

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06769

研究課題名(和文) 神経成長円錐のアクチン再編を伴う小胞輸送機構

研究課題名(英文) Coordinated vesicular transport and actin reorganization in the neuronal growth cone

研究代表者

野住 素広 (Nozumi, Motohiro)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：00420323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経回路形成または再生時において、軸索を先導する成長円錐は運動性に優れた構造を形成する。成長円錐の最前線(先導端)では連続的なアクチン細胞骨格の再編と形質膜の回収が頻繁に生じるが、両者の関係性は明らかになっていなかった。我々は超解像顕微鏡(3D-SIM)を用いた成長円錐の解析で、F-アクチン束化によるフィロポディア形成に伴って小胞膜タンパク質シナプトフィジン(Syp)陽性の小胞が先導端で生じることを発見した。先導端のSyp小胞はBARドメインタンパク質のエンドフィリンA3、ダイナミン1依存性、クラスリン非依存性のエンドサイトーシスで生じ、脂質ラフトの回収に関係することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The neuronal growth cone is a motile tip of the growing axon at the times of the neuronal development/regeneration. The continuous reorganization of actin cytoskeleton and the membrane retrieval from the plasma membrane are observed in the leading edge of the growth cone. We found that the synaptophysin (Syp)-positive vesicles arose near the filopodia, and most of them were retrogradely moving along the actin bundles, using a superresolution microscopy 3D-SIM. The retrogradely moving Syp were colocalized with a BAR domain protein, endophilin A3 (Endo3), and dynamin 1 (Dnm1), but not with clathrin. Whereas clathrin mainly accumulated in the basal membrane in the central domain of the growth cone, Endo3 emerged in the dorsal surface. Accumulation of Endo3 depended on the F-actin bundling. These results suggest that the Syp-vesicles by Endo3-, Dnm1-dependent and clathrin-independent endocytosis, occurring at the apical membrane of the leading edge, coincides with filopodial formation.

研究分野：神経生化学

キーワード：成長円錐 アクチン エンドサイトーシス 超解像顕微鏡

### 1. 研究開始当初の背景

神経回路の形成や再生時に神経細胞から伸びる軸索の先端には成長円錐と呼ばれる運動性に富んだ構造が形成される。成長円錐は形質膜上に存在する多様な受容体からの情報伝達によって正しい伸長経路を選択し、進行方向に向けて細胞骨格を伸ばすことで前進する。これまで成長円錐では頻りにエンドサイトーシスが生じ、形質膜の細胞内への取込みを行われることが報告されていた。しかし、これまで成長円錐で生じる細胞骨格の再編と細胞膜動態の関係は明確に示されていなかった。

### 2. 研究の目的

成長円錐の先端部はアクチン細胞骨格に富み、網目状のアクチン繊維がシートに広がったラメリポディア、アクチン繊維が束になったフィロポディアによって先端部を形作っている(図1)。一見すると、アクチン繊維が密に詰まっているような成長円錐の先端部でも多数の小胞が動いている様子を我々は以前から観察していた。そこで次の3つの疑問を明らかにするため、本研究を行った。1) 成長円錐先端部における小胞の挙動を明らかにする。2) 小胞の挙動とアクチン細胞骨格再編の関係を明らかにする。3) 小胞輸送を含む細胞膜動態とアクチン再編の両方に関わる分子を明らかにする。

### 3. 研究の方法

蛍光タンパク質(GFP, mCherry)で標識したアクチン、小胞膜タンパク質、エンドサイトーシス関連タンパク質を神経芽細胞種 NG108-15 細胞に発現させて、成長円錐における蛍光観察を行った。超解像顕微鏡(structured illumination microscopy; SIM)による蛍光観察にはツアイス ELYRA S.1、共焦点顕微鏡による全反射蛍光観察にはオリンパス FV1200 を使用した。抗体による免疫蛍光染色は 1%グルタルアルデヒドで固定した細胞を 0.1% Triton-X100 で膜透過処理を行ってから、1次抗体、2次抗体および蛍光ファロイジンと反応させた。

