計測自動制御学会東北支部　第 231 回研究集会(2006.10.31)
資料番号　231-21

神経成長円錐ガイダンス機構のモデリング

Modeling of growth cone guidance mechanism

北嶋 龍雄*，○仲野 広樹*，澤井 有紀*，相原 威**

Kitajima Tatsuo *，○Nakano Hiroki*，Sawai Yuki*，Aihara Takeshi**

*山形大学，**玉川大学

*Yamagata University，**Tamagawa University

キーワード：神経成長円錐(growth cone), cAMP/cGMP, 小胞体(Endoplasmic reticulum(ER)), IP3 受容体(IP3 receptor), RyR 受容体(RyR receptor)

連絡先：〒992-8510　山形県米沢市城南 4-3-16 山形大学工学部　応用生命システム工学科
E-mail：kitajima@yz.yamagata-u.ac.jp

1. はじめに

シナプス前活性、シナプス後活性によって神経細胞内に生じる Ca^{2+}濃度変化は、長期増強（LTP）、長期抑圧（LTD）といったシナプス可塑性と密接な関係をもつことが明らかにされている。また、ホルモンや成長因子あるいは神経伝達物質の投与により細胞内に生じる Ca^{2+}振動・伝搬は神経細胞がもつ様々な機能の調節に重要な役割をになうと考えられている。このような Ca^{2+}振動現象は細胞体、樹状突起、樹状突起スパイン等の内部に広く存在し、小胞体（ER）からの Ca^{2+}放出・取り込みが大きく関与している。実際、小胞体と細胞質の間には様々な情報伝達経路が存在し、Ca^{2+}の時間的・空間的特性の調整メカニズムに密接に関わっていると考えられている。

成長円錐の進展には、適当な Ca^{2+}濃度が必要であり、小胞体膜上に存在するイノシトール 3 リン酸受容体(IP3R)からの Ca^{2+}放出も大きく関わっていることが明らかにされている。Gorbunova らは Xenopus 胚脊髄細胞にサイクリック AMP（cAMP）を投与することにより細胞内にその濃度に依存した周波数をもつ Ca^{2+}振動が生じることを明らかにした [1]。軸索成長因子である Netrin-1 が成長円錐内の cAMP を増加させること [2]、さらに L 型膜電位依存性 Ca チャネルの活性が、cAMP-PKA 経路を通して増強され [3]、cGMP-PKG 経路を通して抑制されることも明らかにされている。

近年、Nishiyama らは Netrin-1 が成長円錐内 Ca^{2+}濃度を増加させること、また Netrin-1 で誘導される成長円錐の誘引作用には L 型膜電位依存性 Ca^{2+}チャネルを介する Ca^{2+}の流入と IP3R、ライアノジン受容体(RyR)の両者からの Ca^{2+}放出が必要であること、さらに、成長円錐内の cAMP と cGMP の比によって、誘引、反発、直進の応答を示すことを明らかにした [4][5][6]。

本研究では、内部に小胞体を含み、小胞体膜上に IP3R、RyR をもつ成長円錐モデルを構築し、モデル

内の Ca^{2+}振動現象と Nishiyama らが実験で明らかにした環状ヌクレオチドによる成長円錐の誘引・反発の関わりを計算機シミュレーションにより明らかにする。

2. 成長円錐の誘引・反発運動に関する生理学的知見

両方向性軸索誘導因子である Netrin-1 シグナルを伝達する受容体には DCC(delated colorectal cancer) と DCC/UNC5 の 2 つの受容体が存在する。DCC 受容体は、誘引作用を、DCC/UNC5 は反発作用を誘導すると考えられる。Nishiyama らは、Xenopus 胚脊髄細胞培養細胞において、Netrin-1 の濃度勾配に対する成長円錐の誘引・反発作用に関して以下の実験事実を明らかにした：

