M) 刺激も $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こしたが (E, n = 40), Ca^{2+} -free KRH中では $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は, ほとんど見られなかった (F, n = 45). 矢印はATP, UTPまたは2-MeSATPを添加した時点を表す. データは, 平均 \pm 標準偏差を表している.

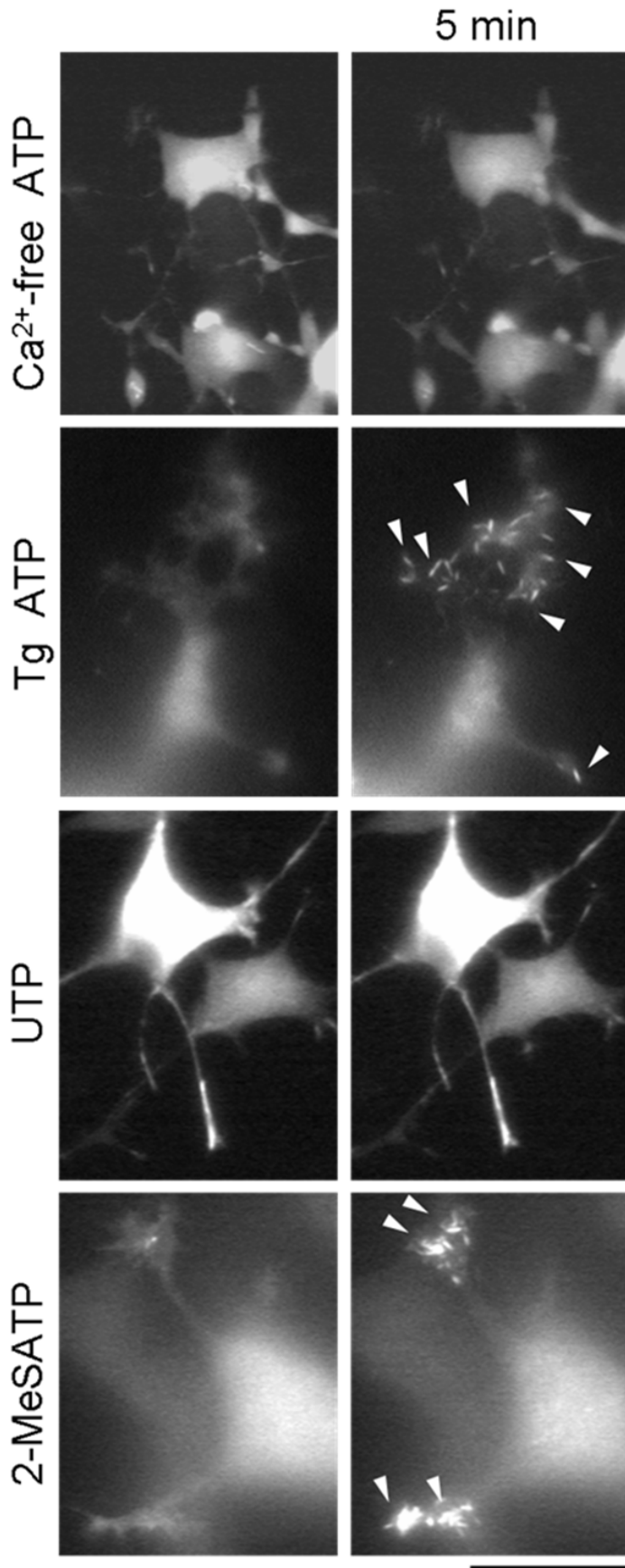


図4.7 ATPによるコフィリンロッド形成はP2X受容体を介したCa²⁺流入による

Ca²⁺-free KRH中において, ATP (50 μ M) によるコフィリンロッド形成は観察されなかった.

Thapsigargin (Tg, 1 μ M)で30分前処理をしても, ATPによるコフィリンロッド形成が見られた.

UTP (50 μ M) 刺激はコフィリンロッドを形成しなかった.

2-MeSATP (50 μ M)は, コフィリンロッド形成させた.

スケールバーは, 30 μ m.

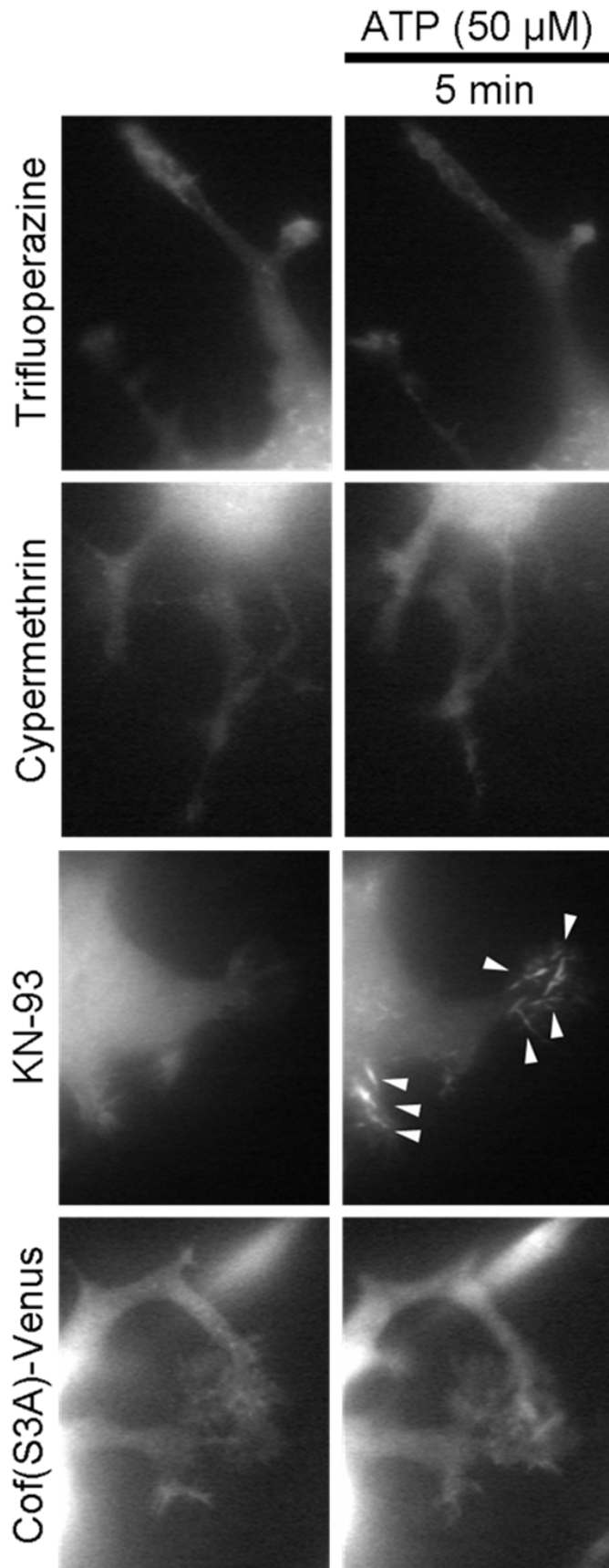


図4.8 ATPによるコフィリンロッド形成には **calmodulin** と **calcineurin**が関与している

Trifluoperazine (100 μ M, calmodulin阻害剤) はATPによるコフィリンロッド形成を阻害した。

Cypermethrin (1 μ M, calcineurin阻害剤)は, ATPによるコフィリンロッド形成を阻害した。

KN-93 (1 μ M, CaMK阻害剤)は, ATPによるコフィリンロッド形成を阻害しなかった。

Cof(S3A)-Venusを発現しているPC12細胞ではATPによるコフィリンロッド形成は観察されなかった。
スケールバーは, 10 μ m.

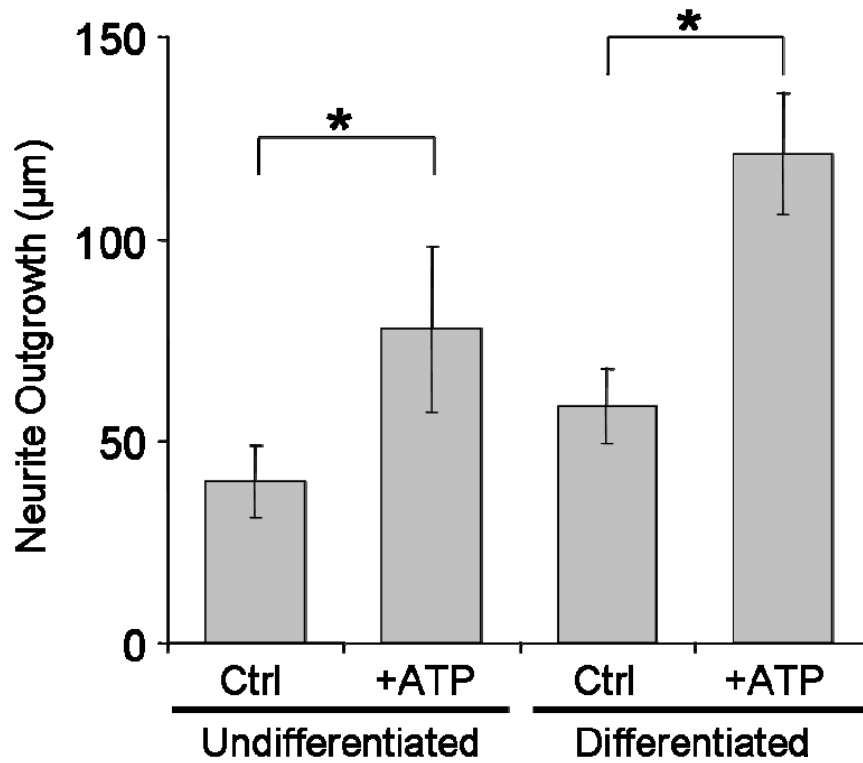


図4.9 ATPはPC12細胞のNGFによる神経様分化を促進する。

未分化のPC12細胞（Undifferentiated）とNGFによって3日間処理した分化細胞（Differentiated）の両方において、ATP（50 μM）によるNGF神経突起伸展促進効果が見られた。未分化または分化したPC12細胞を、ATP刺激後または無刺激で3日間NGFにより分化誘導した後、ブアン固定し、1細胞あたりの神経突起の長さを測定した（3.2.2参照）。コントロールと比較したときのP値<0.05のときを*で示している。データは、平均±標準偏差を表している。