### 4. 研究成果

#### 成長円錐における小胞膜タンパク質の逆行性移動のメカニズム

小胞膜タンパク質の SCAMP1, SV2B, シナプトフィジン(Syp), VAMP2 をそれぞれ GFP 融合タンパク質として NG108-15 細胞に発現させて蛍光ライブイメージングを行った。成長円錐の先端部では、全ての小胞膜タンパク質が先端部の近くから生じて中心部へと移動する様子が高頻度で観察された。mCherry-actin を共発現させた観察では、小胞膜タンパク質がアクチン束と同一の速度で逆行性移動した。アクチン逆行性流動を阻害するミオシン 阻害剤 blebbistatin、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤 ML-7 のいずれでも

小胞膜タンパク質の逆行性移動速度が減少した。これらの結果から、成長円錐先端部から生じる小胞はアクチン逆行性流動によって移動することが明らかになった。

#### 超解像イメージングで明らかになった F-アクチン動態と小胞形成過程の関係

GFP で標識した小胞膜タンパク質と mCherry-actin を共発現した成長円錐を構造化照明法による超解像顕微鏡(SIM)で観察した結果、GFP-Syp の蛍光は先端部近傍で集積し、7割近くの Syp がアクチン束上またはアクチン束が形成される途中の構造(構造)の近傍から現れることを見出した(図1)。F-アクチンの束化は移動する細胞の先端部で頻発し、フィロポディアを形成する。成長円錐の前進に伴って生じるアクチン束化で局所的なエンドサイトーシスが誘導された結果、先端部から Syp 陽性小胞が出現するのではないかと考えた。

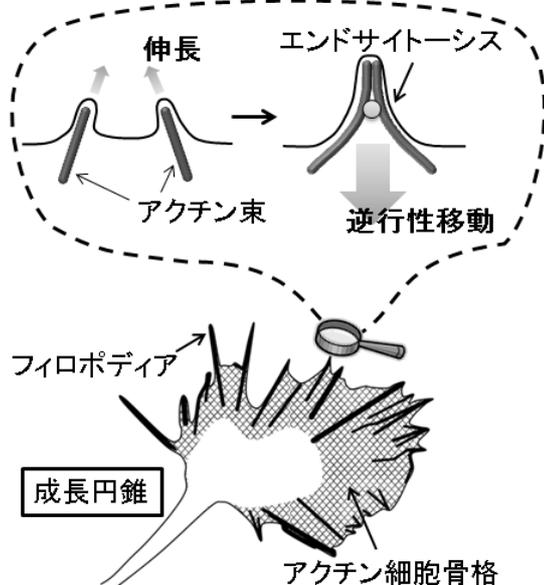


図1 先端部特異的な小胞形成過程とアクチン再編の関係

#### 成長円錐の小胞形成に関わるエンドサイトーシス経路の同定

クラスリン介在性エンドサイトーシス(CME)と小胞膜タンパク質の関係を調べた結果、ほとんどの小胞膜タンパク質が CLC と共局在したが、先端部近傍から生じる Syp だけは CLC と一致しなかった。細胞膜に直接結合して、膜を湾曲させる BAR ドメインタンパク質のエンドフィリンは元々 CME に関与する分子として知られていたが、クラスリン非依存性のエンドサイトーシス(CIE)にも関係することが最近報告された(Boucrot E. et al, 2015)。脳で高発現のエンドフィリン A3(Endo3)の分布を成長円錐で調べた結果、先端部付近で Syp と Endo3 が共局在した。同様に先端部付近で Syp とダイナミン 1(Dnm1)も共局在した。CME 阻害剤 Pitstop2 は Syp 小胞形成に影響しなかったが、Endo3 に対する

siRNA 導入細胞の成長円錐では、先端端から現れる Syp 陽性小胞の数が減少した。Dnm1 変異体 (K44A) の過剰発現は、成長円錐の Syp 動態に影響した。これらの結果は、成長円錐では CME と CIE の両経路による形質膜取り込みが行われており、主要な小胞膜タンパク質は CME 経路であるのに対して、Endo3, Dnm1 が介在する先端端の CIE によって Syp を選択的に取り込むことを示唆した。