<DCC に Netrin-1 が結合した時>

PKA を不活性化した場合、反発作用

PKG を活性化した場合、反発作用

<DCC/UNC5 に Netrin-1 が結合した時>

PKA を不活性化した場合、直進

PKG を不活性化した場合、誘引作用

これらの実験結果は模式的に Fig.1(a)のように表すことができる。Fig.1(b)には実際の誘引・反発の様子を示す。

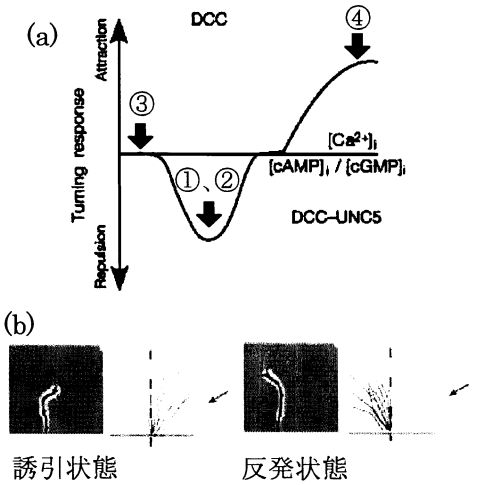

Fig 1 (a) 成長円錐内 cAMP/cGMP 比に依存したターニング応答[1](b) 成長円錐の誘引、反発の状態

さらに、Nishiyama らは、cAMP 濃度+cGMP 濃度を一定にし、その比率を変えた実験を行い、Fig.2 に示す結果を得ている。

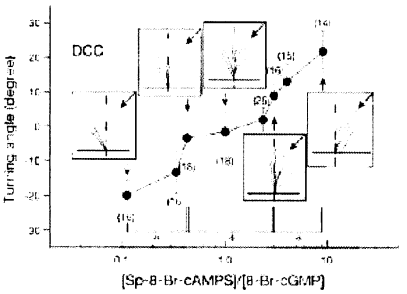

Fig 2 cAMP/cGMP 比を変化させた場合のターニング応答

cAMP/cGMP 比が高い場合は誘引作用を示し、低い場合は反発作用を示す。誘引、直進、反発へと変化していく過程ではそれぞれ 3 倍以上の比率変化が必要である。すなわち cAMP と cGMP の濃度比によって誘引、反発等が生じることから成長円錐運動に環状ヌクレオチドが重要な関与をしていることが示唆される。

3. モデル化

3.1. 誘引・反発の機序

本研究での反応機序を図 3 に示す。

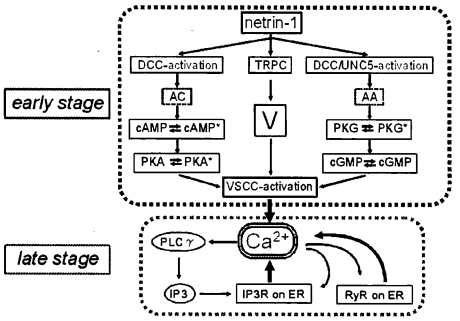

Fig 3 誘引・反発の機序

左側の経路は Netrin-1 が DCC に結合した場合で、アデニールシクラーゼ（AC）を通り、cAMP-protein kinase A (PKA)を活性化した結果、電位依存性 Ca^{2+} チャネル（VSCC）を興奮させる。右側の経路は Netrin-1 が DCC/UNC5 に結合した場合で、アラキドン酸(AA)を通り、cGMP-protein kinase G (PKG)を活性化した結果 VSCC を抑制させる。また、中央は Netrin-1 が直接 transient receptor potential channel (TRPC) に結合し膜電位を上昇させた結果、VSCC

を興奮させる。この段階を early stage と呼ぶ。この early stage により細胞質内 Ca^{2+}濃度が上昇する。そして Ca^{2+}濃度依存である PLCγ が活性化することにより IP3 が産生される。この IP3 が結合することにより受容体が開口する IP3R、そして細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇により Ca^{2+}依存的に開口する受容体でライアノジンと特異的に高い親和性をもつ RyR により小胞体（ER）から細胞質内へさらに Ca^{2+}を流出させる。この段階を late stage と呼ぶ。