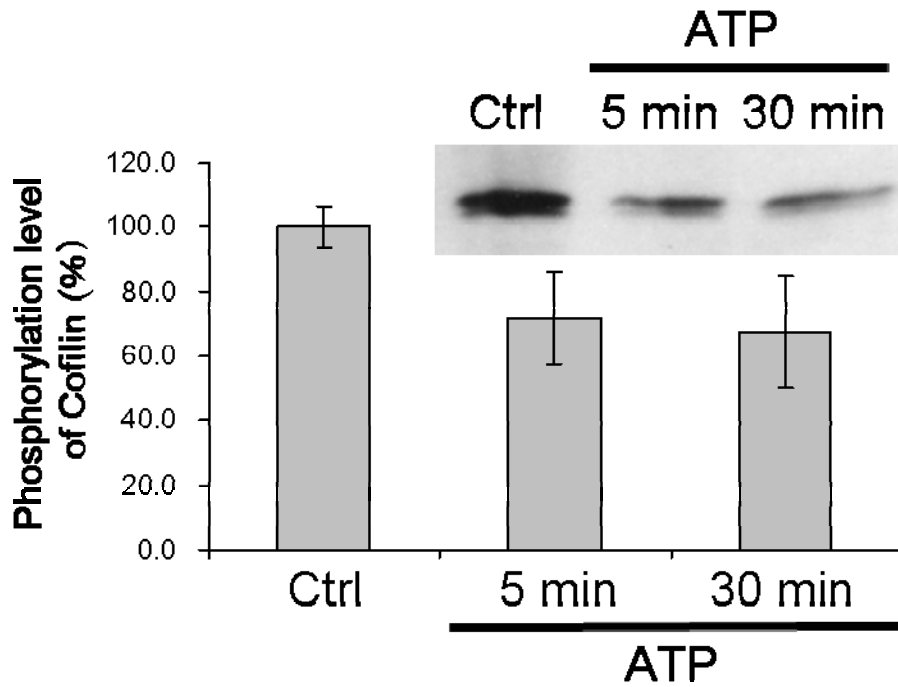


図4.10 ATPはPC12細胞においてコフィリンを脱リン酸化させる。

PC12細胞をATP (50 μ M) で5分または30分で処理後、細胞を回収し、タンパク質を溶解させ、抗リン酸化コフィリン抗体を用いて、ウェスタンブロッティングをおこなった。これにより、PC12細胞をATPで処理すると5分程で細胞内のコフィリンが脱リン酸化し、このコフィリンの脱リン酸化は、少なくとも30分間持続することがわかった。データは、平均±標準偏差を表している。5分後、30分後の濃度値とコントロール (Ctrl) の値とで比較したときのP値は<0.05であった。

第5章 結言

5.1 結果のまとめ

本研究では神経突起伸展のモデルとしてPC12細胞を用い、同様の細胞内Ca²⁺動員を引き起こす神経伝達物質（5-HTとATP）でも、その種類によって、または刺激の期間が長期的か短期的かによって、異なる応答を示すことを明らかにした。このことは、従来からよく言われるような、細胞内に動員されるCa²⁺濃度の絶対値が細胞の応答を決めているということではなく、（少なくともこの実験系では）Ca²⁺が動員される経路や、刺激を受けたときの細胞の内部状態が、刺激に対する細胞の応答を大きく左右することを示している。

第2章で紹介したように、蛍光イメージング技術は、より汎用性・簡便性が高まり、また日々新たな技術が開発されている。本研究で用いた、細胞内イオン濃度測定によって、異なる実験系における細胞内Ca²⁺濃度上昇の絶対値を測定できた。また、遺伝子工学技術を用いた標的タンパク質をGFP関連タンパク質での標識と、全反射蛍光顕微鏡（TIRF顕微鏡）を用いることで、落射蛍光顕微鏡では観察しにくかった細胞底面での微細構造を観察することができた。また蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）測定技術を用いることによって、タンパク質-タンパク質の相互作用を可視化することができた。

第3章では細胞内Ca²⁺濃度上昇によって神経突起伸展が促進されることを示した。神経突起伸展が起こるときには神経突起の材料となる細胞骨格タンパク質、細胞膜上タンパク質などが作られなければならない。そのため、この細胞内Ca²⁺シグナルによる神経突起伸展は遺伝子発現制御を伴っていると考えられる。本研究の結果により、5-HT依存性細胞内Ca²⁺濃度上昇による遺伝子発現制御としてcalcineurinが想定される。PC12細胞における遺伝子発現制御タンパク質をcalcineurinが制御しているかは明らかではないが、NFATのようにcalcineurinによって脱リン酸化されて核移行する転写因子などが関係しているかもしれない。また、5-HTによる細胞内Ca²⁺濃度上昇は一過的であるが、これは神経突起伸展促進に必要十分であるため、一度calcineurinによる活性化が起こることで、細胞の内部状態が大きく変化する様な機構があると考えられる。

第4章ではATPによる細胞内Ca²⁺濃度上昇によってアクチン細胞骨格の再編成が起こるこ

とを示した。ATPを細胞外に添加すると、長期的にはPC12細胞の神経突起伸展を促進させることが知られている。しかし短期的に見ると、本研究の結果から、ATPを添加した直後にコフィリン-アクチンロッドが形成され、一過的な神経突起退縮が起こることがわかった。このコフィリン-アクチンロッドの形成は、P2X受容体を介した細胞外からのCa²⁺流入に依存しており、calcineurinが活性化することが必要であることがわかった。calcineurinによる細胞骨格制御として、Slingshot (SSH) の関与が考えられる。SSHはcalcineurinによって脱リン酸化されることによって活性化する。活性化したSSHはコフィリンを脱リン酸化することによってコフィリンのアクチン結合能を活性化させる。

以上、本研究で明らかになった、細胞内Ca²⁺シグナルによる神経突起の動態制御を図5.1にまとめた。

5.2 NGFシグナルと細胞内Ca²⁺による神経突起伸展制御

ここでは細胞内Ca²⁺シグナルによる遺伝子発現がどのように神経突起伸展を制御しているかについて、よく調べられているNGFのシグナル伝達と比較して議論する(図5.2)。NGFはTrk (Tropomyosin receptor kinase) 受容体チロシンキナーゼと結合して二量体を形成させる。この複合体はいくつかのタンパク質を介して低分子量Gタンパク質であるRasを活性化させ、このシグナル伝達経路でERKを活性化させる。活性化したERKは核移行し、このシグナル伝達が、転写を制御するAP-1 (activator protein-1) 複合体を活性化させる。一般にはこの経路がNGFによる神経分化のメインシグナルであるということになっているが、実は、細胞分裂を活性化させるEGF (epidermal growth factor) も同じシグナル伝達経路でERKを活性化する。ERKの活性化している持続時間が、神経分化シグナルか細胞分裂シグナルかを左右するという説(Schamel and Dick, 1996)もあるが、その仕組みについては明らかではない。そこで、Ca²⁺シグナルとの関係であるが、calmodulin結合タンパク質である、Ras-GRF (Ras-guanine nucleotide-releasing factor) や、CaMKIVがERKを活性化させる(Agell et al., 2002)が、必ずしもCa²⁺シグナルのみでは神経突起伸展に効果的ではないことが知られている。EGFとCa²⁺シグナルを同時に加えるとNGFと同等の神経突起伸展が見られるという研究(Mark et al., 1995)があるが、この効果がERKの活性化の加算によって生じるものなのかは明らかではない。本研究により、ERKのシグナルとはおそらく別の経路で、calcineurin依存性シグナルの活性化によるNGF神経突起伸展促進効果があることがわかった。最近、PC12細胞においてcalcineurin/NFATシグナルを介した遺伝子発現があることがわかっている(Canellada et al., 2006)。また、幼若な神経細胞においてcalcineurinの活性化によってIP₃受容体、Ca²⁺ポンプが発現されてくることも明らかになっている(Carafoli et al., 1999)。このような転写因子の活性変化によって、Ca²⁺シグナルによる神経突起促進が起こっているものと考えられる。