### 成長円錐における 2 つのエンドサイトーシス経路の空間分布の違い

成長円錐における CME および CIE それぞれの分布を明らかにするため、CLC-GFP または Endo3-GFP 発現細胞の成長円錐を 3D-SIM で Z 軸方向 110nm 毎に断層撮影した。すると約 25% の CLC-GFP が成長円錐中心部の底面に局在したのに対して、Endo3-GFP の大部分が周辺領域の底面よりも高い位置に集積した。興味深いことに Endo3-GFP の分布は F-アクチンと似ており、両者の関係性が示唆された。細胞の接着面近傍だけを励起する全反射蛍光観察でも 3D-SIM の結果を支持するデータが得られた。

### エンドフィリン集積は F-アクチンの束化に依存し、神経軸索伸長に必要

CIE を誘導する先端端での Endo3 集積と F-アクチンの関係を明らかにするため、複数のアクチン重合阻害剤の影響を調べた。サイトカラシン D、Arp2/3 阻害剤 CK-666 のいずれも、先端端の Endo3 が消失した。アクチン束化因子のファシンに対する siRNA 導入細胞では、成長円錐の規則的な F-アクチン束が減少するだけでなく、Endo3 集積数も大幅に低下した。これらは F-アクチンの束化に連動して先端端で Endo3 集積が誘導されることを強く示唆する。

マウス大脳の初代培養神経細胞でも先端端近傍で F-アクチン束が形成される途中の構造と共に Syp の局在が見られた。Endo3 に対する siRNA を導入した神経細胞では軸索伸長が阻害されたことから、Endo3 による CIE が神経成長に必要であると考えられる。

### 成長円錐先端端で生じる CIE の役割

F-アクチン束化に伴う先端端の Endo3 集積は Syp 膜タンパク質を含んだ局所的な形質膜の取り込みを促すと考えられる。Syp と様々なマーカー分子の分布を比較した結果、2 種類のカーゴ候補分子が見つかった。1 つは神経極性に関係する膜タンパク質 GPM6a で、パルミトイル基の修飾で脂質ラフトに局在する。成長円錐のプロテオミクス解析で GPM6a は成長円錐膜に最も多い膜タンパク質の 1 つとして同定した (Nozumi M. et al, 2009)。GFP-GPM6a は成長円錐のフィロポディア先端に強く集積したが、細胞内に取り込まれる際、Syp と共局在した。第 2 の Syp と共局在した分子はコレステロール特異的プローブの

GFP-D4 である。D4 はウェルシュ菌が産生するシータ毒素のコレステロール結合ドメインで、培地中に GFP-D4 添加することで細胞膜のコレステロールを可視化できる。GFP-D4 も GPM6a 同様にフィロポディア先端に強く集積したが、細胞内で Syp と共局在した。Syp はコレステロールに結合することが報告されている (Thiele C. et al, 2000)。以上のことから、先端端から生じる Syp 小胞がコレステロールを含む脂質ラフトの細胞内取り込みに関与することが示唆された。

成長円錐が前進するとき、先端端のアクチン重合で伸長した F-アクチンが徐々に束化することで、フィロポディアを形成する。本研究によって、アクチン束化に依存して先端端近くに BAR ドメインタンパク質の Endo3 が集まり、Dnm1 と協調して局所的なエンドサイトーシスを誘導することが分かった (図 2)。その局所的なエンドサイトーシスによって形質膜上の Syp 小胞膜タンパク質と共に脂質ラフトが回収される。脂質ラフトには GPM6a だけでなく、複数の軸索ガイダンス受容体も局在する。成長円錐の前進に伴って非接着面で生じるエンドサイトーシスは、細胞外の神経成長・再生に関わる情報伝達分子を捉えるには効率の良いシステムであると考えられる。

