

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18500255
 研究課題名(和文) 成長円錐の自律的右ねじ回転運動の分子機構および神経回路構築における機能の解明
 研究課題名(英文) Molecular mechanism and functional role of the autonomous right-screw rotation of growth cone filopodia
 研究代表者
 玉田 篤史 (TAMADA ATSUSHI)
 独立行政法人理化学研究所・神経成長機構研究チーム・研究員
 研究者番号：60270576

研究成果の概要：本研究において、神経細胞の成長円錐が自律的に右ねじ方向に回転運動することを見出し、この回転運動にクラスⅤミオシン分子が関与することを明らかにした。さらに、成長円錐が右ねじ回転運動することが原因となり、2次元平面基質上で神経突起が右方向に旋回する現象が引き起こされることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：成長円錐、非対称性、回転運動、ミオシン

1. 研究開始当初の背景

申請者は細胞接着分子・拡散性分子による軸索および細胞誘導機構を研究してきたが、その過程で下の興味深い現象を見いだした。

神経細胞を3次元基質内に包埋して培養すると神経突起(軸索・樹状突起等)は直線的に伸びるが、2次元基質の上では右方向に弧を描くように伸びる。

この2次元基質上での右旋回運動という

現象は、「神経細胞は何も手がかりがないときはまっすぐに軸索を伸ばす」という暗黙のルールに従わないものであったが故に驚きであった。申請者はこれら2つの一見矛盾する現象を説明可能な以下のような仮説を立てた。

仮説：「成長円錐は突起の末端方向に対して右ねじの方向に自律的に回転運動する」

(成長円錐とは、神経突起の先端に存在し、環境を検知し突起を先導する構造である)

この仮説が正しければ、2次元基質上では回転運動に対する負荷が基質との接点でより大きくかかるために、ころがり運動を生じその結果旋回運動をすると説明できる。

15-17年度萌芽研究「神経細胞の非対称性運動の機能解析」において、仮説の検証を行った結果、成長円錐が右ねじ方向に回転する様子を可視化することに成功した。さらに解像度を上げて微細構造の観察を行った結果、成長円錐全体が回転するのではなく、先端のフィロポディア(糸状仮足)とよばれる構造体が独立して右ねじ方向に回転することが明らかとなった。また、回転運動には微小管ではなくアクチンフィラメントが関与することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、左右非対称な回転・旋回運動を引き起こす細胞・分子メカニズムを解明すると同時に、この現象の回路・個体レベルでの生物学的・機能的意義を解明することを目的とする。

(1) 成長円錐が右ねじ方向に回転する細胞・分子メカニズムの解明

フィロポディアを構成するアクチンフィラメントが回転運動に関与することが明らかとなったことから、アクチン分子およびそれと相互作用すると考えられるモーター分子であるミオシン分子を中心として解析を行う。アクチンフィラメントはフィロポディア内を逆行性に流動し(actin retrograde flow)、それにはミオシンが関与するとされている。また、ミオシンがアクチンフィラ

メントを駆動する際に、フィラメントが右または左にねじれることが in vitro の研究により明らかとなってきた。以上のことからアクトミオシン系の相互作用が回転に関与することが期待できる。ここではアクトミオシン系と回転運動の関連性を中心に研究を進める。

(2) 成長円錐の右ねじ回転運動および2次元平面での右旋回運動の機能的意義の解明

神経突起の右旋回性が実際の生体内でどの程度起きているのかということをはっきりと明らかにし、現象がみられた系で、回転旋回現象の神経回路形成に果たす機能について解析する。特に、回転運動、旋回運動といった細胞レベルでの左右非対称性は、回路あるいは個体レベルでの神経系の左右対称性を乱す要因になることから、神経系の非対称性の形成への関与を想定している。

3. 研究の方法

(1) 成長円錐が右ねじ方向に回転する細胞・分子メカニズムの解明

これまでの研究の成果により、海馬などの組織片の培養においてみられる神経突起の右旋回運動に、アクチン分子が関与することが示唆された。成長円錐のフィロポディア内の主要な細胞骨格はアクチンフィラメントであり、このアクチンフィラメントの末端部にアクチン分子が重合するとともに、フィラメント全体が成長円錐中央部に向かって逆行性に動いていることが知られており、この現象は actin retrograde flow と呼ばれている。この流れを生じさせるメカニズムとして、アクチンとモーター分子であるミオシンの相互作用が示唆されている。さらに、最近、インビトロの系において、ミオシン分子がア

クチンフィラメント上を直線的に移動するわけではなく、右螺旋を描くアクチンフィラメントの構造に合わせて、右螺旋あるいは左螺旋を描きながらフィラメントのプラス端あるいはマイナス端に向かって移動することが明らかにされた。