5.3 Rhoファミリーシグナルと細胞内Ca²⁺による細胞骨格制御

次に、細胞内 Ca²⁺シグナルによる細胞骨格制御について、低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーによるアクチン細胞骨格制御との関係と比較しながら議論する (図 5.3). Rho ファミリーによるアクチン細胞骨格制御は、線維芽細胞などの遊走をモデルによく調べられている。Rho ファミリーは GTP と結合することによって活性化する。またこれらは GTPase 活性を持っており、GTP が GDP になると不活性になる。ここで GDP を GTP と変換する働きをするのが GEF (guanine nucleotide exchange factor) であり、逆に GTPase 活性を促進する GAP (GTPase activating protein) がある。また GDP 結合型タンパク質の GDP 解離を阻害して不活性化状態を維持する働きをする GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) がある。

各種シグナルが GEF を活性化することによって、Rho ファミリーは活性化され、その標的タンパク質を活性化させる。標的タンパク質が他の Rho ファミリーの GEF, GAP, GDI である場合もあり、他の Rho ファミリーを活性化または不活性化することもある。

Cdc42 は、N-WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein), Drf3 (Diaphanous-related formin) を介して profilin, Arp2/3 (actin-related protein 2/3) を活性化する。また PAK を介して LIMK を活性化させ ADF/cofilin をリン酸化して不活性化させる。

Rac1 は、PAK を活性化させるほか、IRSp53 (insulin receptor substrate) を介して WAVE2 (WASP family Verprolin-homologous protein) を活性化する。また、PI4P5K (phosphatidylinositol 4-phosphate 5 kinase) を活性化させ PIP₂ (phosphatidylinositol 4, 5-bis phosphate) を産生させる。PIP₂ は gelsolin や ADF/cofilin に結合してこれらのタンパク質を阻害する。また PIP₂ は vinculin や α -actinin に結合してアクチンフィラメントの架橋を促進する。

RhoA は、mDia (mammalian diaphanous) と ROCK を活性化する。mDia は profilin を活性化する。ROCK は NHE1/ERM や、PI4P5K によって産生された PIP₂ を介して、アクチンの連結に関わっていると考えられる。また ROCK は LIMK を活性化して ADF/cofilin の機能を阻害する。これによりアクチンフィラメントが固定化される。ROCK は MLC (myosin light chain) をリン酸化し、同時に MLC ホスファターゼを阻害して MLC のリン酸化状態を維持する。これによりアクチン-ミオシン相互作用が起こる。

この制御系でのアクチン結合タンパク質に対する Ca²⁺シグナルの直接的な制御はあまり知られていない。Gelsolin は、Ca²⁺存在下でアクチンフィラメントを切断し、キャップ構造を形成する。Ca²⁺シグナルは MLCK を活性化し、アクチン-ミオシン相互作用を促進する。本研究で観察されたコフィリン-アクチンロッド形成は、calcineurin によって SSH の脱リン酸化が起こり、コフィリンが活性化されたことによると考えられる。これらの少ない直接的な制御とは別に Ca²⁺シグナルは GEF, GAPなどを介して Rho ファミリーを制御することによって間接的に細胞骨格系を制御している可能性がある。

5.4 FRETによる細胞内シグナル測定

FRETの技術によって、(1) タンパク質間の相互作用の計測や、(2) タンパク質一分子を二つの蛍光団でラベルして構造変化を測定することでバイオセンサーとして用いることができる。

(1) タンパク質相互作用測定

NF- κ B と DNA の結合 (Schmid et al., 2000)や、Nitric Oxide Synthase (NOS)と Calmodulin の結合 (Jobin et al., 2003)など、多くの分子間相互作用測定に FRET が用いられている。特に細胞骨格系においては、微小管を構成する β -tubulin と PKC α (Dykes et al., 2003), stathmin (Niethammer et al., 2004), アクチンフィラメントを構成する actin と neuro-protein 25 (NP25) (Mori et al., 2004), Prostate apoptosis response-4a (Par-4) (Vetterkind et al., 2005), Cysteine-rich protein 1 (CRP1) (Tran et al., 2005), Src (Avizienyte et al., 2007), raft-associated protein (Chichili and Rodgers, 2007), または actin 同士 (Kozuka et al., 2006; Okamoto et al., 2004), 細胞骨格関連タンパク質として mDia と Cdc42 (Peng et al., 2003), N-WASP と Cdc42 (Udo et al., 2005), Drebrin と Connexin43 (Butkevich et al., 2004)などの分子間相互作用が FRET によって測定されている。

(2) 一分子内 FRET によるバイオセンシング

もう1つの FRET を利用した重要な技術は、バイオセンシングである。タンパク質のサブドメインを蛍光団でラベルすることによって、protein tyrosine kinase (Sato et al., 2002), protein kinase A (Zhang et al., 2001), protein kinase B/Akt (Sasaki et al., 2003), phospholipase C (van der Wal et al., 2001), protein kinase C (Violin et al., 2003), Src (Wang et al., 2005), Ras (Mochizuki et al., 2001), Rho (Pertz and Hahn, 2004), G-protein-coupled receptor (Hoffmann et al., 2005; Nobles et al., 2005; Vilardaga et al., 2003)などの活性を測定することができる。さらにこれらの特性を生かしてセカンドメッセンジャーの FRET センサーが開発・改良されており、Ca²⁺ (Miyawaki et al., 1997; Nagai et al., 2004), phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) (Sato et al., 2003), cAMP (Ponsioen et al., 2004; Zaccolo et al., 2000; Zaccolo and Pozzan, 2002), cGMP (Honda et al., 2001; Nikolaev et al., 2006; Sato et al., 2000)などを測定することができる。

本研究における Cofilin-actin 相互作用の測定は(1)に類し、細胞内 Ca²⁺濃度上昇にともなう Calcineurin の活性化によって Cofilin-actin 結合が動的に制御されている様子を可視化することに成功した。

5.5 本研究の意義と今後の展望

Ringerが120年ほど前にCa²⁺の重要性を発見してから、現在に至るまで膨大な量のCa²⁺シグ

ナル関連タンパク質が明らかになってきている。にもかかわらず、本研究で扱ったような細胞内Ca²⁺に関連するいくつかのシンプルな問題がいまだに完全には解明されていない。例えば、同じような細胞内Ca²⁺濃度上昇を引き起こす物質にもかかわらず神経突起が伸展するときもあれば退縮するときもあり、成長円錐のターニングが誘引になるときも反発になるときもある。このようなスイッチングが起こる機構について、いくつかの説は提唱されているが、入力から出力までを明確に説明することはできない。この機構が、新規なタンパク質を見つけなければ説明できないのか、既に判明しているタンパク質相互作用のネットワーク上のシステム論で説明ができるのか、ということは今後の非常に興味深い問題であるが、本研究で見られたような、神経突起伸長に関する相反したシグナルの闘ぎ合いの結果、どちらかが優勢になるような機構が働いているのかもしれない。

本研究では、5-HTによる細胞内Ca²⁺シグナルによってcalmodulin, calcineurinが活性化され、遺伝子発現を伴うシグナル伝達経路によって神経突起伸長が促進されることが明らかになったが、calcineurinがどのようなタンパク質を制御しているのかという新たな疑問が生じた。また、ATPによってコフィリンロッドが形成され、これがP2X受容体によるCa²⁺流入に依存していることも明らかになったが、なぜ他の経路からのCa²⁺流入では効果的にコフィリンロッドが形成されないのかという問題が出てきた。このような問題を一つ一つ答えることによって、さらにより詳細なシグナル伝達経路が明らかになってくる。

近年、本研究で行ったような全反射顕微鏡やFRETなどのバイオイメーjing技術の進歩により、膨大なシグナル伝達経路の情報が集積してきている。今現在、これらの情報を統合し、システムとして理解していく過程にさしかかっており、このような概念はこれからの基礎研究にも重要となってくると考えられる。

5.4 本研究の結言

以上、本論文では蛍光イメーjing技術を利用して、神経伝達物質による細胞内Ca²⁺動員が神経突起を伸展または退縮させるメカニズムに関する研究を報告した。この中で、細胞内Ca²⁺によってcalmodulin, calcineurinが活性化され、遺伝子発現やアクチン細胞骨格を制御する機構が明らかになってきた。本研究の知見により、神経伝達物質による神経の発生制御や神経傷害のメカニズムへの理解がより深まっていくことを期待する。