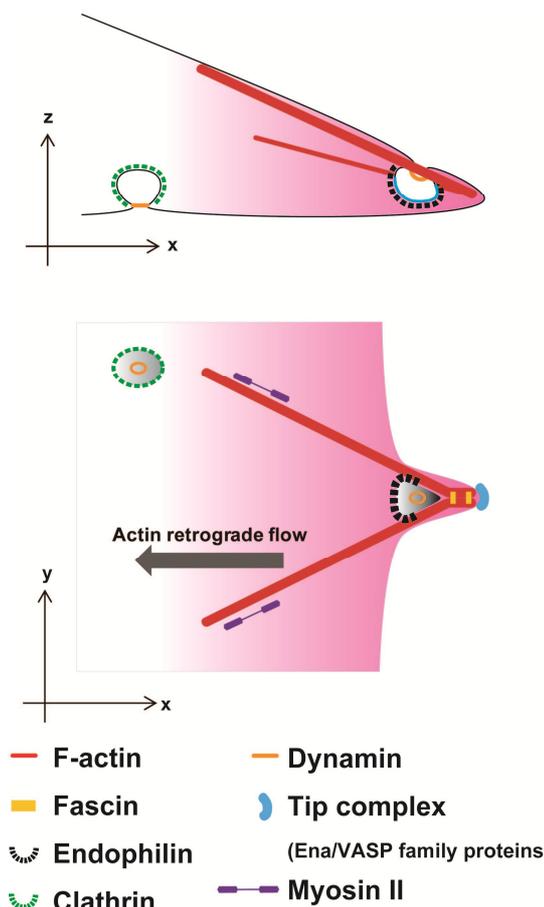


図 2 成長円錐先端部におけるアクチン束化に伴って誘導されるエンドサイトーシス

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Nozumi M, Igarashi M. Vesicular movements in the growth cone. *Neurochem Int.* 2017. pii: S0197-0186(17)30368-6. DOI: 10.1016/j.neuint.2017.09.011.

Honda A, Ito Y, Takahashi-Niki K, Matsushita N, Nozumi M, Tabata H, Takeuchi K, Igarashi M. Extracellular Signals Induce Glycoprotein M6a Clustering of Lipid Rafts and Associated Signaling Molecules. *J Neurosci.* 2017. 37(15):4046-4064. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3319-16.2017.

Nozumi M, Nakatsu F, Katoh K, Igarashi M. Coordinated Movement of Vesicles and Actin Bundles during Nerve Growth Revealed by Superresolution Microscopy. *Cell Rep.* 2017. 18(9):2203-2216. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.02.008.

[学会発表](計10件)

野住素広、五十嵐道弘 成長円錐のフィロポディア形成に伴うエンドサイトーシス 第38回日本神経科学大会 2015年  
野住素広、五十嵐道弘 成長円錐の先端端で生じるアクチン束形成に伴うエンドサイトーシス BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会) 2015年

Motohiro Nozumi, Michihiro Igarashi. Membrane retrieval synchronizes with the actin bundling in the growth cone. *Keystone Symposia; Axons: From Cell Biology to Pathology.* 2016年

野住素広、五十嵐道弘 構造化照明顕微鏡(SIM)観察で明らかになった神経成長時のアクチン再編とエンドサイトーシスの新しい関係 第89回日本生化学会大会 2016年

野住素広、五十嵐道弘 神経成長円錐の先端端におけるエンドサイトーシスはフィロポディア形成と関係する 第39回日本分子生物学会年会 2016年

Motohiro Nozumi, Michihiro Igarashi. The endocytosis coordinated with filopodial formation in the growth cone, revealed by superresolution microscopy. *EMBO Conference, Cell biology of the neuron: Polarity, plasticity and regeneration.* 2017年  
Motohiro Nozumi, Michihiro Igarashi. Superresolution reveals that nerve

growth is regulated by the coordinated interaction between endophilin-mediated endocytosis and F-actin. 第40回日本神経科学大会 2017年

Motohiro Nozumi, Michihiro Igarashi. Coordinated membrane retrieval with actin bundling in the growth cone revealed by superresolution microscopy. *Neuroscience 2017, Society for Neuroscience 2017年*

Motohiro Nozumi, Michihiro Igarashi. How to connect between the endocytosis and actin dynamics in the nerve growth. 2017年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) 2017年

野住素広、加藤薫、五十嵐道弘 神経突起の先端端で生じるアクチン依存性エンドサイトーシス 2018年生体運動研究合同班会議 2018年

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

ホームページ

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2/index.html>

新潟大学プレスリリース「伸びる神経突起先端の動きを超解像で可視化に成功しました」

<http://www.niigata-u.ac.jp/news/2017/29186/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

野住 素広(NOZUMI, Motohiro)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号:00420323