

神経成長円錐内のカルシウム振動現象のモデリング

Modeling of calcium oscillation in a growth cone

○仲野 広樹, 北嶋 龍雄

○Nakano Hiroki, Kitajima Tatsuo

山形大学

Yamagata 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+} 振動現象は小胞体、樹状突起、樹状突起スパ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。

成長円錐の伸展には、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 (IP3 受容体) 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-プロテインキナーゼ A (PKA) 経路を通して増強され³⁾、サイクリック GMP (cGMP)-プロテインキナーゼ G (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 (VSCC) を介する Ca^{2+} の流入と IP3 受容体、リアノジン受容体 (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)}。

本研究では、内部に小胞体を含み、小胞体膜上にIP3受容体、リアノジン受容体をもつ成長円錐モデルを構築し、モデル内のCa²⁺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 (deleted colorectal cancer) と DCCUNC5 の 2 つの受容体が存在する。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、DCC 受容体は、誘引作用を、DCCUNC5 は反発作用を誘導することを明らかにした (Fig 1)。



Fig. 1 成長円錐の誘引・反発

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。

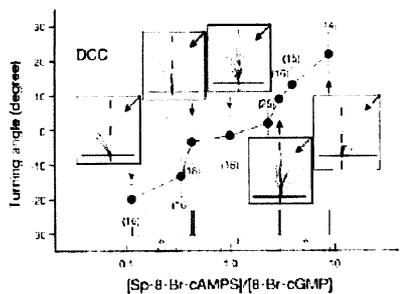


Fig. 2 cAMP/cGMP 比を変化させた場合のターニング応答
cAMP/cGMP 比が高い場合は誘引作用を示し、低い場合は反発作用を示す。誘引、直進、反発へと変化していく過程ではそれぞれ3倍以上の比率変化が必要である。すなわちcAMP と cGMP の濃度比によって誘引、反発等が生じることから成長円錐運動に環状ヌ

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。

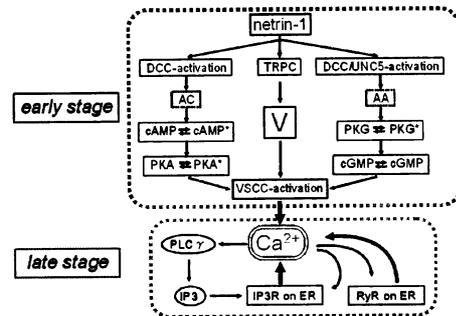


Fig.3 誘引・反発の機序

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- PKA を活性化した結果、電位依存性 Ca²⁺チャネル (VSCC) を興奮させる。右側の経路は Netrin-1 が DCCUNC5 に結合した場合で、アラキドン酸(AA)を通り、cGMP- 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。この段階を初期ステージと呼ぶ。この early stage により細胞質内 Ca²⁺濃度が上昇する。そして Ca²⁺濃度依存であるフォスホリファゼ C(PLC)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 IP3 受容体、そして細胞内 Ca²⁺濃度の上昇により Ca²⁺依存的に開口する受容体でリアノジンと特異的に高い親和性をもつリアノジン受容体により小胞体 (ER) から細胞質内へさらに Ca²⁺を流出させる。この段階を後期ステージと呼ぶ。

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。

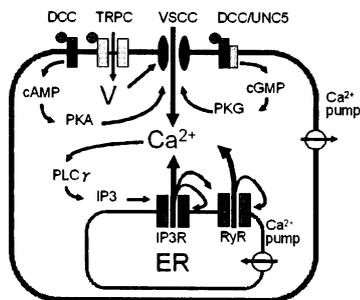


Fig.4 成長円錐モデル

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、Ca²⁺依存性ポンプが存在する。また、小胞体膜上には IP3 受容体(IP3R)、リアノジン受容体、そして Ca²⁺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⁹⁾。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 Ca²⁺ が流入し、その結果細胞質内の Ca²⁺ 濃度が上昇する。そして、Ca²⁺ 依存により産生され、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 IP3 受容体に結合し小胞体から細胞質内へ Ca²⁺ を流出させ、細胞質内の Ca²⁺ 濃度を上昇させる。また、細胞質内 Ca²⁺ 濃度はリアノジン受容体に結合し、さらに小胞体から細胞質内へ Ca²⁺ を流出させる⁹⁾。