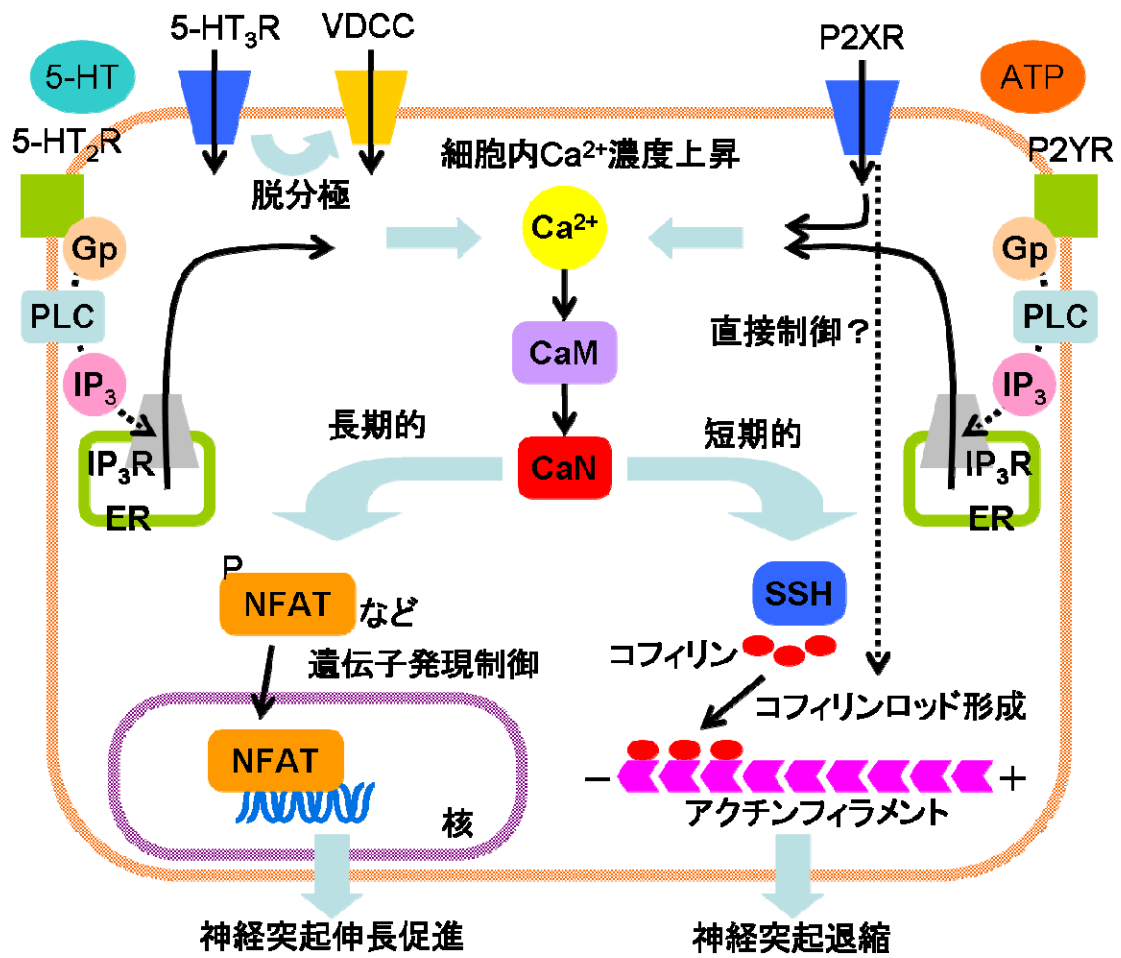
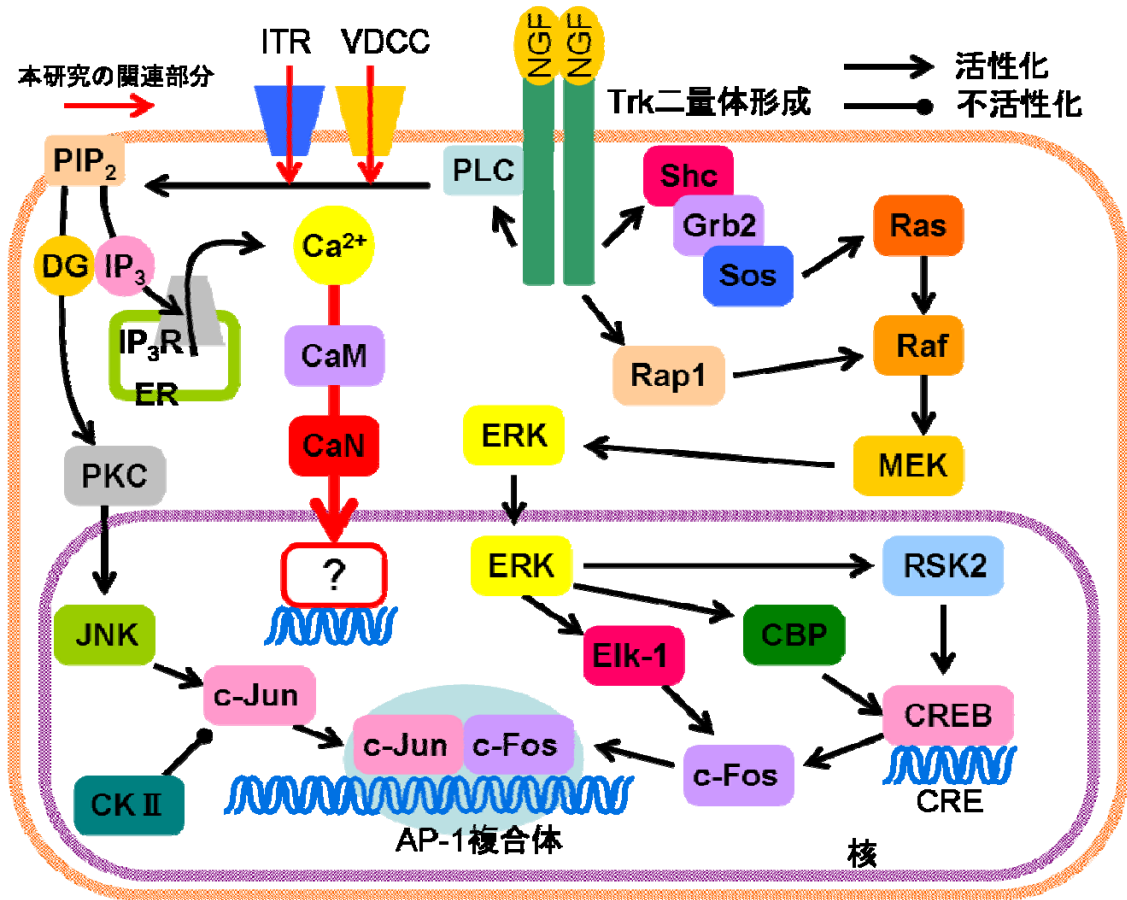


図5.1 細胞内 Ca^{2+} シグナルによる神経突起制御

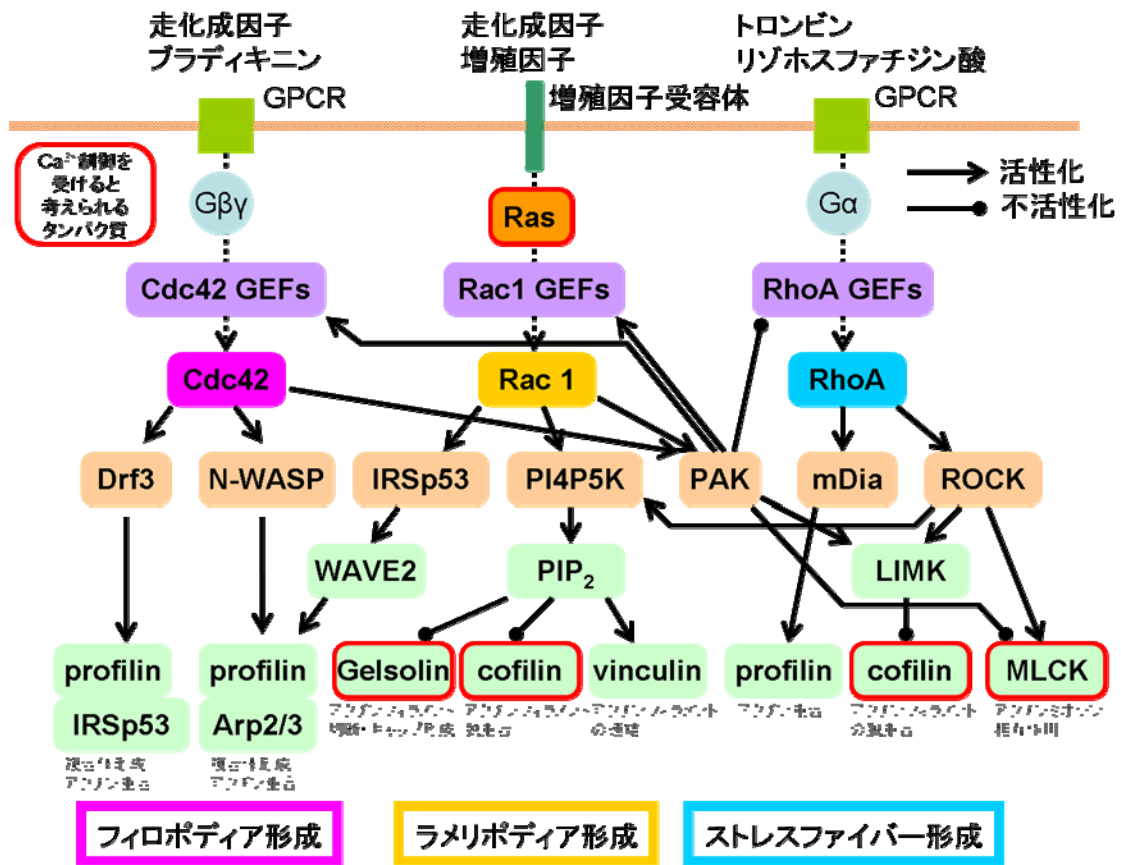
VDCC, voltage-dependent calcium channel; Gp, G-protein; CaM, calmodulin; CaN, calcineurin; PLC, phospholipase-C; IP_3 , inositol-trisphosphate; ER, endoplasmic reticulum; NFAT, nuclear factor of activated T cell; SSH, slingshot