これらのことを考え合わせると、ミオシン分子が形質膜等に固定されている場合、アクチンフィラメントが retrograde flow する際に右あるいは左に回転することが想定され、これがフィロポディアを回転させる力となると説明できる。ミオシンにはいくつかのサブクラスが存在するが、その中でミオシン V がフィロポディアの右回転を生じる可能性を持つ。本研究では、まず、ミオシン分子の機能を阻害する薬剤により、回転運動が消失するかどうか検討する。また、個々のミオシン分子（特にミオシン V）の機能をドミナントネガティブ体の遺伝子導入、あるいは、RNAi 法により阻害し、回転運動に及ぼす影響を調べる。さらに、ミオシン分子を欠損したマウス（ミオシン V を欠損している Dilute-Lethal マウス等）を用いて回転運動に異常が生じているかどうか検討を行う。

(2) 成長円錐の右ねじ回転運動および 2 次元平面での右旋回運動の機能的意義の解明

本研究でもう 1 つの重要な問題は、「何のために回転運動をしているのか」ということ、すなわち、成長円錐の右ねじ回転運動およびそれにより引き起こされるであろう神経突起の右旋回運動がいったいどのような生物学的意味を持つのかという問題である。この問題に関して、まず、神経突起の右旋回性が実際の生体内でどの程度起きているのかということをも明らかにする必要がある。着目する系の 1 つとして、神経細胞の軸索あるいは先導突起が、他の細胞の軸索・樹状突起・放

射性グリア細胞等を伝って伸長・移動する系を想定している。このような系では、ちょうどつるが巻くように神経突起が別のプロセスに巻きついている可能性が高い。また、層構造をとっている領域（大脳皮質・小脳皮質など）においては、接着性の異なる層の境界面を走行する軸索はちょうど 2 次元基質上を走行するのと似たような状況になることから、右あるいは左方向に旋回運動する傾向が見られるものと推測される。

このようないくつかの系で実際に回転・旋回運動が見られたならば、これらの系に焦点をあてて、回転旋回現象の神経回路形成に果たす機能について解析する。実際には現象が認められる系を見つけてからでないとその機能の推定ははっきりとはできないところではあるが、現在のところ、最も注目していることとしては、神経系の非対称性形成の問題がある。回転運動、旋回運動といった細胞レベルでの左右非対称性は、回路あるいは個体レベルでの神経系の左右対称性を乱す要因になることから、神経系の非対称性の形成に、これらの現象が関与する可能性があり、これらの点に着目しながら解析を進めていく。

4. 研究成果

本研究では、成長円錐の右ねじ回転運動・神経突起の右旋回運動という左右非対称な運動特性に関して、1) 神経細胞の成長円錐がどのようなメカニズムによって回転するのか？、さらに、2) 成長円錐が回転運動し、神経突起が旋回運動することはこういった生物学的意味を持つのか、ということをも具体的な研究項目としている。これまでの研究により、成長円錐のフィロポディアが右ねじ方向に回転運動し、右ねじ方向に動くのは成長

円錐全体ではなく、個々のフィロポディアであることが明らかとなった。また、細胞骨格として微小管ではなくアクチンフィラメントがこの運動に関与することが明らかとなった。アクチン分子はミオシン分子との相互作用により力を発生することから、この相互作用が回転運動を生じされている可能性が考えられる。そこで、成長円錐内に存在するミオシン分子の機能を阻害することで、ミオシン分子の関与を探った。ミオシン分子ファミリーのうち、神経系で発現することが知られているミオシンVに着目した。アクチンフィラメントとの結合部位を含むヘッドドメインのみを発現するドミナントネガティブ体のcDNAを神経細胞に遺伝子導入したところ、成長円錐の回転運動が阻害されることが観察された。このドミナントネガティブ体による阻害効果は完全長のミオシンVの共発現によりレスキューされることもわかった。これらのことより、ミオシンVが成長円錐の回転運動に関与することが示唆される。さらに、ドミナントネガティブ体導入後の神経細胞の再凝集塊を二次元基質上で培養したところ、神経突起の右旋回性が減弱し、この減弱も完全長ミオシンVによりレスキューされた。また、フィロポディアの回転速度と二次元平面状での旋回の曲率に相関関係がみられた。以上のことより、二次元平面上での神経突起の右旋回性がミオシンVによる成長円錐の右回転運動に起因することが示唆される。

成長円錐の右ねじ回転運動および二次元平面での右旋回運動の機能的意義に関しては、これまでのところ機能を示唆する証拠は得られていないが、今後の研究で明らかにしていく予定である。

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)

[学会発表](計 3件)

玉田篤史

3次元培養で明らかになった成長円錐の新たな運動様式

第26回神経組織培養研究会、東京、2007年3月

玉田篤史、河瀬聡、村上富士夫、上口裕之

神経成長円錐のフィロポディアは自律的に右ねじ方向に回転運動する

第30回日本神経科学大会、東京、2007年9月

玉田篤史、河瀬聡、村上富士夫、上口裕之

3次元培養で明らかとなった成長円錐フィロポディアの右ねじ回転運動

第31回日本神経科学大会、東京、2008年7月

6. 研究組織

(1)研究代表者

玉田 篤史 (TAMADA ATSUSHI)

独立行政法人理化学研究所・神経成長機構研究チーム・研究員

研究者番号：60270576