4. シミュレーション

4.1. シミュレーション①

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 Ca²⁺ 濃度ほどのように変化するか検証を行う。また誘引・反発時の Ca²⁺ 濃度変化の違いについて検証する。

cAMP/cGMP 比を変えたときの細胞質内 Ca²⁺ 濃度を Fig.5 に示す。

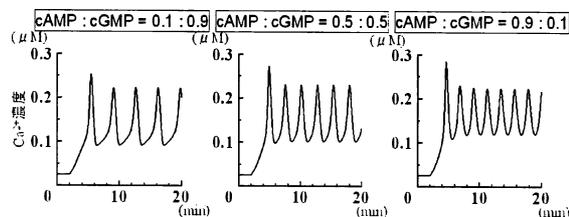


Fig.5 cAMP/cGMP 比を変化させたときの Ca²⁺ 濃度変化

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 Ca²⁺ 振動の周波数が変化することがわかる。また cAMP/cGMP 比の変化による振動周波数の違いをみると Fig.6 となる。この結果は Fig.2 と酷似していることから Ca²⁺ 振動周波数が成長円錐のターニング応答と深く関連することが分かる。

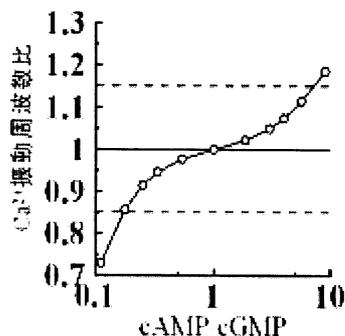


Fig.6 cAMP/cGMP に対する Ca²⁺ 振動周波数比

4.2. シミュレーション②

Ca²⁺ 振動メカニズムについて、IP3 受容体の開口特性をと、IP3 受容体の開口率は Ca²⁺ 濃度が上昇するとき (Fig. 7 左) Ca²⁺ 濃度上昇に伴い隆起してから平衡状態になる。また Ca²⁺ 濃度が減少するとき (Fig. 7 右) は平衡状態より下がってから平衡状態になることがわかる。

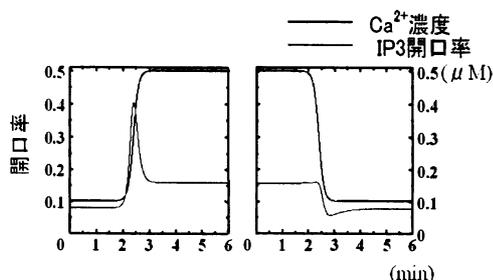


Fig.7 Ca²⁺ 濃度に対する IP3 受容体開口率

この結果より Ca^{2+} 振動のときの Ca^{2+} 濃度に対する Ca^{2+} 流入量をみると Ca^{2+} 濃度上昇のときと減少のときでは流入量に差があること(Fig.8) がわかり、これらのことから振動現象に深く関係していると考えられる。

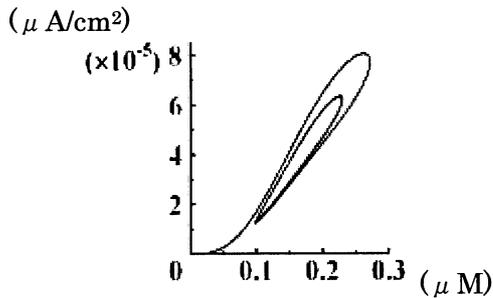


Fig.8 Ca^{2+} 濃度に対する IP3 受容体からの Ca^{2+} 流入量

4.3. シミュレーション③

振動周波数の変化について検証するため、Attractive と Repulsive のときの Ca^{2+} 濃度変化を比べる(Fig.9)。

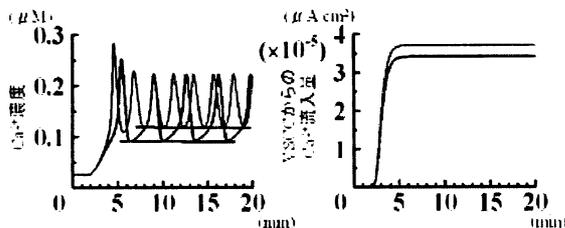


Fig.9 Attractive と Repulsive における Ca^{2+} 濃度変化(左)と VSCC からの Ca^{2+} 流入量(右)

Fig.9(左)より Attractive と Repulsive では持続振動の発火閾値に違いがあることが分かる。この閾値の違いによって発火のタイミングは早まり、閾値が高いと発火も速くなり周波数が高く、閾値が低いと周波数が低くなると考えられる。また Attractive と Repulsive では VSCC からの流入量に Fig.9(右)のような差があることから、この閾値の違いは VSCC からの Ca^{2+} 流入量差で変化するのではないかと考えられる。そこで VSCC からの Ca^{2+} 流入量を途中で変化させてシミュレーションを行った(Fig.10)。