(Kao et al., 2001; Rui et al., 1999; Vaudry et al., 2002)から作成

図5.2 NGFシグナルと細胞内Ca²⁺シグナル

VDCC, voltage-dependent calcium channel; ITR, ionotropic receptor; Trk, tropomyosin receptor kinase; PIP₂, phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate; CaM, calmodulin; CaN, calcineurin; PLC, phospholipase-C; IP₃, inositol-trisphosphate; DG, diacyl glycerol; ER, endoplasmic reticulum; PKC, protein kinase C; MEK, MAPK-kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; CRE, cAMP response element; CREB, CRE-binding protein; CBP, CREB-binding protein; JNK, c-jun N-terminal kinase; CK, casein kinase



細胞骨格・運動がわかる, 三木裕明編 (2004) より作成

図5.3 Rhoファミリーによるアクチン細胞骨格制御と細胞内Ca²⁺シグナル

GPCR, G-protein coupled receptor; GEF, guanine nucleotide exchange factor; Drf, diaphanous-related formin; WASP, Wiskott-Aldrich syndrome protein; IRS, insulin receptor substrate; WAVE, WASP family Verprolin-homologous protein; PI4P5K, phosphatidylinositol 4-phosphate 5 kinase; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bis phosphate; PAK, p21-activated kinase; ROCK, Rho-associated kinase; Arp2/3, actin-related protein 2/3

参考文献

- Agell, N., Bachs, O., Rocamora, N., Villalonga, P., 2002. Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin. *Cell Signal* 14, 649-654.
- Agnew, B.J., Minamide, L.S., Bamburg, J.R., 1995. Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. *J Biol Chem* 270, 17582-17587.
- Alexander, K.A., Wakim, B.T., Doyle, G.S., Walsh, K.A., Storm, D.R., 1988. Identification and characterization of the calmodulin-binding domain of neuromodulin, a neurospecific calmodulin-binding protein. *J Biol Chem* 263, 7544-7549.
- Angeletti, P.U., Levi-Montalcini, R., Calissano, P., 1968. The nerve growth factor (NGF): chemical properties and metabolic effects. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 31, 51-75.
- Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O., Caroni, P., 1998. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805-809.
- Arslan, G., Filipeanu, C.M., Irenius, E., Kull, B., Clementi, E., Allgaier, C., Erlinge, D., Fredholm, B.B., 2000. P2Y receptors contribute to ATP-induced increases in intracellular calcium in differentiated but not undifferentiated PC12 cells. *Neuropharmacology* 39, 482-496.
- Arthur, D.B., Akassoglou, K., Insel, P.A., 2005. P2Y2 receptor activates nerve growth factor/TrkA signaling to enhance neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19138-19143.
- Avizienyte, E., Keppler, M., Sandilands, E., Brunton, V.G., Winder, S.J., Ng, T., Frame, M.C., 2007. An active Src kinase-beta-actin association is linked to actin dynamics at the periphery of colon cancer cells. *Exp Cell Res* 313, 3175-3188.
- Bading, H., Greenberg, M.E., 1991. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science* 253, 912-914.
- Behrsing, H.P., Vulliet, P.R., 1999. Purinergic and calcium-mediated enhancement of NGF-induced neurite expression in PC12 cells. *Proc West Pharmacol Soc* 42, 59-62.
- Behrsing, H.P., Vulliet, P.R., 2004. Mitogen-activated protein kinase mediates purinergic-enhanced nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Neurosci Res* 78, 64-74.
- Bernstein, B.W., Painter, W.B., Chen, H., Minamide, L.S., Abe, H., Bamburg, J.R., 2000. Intracellular pH modulation of ADF/cofilin proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 47, 319-336.

- Bolsover, S.R., 2005. Calcium signalling in growth cone migration. *Cell Calcium* 37, 395-402.
- Bonni, A., Ginty, D.D., Dudek, H., Greenberg, M.E., 1995. Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals. *Mol Cell Neurosci* 6, 168-183.
- Bouron, A., Becker, C., Porzig, H., 1999. Functional expression of voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels during neuronal differentiation of PC12 cells with nerve growth factor or forskolin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359, 370-377.
- Bush, A.B., Borden, L.A., Greene, L.A., Maxfield, F.R., 1991. Nerve growth factor potentiates bradykinin-induced calcium influx and release in PC12 cells. *J Neurochem* 57, 562-574.
- Butkevich, E., Hulsmann, S., Wenzel, D., Shirao, T., Duden, R., Majoul, I., 2004. Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr Biol* 14, 650-658.
- Canellada, A., Cano, E., Sanchez-Ruiloba, L., Zafra, F., Redondo, J.M., 2006. Calcium-dependent expression of TNF-alpha in neural cells is mediated by the calcineurin/NFAT pathway. *Mol Cell Neurosci* 31, 692-701.
- Carafoli, E., Genazzani, A., Guerini, D., 1999. Calcium controls the transcription of its own transporters and channels in developing neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 624-632.
- Carrion, A.M., Link, W.A., Ledo, F., Mellstrom, B., Naranjo, J.R., 1999. DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* 398, 80-84.
- Chhabra, D., dos Remedios, C.G., 2005. Cofilin, actin and their complex observed in vivo using fluorescence resonance energy transfer. *Biophys J* 89, 1902-1908.
- Chichili, G.R., Rodgers, W., 2007. Clustering of membrane raft proteins by the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*.
- D'Ambrosi, N., Murra, B., Cavaliere, F., Amadio, S., Bernardi, G., Burnstock, G., Volonte, C., 2001. Interaction between ATP and nerve growth factor signalling in the survival and neuritic outgrowth from PC12 cells. *Neuroscience* 108, 527-534.
- Dykes, A.C., Fultz, M.E., Norton, M.L., Wright, G.L., 2003. Microtubule-dependent PKC-alpha localization in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C76-87.
- Ebashi, S., Ebashi, F., Kodama, A., 1967. Troponin as the Ca⁺⁺-receptive protein in the contractile system. *J Biochem (Tokyo)* 62, 137-138.
- Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M., Gill, G.N., 1999. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 1, 253-259.
- Erb, L., Liao, Z., Seye, C.I., Weisman, G.A., 2006. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch* 452, 552-562.

- Franke, H., Illes, P., 2006. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol Ther* 109, 297-324.
- Franke, H., Krugel, U., Illes, P., 2006. P2 receptors and neuronal injury. *Pflugers Arch* 452, 622-644.
- Furukawa, K., Akaike, N., Onodera, H., Kogure, K., 1992. Expression of 5-HT₃ receptors in PC12 cells treated with NGF and 8-Br-cAMP. *J Neurophysiol* 67, 812-819.
- Furukawa, K., Onodera, H., Kogure, K., Akaike, N., 1993. Time-dependent expression of Na and Ca channels in PC12 cells by nerve growth factor and cAMP. *Neurosci Res* 16, 143-147.
- Gille, H., Sharrocks, A.D., Shaw, P.E., 1992. Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* 358, 414-417.
- Gohla, A., Birkenfeld, J., Bokoch, G.M., 2005. Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat Cell Biol* 7, 21-29.
- Gordon, J.C., Rowland, H.C., 1990. Nerve growth factor induces 5-HT₃ recognition sites in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Life Sci* 46, 1435-1442.
- Graef, I.A., Wang, F., Charron, F., Chen, L., Neilson, J., Tessier-Lavigne, M., Crabtree, G.R., 2003. Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell* 113, 657-670.
- Graff, J.M., Young, T.N., Johnson, J.D., Blackshear, P.J., 1989. Phosphorylation-regulated calmodulin binding to a prominent cellular substrate for protein kinase C. *J Biol Chem* 264, 21818-21823.
- Greene, L.A., Tischler, A.S., 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2424-2428.
- Grumolato, L., Louiset, E., Alexandre, D., Ait-Ali, D., Turquier, V., Fournier, A., Fasolo, A., Vaudry, H., Anouar, Y., 2003. PACAP and NGF regulate common and distinct traits of the sympathoadrenal lineage: effects on electrical properties, gene markers and transcription factors in differentiating PC12 cells. *Eur J Neurosci* 17, 71-82.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450.
- Guillemette, G., Balla, T., Baukal, A.J., Spat, A., Catt, K.J., 1987. Intracellular receptors for inositol 1,4,5-trisphosphate in angiotensin II target tissues. *J Biol Chem* 262, 1010-1015.
- Gysbers, J.W., Guarnieri, S., Mariggio, M.A., Pietrangelo, T., Fano, G., Rathbone, M.P., 2000. Extracellular guanosine 5' triphosphate enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth via increases in intracellular calcium. *Neuroscience* 96, 817-824.
- Hanna, M.C., Davies, P.A., Hales, T.G., Kirkness, E.F., 2000. Evidence for expression of heteromeric serotonin 5-HT₃ receptors in rodents. *J Neurochem* 75, 240-247.
- Haydon, P.G., McCobb, D.P., Kater, S.B., 1984. Serotonin selectively inhibits growth cone motility