3.2. 神経成長円錐モデル

本研究で用いるニューロンモデルを Fig.4 に示す。

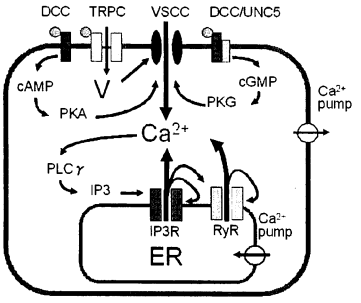

Fig 4 成長円錐モデル

細胞膜上には DCC、DCC/UNC5、TRPC といわれるタンパク質で構成されるイオンチャネル、VSCC、Ca^{2+}依存性ポンプが存在する。また、小胞体膜上には IP3R、RyR、そして Ca^{2+}依存性ポンプが存在する。まず、Netrin-1 が DCC に結合することにより cAMP が PKA を産生し膜電位（V）が上昇する[5]。一方、Netrin-1 が DCC/UNC5 に結合すると cGMP が活性化され PKG が産生されて V が下がる。また、Netrin-1 が TRPC へ結合すると V が上昇する。この経路より、細胞外から細胞質内へ Ca^{2+}が流入し、その結果細胞質内の Ca^{2+}濃度が上昇する。そして、Ca^{2+}依存により産生され、フォスフォリパーゼ C(PLC)が上昇して IP3 が産生される。そして小胞体膜上に存在する IP3R に結合し小胞体から細胞質内へ Ca^{2+}を流出させ、細胞質内の Ca^{2+}濃度を上昇させる。また、細胞質内 Ca^{2+}濃度は RyR に結合し、さらに小胞体から細胞質内へ Ca^{2+}を流出させる[6]。

4. シミュレーション

成長円錐モデルにおいて、cAMP/cGMP 比を変化させた場合の細胞質内の Ca^{2+}濃度はどのように変化するか検証を行う。また誘引・反発時の Ca^{2+}濃度変化の違いについて検証する。

4.1. シミュレーション①

cAMP/cGMP 比を変えたときの細胞質内 Ca^{2+}濃度を Fig.5 に示す。

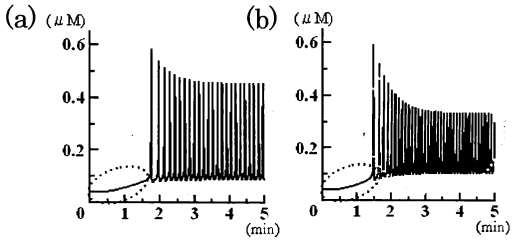

Fig 5 (a) cAMP : cGMP = 0.1 : 0.9 (Repulsive)のときの結果
(b) cAMP : cGMP = 0.9 : 0.1 (Attractive)のときの結果

このシミュレーション結果より cAMP/cGMP 比を変えることによって late stage において生じる Ca^{2+}振動の周波数が変化することがわかる。このときの周波数比と cAMP/cGMP 比を比べると Fig. 6 のようになる。これは Nishiyama らが実験より得た結果(Fig.2)と同様であることがわかり、Ca^{2+}振動の周波数の変化が誘引・反発を引き起こしているということが考えられる。