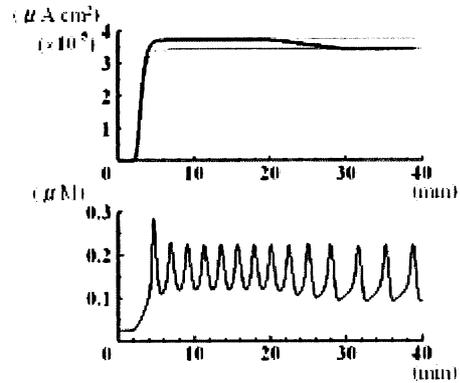


Fig.10 VSCC からの Ca^{2+} 流入量(上)と Ca^{2+} 濃度変化
この結果よりはじめ高い周波数で振動していたが、VSCC からの Ca^{2+} 流入量の減少に伴い周波数は低下することがわかった。また閾値も VSCC からの Ca^{2+} 流入の低下に伴い低くなっていることがわかる。

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を行い、cAMP/cGMP 比により Ca^{2+} 振動周波数が変化ことを明らかにした。さらに Ca^{2+} 振動周波数に応じて神経成長円錐が誘引・反発されると考えられることを示した。また VSCC からの Ca^{2+} 流入量が変化することにより Ca^{2+} 振動の閾値が変化し Ca^{2+} 振動周波数が変化することを示した。

今後、 Ca^{2+} 流入に合わせて膜電位が変化するようなモデルの構築、また生体では netrin-1 が一様ではなく濃度勾配があると考えられることから濃度勾配に応じて入力を変化させたときの Ca^{2+} 振動特性について調べていきたい。

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 Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning Nature, 423, 990/995 (2003)

リアノジン受容体

$$\frac{d[RyR]}{dt} = -(1_1 + 1_2)[Ca][RyR] + 1_{11}[RyRc] + 1_{22}[RyRr] \quad (13)$$

$$\frac{d[RyRc]}{dt} = -(1_1 + 1_2[Ca])[RyRc] + 1_1[Ca][RyR] + 1_{22}[RyRr] \quad (14)$$

$$\frac{d[RyRr]}{dt} = -(1_1[Ca] + 1_{22})[RyRr] + 1_{11}[RyR] + 1_2[Ca][RyRc] \quad (15)$$

Appendix

膜電位

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

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

Ca²⁺ ダイナミクス

$$\begin{aligned} \frac{d[C]}{dt} = & -k_0 \cdot ILCa \cdot Qx + k_{P3R}[Ric] \cdot C_{ER} + k_{RyR}[Rcr] \cdot C_{ER} \\ & - k_n([C] - C_c) - \frac{p_1([C] - C)^2}{([C] - C)^2 + p_2^2} - \frac{q_1([C] - C)^2}{([C] - C)^2 + q_2^2} \end{aligned} \quad (3)$$

VSCC ダイナミクス

$$ILCa = G_{Ca}[m]^2[V_m] \frac{(1 - \frac{Ca_{in}}{Ca_{out}}) \exp(\frac{2 \cdot F \cdot [V_m]}{KT})}{1 - \exp(\frac{2 \cdot F \cdot [V_m]}{KT})} \quad (4)$$

$$\frac{d[m]}{dt} = \frac{(\varphi_m - [m])}{\tau_m} \quad (5)$$

cAMP、cGMP 活性

$$Qx = k_0 + k_{AMP} \frac{[cAMP]^2}{[cAMP]^2 - 1.0} - k_{GMP} \frac{[cGMP]^2}{[cGMP]^2 - 1.0} \quad (6)$$

$$\frac{d[cAMP]}{dt} = k_{aAMP}[cAMP] - k_{iAMP}[cAMP] \quad (7)$$

$$\frac{d[cGMP]}{dt} = k_{aGMP}[cGMP] - k_{iGMP}[cGMP] \quad (8)$$

IP3 受容体ダイナミクス

$$\frac{d[R]}{dt} = -k_{A1}[IP_3][R] + k_{A11}[Ri] \quad (9)$$

$$\frac{d[Ri]}{dt} = -(k_{A2}[Ca] + k_{A11})[Ri] + k_{A1}[IP_3][R] + k_{A22}[Ric] \quad (10)$$

$$\frac{d[Ric]}{dt} = -(k_{I1}[Ca] + k_{A22})[Ric] + k_{A2}[Ca][Ri] + k_{I11}[Rc] \quad (11)$$

$$\frac{d[Rc]}{dt} = -k_{I11}[Rc] + k_{I1}[Ca][Ric] \quad (12)$$