- and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science* 226, 561-564.
- He, Q., Dent, E.W., Meiri, K.F., 1997. Modulation of actin filament behavior by GAP-43 (neuromodulin) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site. *J Neurosci* 17, 3515-3524.
- Hoffmann, C., Gaietta, G., Bunemann, M., Adams, S.R., Oberdorff-Maass, S., Behr, B., Vilardaga, J.P., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H., Lohse, M.J., 2005. A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* 2, 171-176.
- Homma, K., Kitamura, Y., Ogawa, H., Oka, K., 2006. Serotonin induces the increase in intracellular Ca(2+) that enhances neurite outgrowth in PC12 cells via activation of 5-HT(3) receptors and voltage-gated calcium channels. *J Neurosci Res*.
- Honda, A., Adams, S.R., Sawyer, C.L., Lev-Ram, V., Tsien, R.Y., Dostmann, W.R., 2001. Spatiotemporal dynamics of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate revealed by a genetically encoded, fluorescent indicator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2437-2442.
- Hotulainen, P., Paunola, E., Vartiainen, M.K., Lappalainen, P., 2005. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell* 16, 649-664.
- Humblot, N., Esteve, L., Burgun, C., Aunis, D., Zwiller, J., 1997. 5-Hydroxytryptamine induces TIS8/egr-1 and c-fos expression in PC12 cells. Involvement of tyrosine protein phosphorylation. *Eur J Neurosci* 9, 84-92.
- Hur, E.M., Park, T.J., Kim, K.T., 2001. Coupling of L-type voltage-sensitive calcium channels to P2X(2) purinoceptors in PC-12 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1121-1129.
- Igarashi, M., Li, W.W., Sudo, Y., Fishman, M.C., 1995. Ligand-induced growth cone collapse: amplification and blockade by variant GAP-43 peptides. *J Neurosci* 15, 5660-5667.
- Ikebe, M., Inagaki, M., Kanamaru, K., Hidaka, H., 1985. Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by Ca²⁺-activated, phospholipid-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 260, 4547-4550.
- Ikebe, M., Reardon, S., 1990. Phosphorylation of smooth muscle caldesmon by calmodulin-dependent protein kinase II. Identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem* 265, 17607-17612.
- Illsley, N.P., Verkman, A.S., 1987. Membrane chloride transport measured using a chloride-sensitive fluorescent probe. *Biochemistry* 26, 1215-1219.
- Isenberg, K.E., Ukhun, I.A., Holstad, S.G., Jaffri, S., Uchida, U., Zorumski, C.F., Yang, J., 1993. Partial cDNA cloning and NGF regulation of a rat 5-HT3 receptor subunit. *Neuroreport* 5, 121-124.
- Jian, X., Hidaka, H., Schmidt, J.T., 1994. Kinase requirement for retinal growth cone motility. *J Neurobiol* 25, 1310-1328.

- Jobin, C.M., Chen, H., Lin, A.J., Yacono, P.W., Igarashi, J., Michel, T., Golan, D.E., 2003. Receptor-regulated dynamic interaction between endothelial nitric oxide synthase and calmodulin revealed by fluorescence resonance energy transfer in living cells. *Biochemistry* 42, 11716-11725.
- Kao, S., Jaiswal, R.K., Kolch, W., Landreth, G.E., 2001. Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* 276, 18169-18177.
- Katerinopoulos, H.E., Foukaraki, E., 2002. Polycarboxylate fluorescent indicators as ion concentration probes in biological systems. *Curr Med Chem* 9, 275-306.
- Kim, W.K., Rabin, R.A., 1994. Characterization of the purinergic P2 receptors in PC12 cells. Evidence for a novel subtype. *J Biol Chem* 269, 6471-6477.
- Komatsu, H., Iwasawa, N., Citterio, D., Suzuki, Y., Kubota, T., Tokuno, K., Kitamura, Y., Oka, K., Suzuki, K., 2004. Design and synthesis of highly sensitive and selective fluorescein-derived magnesium fluorescent probes and application to intracellular 3D Mg²⁺ imaging. *J Am Chem Soc* 126, 16353-16360.
- Kozuka, J., Yokota, H., Arai, Y., Ishii, Y., Yanagida, T., 2006. Dynamic polymorphism of single actin molecules in the actin filament. *Nat Chem Biol* 2, 83-86.
- Kakiuchi, S., Yamazaki, R., 1970. Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (3). *Biochem Biophys Res Commun* 41, 1104-1110.
- Lautermilch, N.J., Spitzer, N.C., 2000. Regulation of calcineurin by growth cone calcium waves controls neurite extension. *J Neurosci* 20, 315-325.
- Lieske, V., Bennett-Clarke, C.A., Rhoades, R.W., 1999. Effects of serotonin on neurite outgrowth from thalamic neurons in vitro. *Neuroscience* 90, 967-974.
- Lima, L., Matus, P., Urbina, M., 1994. Serotonin inhibits outgrowth of goldfish retina and impairs the trophic effect of taurine. *J Neurosci Res* 38, 444-450.
- Lotto, B., Upton, L., Price, D.J., Gaspar, P., 1999. Serotonin receptor activation enhances neurite outgrowth of thalamic neurones in rodents. *Neurosci Lett* 269, 87-90.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Narumiya, S., 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285, 895-898.
- Marin-Vicente, C., Gomez-Fernandez, J.C., Corbalan-Garcia, S., 2005. The ATP-dependent membrane localization of protein kinase Calpha is regulated by Ca²⁺ influx and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in differentiated PC12 cells. *Mol Biol Cell* 16, 2848-2861.
- Mark, M.D., Liu, Y., Wong, S.T., Hinds, T.R., Storm, D.R., 1995. Stimulation of neurite outgrowth in

- PC12 cells by EGF and KCl depolarization: a Ca(2+)-independent phenomenon. *J Cell Biol* 130, 701-710.
- Maruyama, S., Kikuchi, K., Hirano, T., Urano, Y., Nagano, T., 2002. A novel, cell-permeable, fluorescent probe for ratiometric imaging of zinc ion. *J Am Chem Soc* 124, 10650-10651.
- Mazer, C., Muneyyirci, J., Taheny, K., Raio, N., Borella, A., Whitaker-Azmitia, P., 1997. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. *Brain Res* 760, 68-73.
- Meberg, P.J., Ono, S., Minamide, L.S., Takahashi, M., Bamburg, J.R., 1998. Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motil Cytoskeleton* 39, 172-190.
- Mercer, A.R., Kirchhof, B.S., Hildebrand, J.G., 1996. Enhancement by serotonin of the growth in vitro of antennal lobe neurons of the sphinx moth *Manduca sexta*. *J Neurobiol* 29, 49-64.
- Meuwis, K., Boens, N., De Schryver, F.C., Gallay, J., Vincent, M., 1995. Photophysics of the fluorescent K⁺ indicator PBFI. *Biophys J* 68, 2469-2473.
- Mikule, K., Sunpaweravong, S., Gatlin, J.C., Pfenninger, K.H., 2003. Eicosanoid activation of protein kinase C epsilon: involvement in growth cone repellent signaling. *J Biol Chem* 278, 21168-21177.
- Minamide, L.S., Striegl, A.M., Boyle, J.A., Meberg, P.J., Bamburg, J.R., 2000. Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function. *Nat Cell Biol* 2, 628-636.
- Minta, A., Tsien, R.Y., 1989. Fluorescent indicators for cytosolic sodium. *J Biol Chem* 264, 19449-19457.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., Tsien, R.Y., 1997. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882-887.
- Mochizuki, N., Yamashita, S., Kurokawa, K., Ohba, Y., Nagai, T., Miyawaki, A., Matsuda, M., 2001. Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411, 1065-1068.
- Morgan, T.E., Lockerbie, R.O., Minamide, L.S., Browning, M.D., Bamburg, J.R., 1993. Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor. *J Cell Biol* 122, 623-633.
- Mori, K., Muto, Y., Kokuzawa, J., Yoshioka, T., Yoshimura, S., Iwama, T., Okano, Y., Sakai, N., 2004. Neuronal protein NP25 interacts with F-actin. *Neurosci Res* 48, 439-446.
- Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M., Miyawaki, A., 2004. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A 101, 10554-10559.
- Nagata-Ohashi, K., Ohta, Y., Goto, K., Chiba, S., Mori, R., Nishita, M., Ohashi, K., Kousaka, K., Iwamatsu, A., Niwa, R., Uemura, T., Mizuno, K., 2004. A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia. *J Cell Biol* 165, 465-471.
- Nakanishi, S., Okazawa, M., 2006. Membrane potential-regulated Ca²⁺ signalling in development and maturation of mammalian cerebellar granule cells. *J Physiol* 575, 389-395.
- Nishita, M., Wang, Y., Tomizawa, C., Suzuki, A., Niwa, R., Uemura, T., Mizuno, K., 2004. Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion. *J Biol Chem* 279, 7193-7198.
- Niethammer, P., Bastiaens, P., Karsenti, E., 2004. Stathmin-tubulin interaction gradients in motile and mitotic cells. *Science* 303, 1862-1866.
- Nikolaev, V.O., Gambaryan, S., Lohse, M.J., 2006. Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP. *Nat Methods* 3, 23-25.
- Nishiyama, M., Hoshino, A., Tsai, L., Henley, J.R., Goshima, Y., Tessier-Lavigne, M., Poo, M.M., Hong, K., 2003. Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca(2+) channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* 423, 990-995.
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., Uemura, T., 2002. Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* 108, 233-246.
- Nobles, M., Benians, A., Tinker, A., 2005. Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18706-18711.
- Oertner, T.G., Matus, A., 2005. Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. *Cell Calcium* 37, 477-482.
- Okamoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A., Hayashi, Y., 2004. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci* 7, 1104-1112.
- Ono, S., Abe, H., Nagaoka, R., Obinata, T., 1993. Colocalization of ADF and cofilin in intranuclear actin rods of cultured muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil* 14, 195-204.
- Ono, S., Abe, H., Obinata, T., 1996. Stimulus-dependent disorganization of actin filaments induced by overexpression of cofilin in C2 myoblasts. *Cell Struct Funct* 21, 491-499.
- Peng, J., Wallar, B.J., Flanders, A., Swiatek, P.J., Alberts, A.S., 2003. Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Curr Biol* 13, 534-545.
- Pertz, O., Hahn, K.M., 2004. Designing biosensors for Rho family proteins--deciphering the dynamics of Rho family GTPase activation in living cells. *J Cell Sci* 117, 1313-1318.