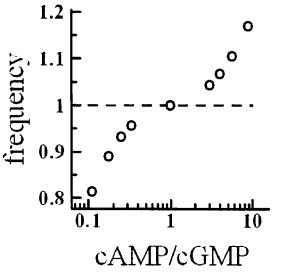

Fig 6 cAMP/cGMP 比に対する周波数比

4.2. シミュレーション②

cAMP/cGMP 比を変えることによって生じる Ca^{2+}振動の周波数変化について検証を行う。

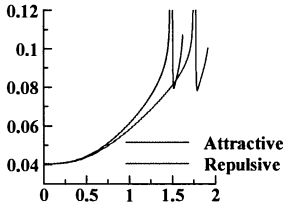

Fig 7 Attractive と Repulsive の early stage の比較

この結果より early stage における立ち上がりの変化に関係していると考えられる。このことより VSCC による Ca^{2+}流入量の変化をみると、

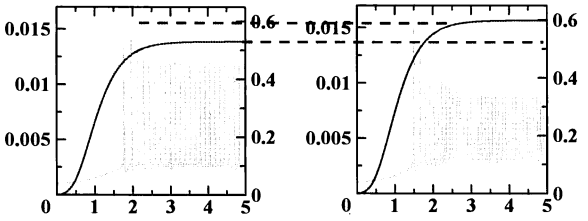

Fig 8 Attractive(左)と Repulsive(右)における VSCC の Ca^{2+}流入量とその時の Ca^{2+}振動

となり VSCC からの Ca^{2+}流入量が Ca^{2+}振動周波数を変化させていると考えられる。

5. まとめ

内部に小胞体を含む神経成長円錐モデルを構築して、計算機シミュレーションにより cAMP/cGMP 比により Ca^{2+}振動周波数が変化し、その Ca^{2+}振動周波数に応じて神経成長円錐が誘引・反発されるのではないかと考えられることを示した。また VSCC による Ca^{2+}流入量が cAMP/cGMP 比によって変化し、その変化により Ca^{2+}振動周波数も変化していることが考えられることを示した。

今後、生体実験での結果と比較、検討することにより IP3R や RyR との関係を考え、アクチン・ミオシン等の作用による軸索成長のモデルを構築したい。

参考文献

1) Gorbunova, YV,et al: Dynamic interactions of cyclic AMP transients and spontaneous Ca(2+) spikes, Nature, 418, 93/96(2002)

2) Ming, GL,et al : cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1, Neuron, 19,1225/1235 (1997)

3) Hopker,VH,et.al: Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1, Nature, 401, 69/73 (1999)

4) Nishiyama M,et al : Calcium signaling in the guidance of nerve growth by netrin-1 Nature,408,584/588 (2000)

5) Hong, K et al : Calcium signalling in the guidance of nerve growth by netrin-1, Nature, 403,93/98, (2000)

6) Nishiyama M, et al : Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca^{2+} channels sets the polarity of nerve growth-cone turning Nature, 423, 990/995 (2003)

Appendix

膜電位

$$C\frac{d[V_m]}{dt}=(-G_{leak}([V_m]-V_{leak})-TRPC) \quad (1)$$

$$TRPC=-G_{leak}\cdot V\cdot(-\exp(\frac{-t}{Rise_t})+1) \quad (2)$$

Ca^{2+} ダイナミクス

$$ILCa=G_{Ca}[m]^2[V_m]\frac{(1-\frac{Ca_{in}}{Ca_{out}})\exp(\frac{2\cdot F\cdot[V_m]}{KT})}{1-\exp(\frac{2\cdot F\cdot[V_m]}{KT})} \quad (3)$$

$$\frac{d[C]}{dt}=-k_b\cdot ILCa\cdot Qx+k_{IP3R}\cdot[Ric]\cdot C_{ER}+k_{RyR}\cdot[Rcr]\cdot C_{ER} -k_a([C]-C_c)-\frac{p_1([C]-C)^2}{([C]-C)^2+p_2^2}-\frac{q_1([C]-C)^2}{([C]-C)^2+q_2^2} \quad (4)$$

$$Qx=k_0+k_{AMP}(\frac{[cAMP*]^2}{[cAMP*]^2-1.0})-k_{GMP}(\frac{[cGMP*]^2}{[cGMP*]^2-1.0}) \quad (5)$$

cAMP、cGMP 濃度

$$\frac{d[cAMP*]}{dt}=ka_{AMP}\cdot[cAMP]-ki_{AMP}\cdot[cAMP*] \quad (6)$$

$$\frac{d[cGMP*]}{dt}=ka_{GMP}\cdot[cGMP]-ki_{GMP}\cdot[cGMP*] \quad (7)$$