- Ponsioen, B., Zhao, J., Riedl, J., Zwartkruis, F., van der Krogt, G., Zaccolo, M., Moolenaar, W.H., Bos, J.L., Jalink, K., 2004. Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep* 5, 1176-1180.
- Pooler, A.M., Guez, D.H., Benedictus, R., Wurtman, R.J., 2005. Uridine enhances neurite outgrowth in nerve growth factor-differentiated PC12. *Neuroscience* 134, 207-214.
- Pubill, D., Dayanithi, G., Siatka, C., Andres, M., Dufour, M.N., Guillon, G., Mendre, C., 2001. ATP induces intracellular calcium increases and actin cytoskeleton disaggregation via P2x receptors. *Cell Calcium* 29, 299-309.
- Quinn, J.C., Johnson-Farley, N.N., Yoon, J., Cowen, D.S., 2002. Activation of extracellular-regulated kinase by 5-hydroxytryptamine(2A) receptors in PC12 cells is protein kinase C-independent and requires calmodulin and tyrosine kinases. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 746-752.
- Ralevic, V., Burnstock, G., 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50, 413-492.
- Rink, T.J., Tsien, R.Y., Pozzan, T., 1982. Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes. *J Cell Biol* 95, 189-196.
- Robles, E., Huttenlocher, A., Gomez, T.M., 2003. Filopodial Calcium Transients Regulate Growth Cone Motility and Guidance through Local Activation of Calpain. *Neuron* 38, 597-609.
- Rossino, P., Gavazzi, I., Timpl, R., Aumailley, M., Abbadini, M., Giancotti, F., Silengo, L., Marchisio, P.C., Tarone, G., 1990. Nerve growth factor induces increased expression of a laminin-binding integrin in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Exp Cell Res* 189, 100-108.
- Rui, L., Herrington, J., Carter-Su, C., 1999. SH2-B is required for nerve growth factor-induced neuronal differentiation. *J Biol Chem* 274, 10590-10594.
- Sarmiere, P.D., Bamberg, J.R., 2004. Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. *J Neurobiol* 58, 103-117.
- Sasaki, K., Sato, M., Umezawa, Y., 2003. Fluorescent indicators for Akt/protein kinase B and dynamics of Akt activity visualized in living cells. *J Biol Chem* 278, 30945-30951.
- Sato, M., Hida, N., Ozawa, T., Umezawa, Y., 2000. Fluorescent indicators for cyclic GMP based on cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha and green fluorescent proteins. *Anal Chem* 72, 5918-5924.
- Sato, M., Ozawa, T., Inukai, K., Asano, T., Umezawa, Y., 2002. Fluorescent indicators for imaging protein phosphorylation in single living cells. *Nat Biotechnol* 20, 287-294.
- Sato, M., Ueda, Y., Takagi, T., Umezawa, Y., 2003. Production of PtdInsP3 at endomembranes is triggered by receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* 5, 1016-1022.
- Saudou, F., Hen, R., 1994. 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes in vertebrates and invertebrates. *Neurochem Int* 25, 503-532.
- Schachtner, J., Homberg, U., Truman, J.W., 1999. Regulation of cyclic GMP elevation in the

- developing antennal lobe of the Sphinx moth, *Manduca sexta*. *J Neurobiol* 41, 359-375.
- Schamel, W.W., Dick, T.P., 1996. Signal transduction: specificity of growth factors explained by parallel distributed processing. *Med Hypotheses* 47, 249-255.
- Schmid, J.A., Birbach, A., Hofer-Warbinek, R., Pengg, M., Burner, U., Furtmuller, P.G., Binder, B.R., de Martin, R., 2000. Dynamics of NF kappa B and Ikappa Balpha studied with green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. Investigation of GFP-p65 binding to DNA by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 275, 17035-17042.
- Severin, E.S., Kondratyev, A.D., 1988. Regulation of differentiation of PC12 cells by nerve growth factor. *Adv Enzyme Regul* 27, 357-370.
- Sheng, M., Thompson, M.A., Greenberg, M.E., 1991. CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* 252, 1427-1430.
- Shibasaki, F., Price, E.R., Milan, D., McKeon, F., 1996. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* 382, 370-373.
- Sobue, K., Fujita, M., Muramoto, Y., Kakiuchi, S., 1981. The calmodulin-binding protein in microtubules is tau factor. *FEBS Lett* 132, 137-140.
- Sobue, K., Kanda, K., Kakiuchi, S., 1982. Solubilization and partial purification of protein kinase systems from brain membranes that phosphorylate caldesmon. A spectrin-like calmodulin-binding protein (fodrin). *FEBS Lett* 150, 185-190.
- Sobue, K., Tanaka, T., Kanda, K., Ashino, N., Kakiuchi, S., 1985. Purification and characterization of caldesmon77: a calmodulin-binding protein that interacts with actin filaments from bovine adrenal medulla. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 5025-5029.
- Sodhi, M.S., Sanders-Bush, E., 2004. Serotonin and brain development. *Int Rev Neurobiol* 59, 111-174.
- Solem, M., McMahon, T., Messing, R.O., 1995. Depolarization-induced neurite outgrowth in PC12 cells requires permissive, low level NGF receptor stimulation and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurosci* 15, 5966-5975.
- Soosairajah, J., Maiti, S., Wiggan, O., Sarmiere, P., Moussi, N., Sarcevic, B., Sampath, R., Bamburg, J.R., Bernard, O., 2005. Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *Embo J* 24, 473-486.
- Suzuki, Y., Komatsu, H., Ikeda, T., Saito, N., Araki, S., Citterio, D., Hisamoto, D., Kitamura, Y., Kubota, T., Nakagawa, J., Oka, K., Suzuki, K., 2002. Design and synthesis of Mg²⁺-selective fluoroionophores based on a coumarin derivative and application for Mg²⁺ measurement in a living cell. *Anal Chem* 74, 1423-1428.
- Tagliatela, G., Angelucci, L., Ramacci, M.T., Werrbach-Perez, K., Jackson, G.R., Perez-Polo, J.R., 1991. Acetyl-L-carnitine enhances the response of PC12 cells to nerve growth factor. *Brain Res Dev Brain Res* 59, 221-230.

- Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M., Nishizuka, Y., 1977. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem* 252, 7603-7609.
- Toshima, J., Toshima, J.Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S., Mizuno, K., 2001a. Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol Biol Cell* 12, 1131-1145.
- Toshima, J., Toshima, J.Y., Takeuchi, K., Mori, R., Mizuno, K., 2001b. Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *J Biol Chem* 276, 31449-31458.
- Tran, T.C., Singleton, C., Fraley, T.S., Greenwood, J.A., 2005. Cysteine-rich protein 1 (CRP1) regulates actin filament bundling. *BMC Cell Biol* 6, 45.
- Tsien, R.Y., 1980. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19, 2396-2404.
- Udo, H., Jin, I., Kim, J.H., Li, H.L., Youn, T., Hawkins, R.D., Kandel, E.R., Bailey, C.H., 2005. Serotonin-induced regulation of the actin network for learning-related synaptic growth requires Cdc42, N-WASP, and PAK in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 45, 887-901.
- van der Wal, J., Habets, R., Varnai, P., Balla, T., Jalink, K., 2001. Monitoring agonist-induced phospholipase C activation in live cells by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 276, 15337-15344.
- Vaudry, D., Stork, P.J., Lazarovici, P., Eiden, L.E., 2002. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* 296, 1648-1649.
- Vetterkind, S., Illenberger, S., Kubicek, J., Boosen, M., Appel, S., Naim, H.Y., Scheidtmann, K.H., Preuss, U., 2005. Binding of Par-4 to the actin cytoskeleton is essential for Par-4/Dlk-mediated apoptosis. *Exp Cell Res* 305, 392-408.
- Villardaga, J.P., Bunemann, M., Krasel, C., Castro, M., Lohse, M.J., 2003. Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol* 21, 807-812.
- Violin, J.D., Zhang, J., Tsien, R.Y., Newton, A.C., 2003. A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *J Cell Biol* 161, 899-909.
- Vitalis, T., Parnavelas, J.G., 2003. The role of serotonin in early cortical development. *Dev Neurosci* 25, 245-256.
- Vogel, S.S., Thaler, C., Koushik, S.V., 2006. Fanciful FRET. *Sci STKE* 2006, re2.
- Wang, Y., Botvinick, E.L., Zhao, Y., Berns, M.W., Usami, S., Tsien, R.Y., Chien, S., 2005. Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* 434, 1040-1045.

- Wang, Y., Shibasaki, F., Mizuno, K., 2005. Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *J Biol Chem* 280, 12683-12689.
- Whitaker, J.E., Haugland, R.P., Prendergast, F.G., 1991. Spectral and photophysical studies of benzo[c]xanthene dyes: dual emission pH sensors. *Anal Biochem* 194, 330-344.
- Whitaker-Azmitia, P.M., 2001. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull* 56, 479-485.
- Williams, E.J., Mittal, B., Walsh, F.S., Doherty, P., 1995. A Ca²⁺/calmodulin kinase inhibitor, KN-62, inhibits neurite outgrowth stimulated by CAMs and FGF. *Mol Cell Neurosci* 6, 69-79.
- Xiang, Y., Li, Y., Zhang, Z., Cui, K., Wang, S., Yuan, X.B., Wu, C.P., Poo, M.M., Duan, S., 2002. Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nat Neurosci* 5, 843-848.
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., Mizuno, K., 1998. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 393, 809-812.
- Zaccolo, M., De Giorgi, F., Cho, C.Y., Feng, L., Knapp, T., Negulescu, P.A., Taylor, S.S., Tsien, R.Y., Pozzan, T., 2000. A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nat Cell Biol* 2, 25-29.
- Zaccolo, M., Pozzan, T., 2002. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* 295, 1711-1715.
- Zachor, D.A., Moore, J.F., Brezausk, C., Theibert, A., Percy, A.K., 2000. Cocaine inhibits NGF-induced PC12 cells differentiation through D(1)-type dopamine receptors. *Brain Res* 869, 85-97.
- Zhang, J., Ma, Y., Taylor, S.S., Tsien, R.Y., 2001. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14997-15002.
- Zhang, Z., Tarone, G., Turner, D.C., 1993. Expression of integrin alpha 1 beta 1 is regulated by nerve growth factor and dexamethasone in PC12 cells. Functional consequences for adhesion and neurite outgrowth. *J Biol Chem* 268, 5557-5565.
- Zhou, F.Q., Cohan, C.S., 2001. Growth cone collapse through coincident loss of actin bundles and leading edge actin without actin depolymerization. *J Cell Biol* 153, 1071-1084.

高垣玄吉郎, 永津俊治, 神経伝達物質—アミノ酸とアミン (1981)

後藤秀機, 神経と化学伝達 (1988)

御子柴克彦, 遠藤實, 宮本英七 編, カルシウムイオンとシグナル伝達 (1998)

木下一彦, 御橋廣眞, 蛍光測定—生物化学への応用— (1983)

参考文献

御橋廣眞, 蛍光分光とイメージングの手法 (2006)

三木裕明 編, 細胞骨格・運動がわかるーその制御機構とシグナル伝達ネットワーク (2004)

久保田健, 博士論文 (2004)

P. Gordon-Weeks, NEURONAL GROWTH CONES (2000)

公刊論文目録および口頭発表目録

発表論文

Homma K., Kitamura Y, Ogawa H, Oka K, “Serotonin induces the increase in intracellular Ca^{2+} that enhances neurite outgrowth in PC12 cells via activation of 5-HT₃ receptors and voltage-gated calcium channels.” J Neurosci Res. 2006 Aug 1;84(2):316-25.

Homma K., Niino Y, Hotta K, Oka K, “ Ca^{2+} influx through P2X receptors induces actin cytoskeleton reorganization by the formation of cofilin rods in neurites” Molecularr and Cellular Neuroscience 2007, in press.

学会等における口頭発表

国際会議

Homma K., Kitamura Y., Ogawa H., and Oka K. : Effects of the expression of 5-HT₃ receptors to mobility of growth cones in PC12 cells, 32nd Society for Neuroscience, 2002.11.2-7

Homma K., Kitamura Y., Ogawa H., and Oka K.: “Effects of Serotonin on Neurite Outgrowth in PC12 Cells”, 6th International Brain Research Organization Congress of Neuroscience, 2003.7.10-15, Prague, Czech Republic

Homma K., Kitamura Y., Ogawa H., and Oka K.: “Effects of serotonin on NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells”, 33rd Society for Neuroscience, 2003.11.8-12, New Orleans, USA.

Homma K., Niino Y., Ogawa H., Kitamura Y., Oka K. :”Reorganization of actin cytoskeleton during 5-HT-enhanced neurite outgrowth”, Neuropharmacology Conference, 2004.10.20-22, San Diego, USA

Homma K., Niino Y., Ogawa H., Kitamura Y., Oka K. :”Analysis of cytoskeleton dynamics during 5-HT-enhanced neurite outgrowth in PC12 cells”, Society for Neuroscience, 2004.10.23-27, San Diego, USA

国内会議

本間耕平、北村美一郎、小川宏人、岡浩太郎：PC12 細胞におけるセロトニン作動性イオンチャンネル型受容体の発現とその影響，第 25 回日本神経科学大会 2002 年 7 月 7-9 日，東京

本間耕平、北村美一郎、小川宏人、岡浩太郎：“PC12 細胞の神経突起伸展におけるセロトニンの効果”，第 26 回日本神経科学大会, II-B-056. 2003 年 7 月 23-25 日，名古屋

本間耕平、北村美一郎、小川宏人、岡浩太郎 “NGF 分化誘導された PC12 細胞におけるセロトニン依存性カルシウムの変化”，第 41 回日本生物物理学会, 2003 年 9 月 23-25 日，新潟

本間耕平、北村美一郎、小川宏人、岡浩太郎：“PC12 細胞におけるセロトニンによるカルシウム応答の経時変化”，第 12 回日本バイオイメージング学会, 2003 年 10 月 29-31 日，横浜

本間耕平，新野祐介，小川宏人，北村美一郎，岡浩太郎：“NGF 突起伸展時の PC12 細胞におけるセロトニンの効果”，第 27 回日本神経科学大会，2004 年 9 月 21-23 日，大阪

本間耕平，新野祐介，小川宏人，北村美一郎，岡浩太郎：“PC12 細胞における 5-HT₃ 受容体を介した突起伸展促進効果”，日本生物物理学会第 42 回年会，2004 年 12 月 13-15 日，京都

Homma K., Niino Y., Ogawa H., Kitamura Y., Oka K. :”Visualization of actin cytoskeleton during serotonin-enhanced neurite outgrowth in PC12 cells”, The 21st Century COE Young Scientist Workshop, 2004.11.26-27, Yokohama

Homma K., Niino Y., Ogawa H., Kitamura Y., Oka K. :”Analysis of actin cytoskeleton dynamics during serotonin-enhanced neurite outgrowth in PC12 cells”, The 21st Century COE Young Scientist Workshop, 2005.3.11, Tokyo

本間耕平，新野祐介，小川宏人，北村美一郎，岡浩太郎：“PC12 細胞におけるセロトニンによるアクチン細胞骨格動態の変化”，第 28 回日本神経科学大会，P1-095，2005 年 7 月 26-28 日，横浜

本間耕平，新野祐介，小川宏人，北村美一郎，岡浩太郎：“PC12 細胞の細胞内カルシウム濃度上昇によるアクチン細胞骨格動態の変化”，COE 生命科学分野ワークショップ，2005 年 9 月 19-21 日，三浦

本間耕平，岡浩太郎：“神経細胞の突起伸展における細胞内シグナル伝達機構の解明”，日本神経回路学会平成 17 年度時限研究会，2005 年 12 月 17-18 日，鶴岡

本間耕平, 新野祐介, 小川宏人, 堀田耕司, 岡浩太郎: “細胞内カルシウム濃度上昇によるアクチン細胞骨格動態変化の解析”, 文部科学省科学技術振興調整費「システム生物学者育成プログラム」シンポジウム, 2006年2月24-25日, 横浜

本間耕平, 新野祐介, 小川宏人, 堀田耕司, 岡浩太郎: “PC12細胞における細胞内カルシウムによるアクチン細胞骨格動態の変化”, 第29回日本神経科学大会, 2006年7月19-21日, 京都

受賞

the 21st Century COE Young Scientist Workshop Best Poster Award, 2005.3.11