

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19500335
 研究課題名（和文） 反発性軸索ガイダンスの仕組み：
 成長円錐での非対称性駆動力発生機構の解明
 研究課題名（英文） Mechanisms of repulsive axon guidance:
 Elucidation of asymmetric driving machinery in the growth cone
 研究代表者
 上口 裕之（KAMIGUCHI HIROYUKI）
 独立行政法人理化学研究所・神経成長機構研究チーム・チームリーダー
 研究者番号：10233933

研究成果の概要：脳神経系の神経回路網が作られるためには、神経細胞の突起（軸索）が正しい方向に伸びる必要がある。軸索の通り道に存在する様々な分子情報は、軸索の伸長方向を転換する（誘引あるいは反発）。本研究により、軸索先端部（成長円錐）での非対称的な形質膜の取り込みが軸索の反発を駆動する必要十分条件であることが示され、形質膜の取り込みを制御する分子機構も明らかになった。以上、神経回路網の構築に重要なメカニズムの一端が解明された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学 神経薬理学

キーワード：軸索、成長円錐、ガイダンス、カルシウム、形質膜、クラスリン、ダイナミン、エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

私たちの脳神経系の機能の中核を担う神経回路網は、発生段階の神経細胞の細胞体から伸長した軸索突起が標的細胞へと到達することにより構築される。神経回路網の形成機構を解明することは、一部の先天性脳奇形や精神神経疾患の発症機構の理解に貢献するとともに、損傷された神経回路の再構築を目指す再生医療に新たな戦略を提供する。伸長過程にある軸索突起の先端部は成長円錐と呼ばれ、その細胞外環境に存在する軸索ガ

イダンス分子を認識しつつ目的とする組織・細胞へ向かって移動する。成長円錐の形質膜上には、これらのガイダンス分子の受容体が存在しており、成長円錐を正しい方向へ誘導するための細胞内シグナルを生成する。このような細胞内シグナルとして細胞質カルシウムイオン（ Ca^{2+} ）が注目されており、ガイダンス分子の多くは Ca^{2+} シグナルを介して成長円錐の移動方向を制御する。すなわち、ガイダンス分子が成長円錐の受容体に左右非対称的に（片側でより多く）結合すると、

成長円錐細胞質にCa²⁺の濃度勾配が発生し、成長円錐は高Ca²⁺側に旋回（誘引）あるいは低Ca²⁺側に旋回（反発）する。このように、成長円錐を誘引するガイダンス分子も反発するガイダンス分子も、成長円錐局所での細胞質Ca²⁺濃度を高めることで軸索ガイダンスを誘起する。このことは、細胞質Ca²⁺シグナルは成長円錐を誘引することも反発することも可能であることを示している。申請者の研究チームは、成長円錐の旋回方向を切り替える仕組みを探索し、細胞質へのCa²⁺の流入経路が誘引と反発を決定する主要因であることを発見した。具体的には、(1) 3型リアノジン受容体(RyR3)を介する細胞内Ca²⁺ストアから細胞質へのCa²⁺放出(Ca²⁺-induced Ca²⁺ release; CICR)は成長円錐を誘引し、CICRを伴わないCa²⁺シグナルは成長円錐を反発すること、(2) RyR3の活性は、成長円錐を取り巻く細胞外環境および成長円錐細胞質サイクリックAMP濃度により制御されることを明らかにした。

次に、成長円錐ガイダンスを誘起するCa²⁺シグナル下流経路の探索を行ったところ、(1) 成長円錐を誘引するCa²⁺シグナルは、VAMP2陽性の細胞内膜小胞の前方輸送とエクソサイトーシスを左右非対称的に促進すること、(2) 成長円錐を反発するCa²⁺シグナルはVAMP2陽性膜小胞の動態に影響をおよぼさないこと、(3) このような膜小胞のエクソサイトーシスは、成長円錐誘引には必須であるが成長円錐反発には必要ないことを明らかにした。これまでの国内外の研究では、成長円錐を前進させるマシナリーの方向が左右逆転することにより、誘引と反発が引き起こされると考えられていた。しかし申請者らの研究成果は、成長円錐の誘引と反発は異なるマシナリーに依存することを示しており、成長円錐の誘引はVAMP2陽性膜小胞輸送の左右非対称性により駆動されることを実証した。したがって今後の研究課題として、成長円錐の反発性ガイダンスを駆動する仕組みを明らかにすることが重要である。軸索突起の反発は、神経回路網の形成過程だけでなく、損傷された神経軸索の再生不全にも関与する細胞応答であり、その駆動マシナリーを同定することは神経発生再生の学問分野に重要な知見を提供する。

2. 研究の目的

成長円錐での反発性Ca²⁺シグナルの下流で起こる非対称性駆動機構を同定し、反発性軸索ガイダンスの仕組みを解明する。

3. 研究の方法

発生段階のニワトリ脊髄後根神経節神経細胞の初代培養系を用いて実験を行った。既報(Ooashi et al., J Cell Biol 170: 1159-1167,

2005)の方法により成長円錐の片側でケージドCa²⁺を光解離し、非対称的な細胞質Ca²⁺シグナルを作製した。培養基質(ラミニン、L1)およびサイクリックAMPアナログ(Sp-cAMPS)によりRyR3の活性を操作し、ケージドCa²⁺光解離に伴うCICRの有無を制御することにより、成長円錐の誘引性旋回あるいは反発性旋回を誘起した。クラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスを阻害する各種薬剤存在下で成長円錐の旋回を誘起し、軸索ガイダンスにおける形質膜エンドサイトーシスの必要性を検証した。

生きた成長円錐での形質膜エンドサイトーシスを可視化するために、赤色蛍光蛋白を付加したダイナミン1および緑色蛍光蛋白を付加したクラスリンの遺伝子産物を作製し、成長円錐でのこれらの遺伝子産物の挙動を解析した。エバネッセント照明によりカバーガラスに接着する成長円錐形質膜の近傍のみを励起し、クラスリン被覆領域を単一ピット/小胞レベルで観察し、クラスリン依存性エンドサイトーシスの頻度を定量した。誘引性/反発性Ca²⁺シグナルを作製する前後でエンドサイトーシスの頻度を定量することにより、Ca²⁺シグナルによるエンドサイトーシスの制御を解析した。

既報(Tojima et al., Nat Neurosci 10: 58-66, 2007)の方法により、エンドサイトーシス/エキソサイトーシスに影響をおよぼす各種薬剤の微小濃度勾配を培養液中に作製し、成長円錐でのエンドサイトーシス/エキソサイトーシスを非対称化した。この成長円錐の移動方向を解析することにより、エンドサイトーシス/エキソサイトーシスの非対称化が旋回に十分であるか否かを検証した。

4. 研究成果

成長円錐の反発性旋回が形質膜エンドサイトーシスを必要とするか否かを明らかにするために、各種薬剤存在下で非対称的Ca²⁺シグナルを生成し、成長円錐の移動方向を定量した。図1に示すように、ラミニン基質上での反発性旋回は、クラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスの阻害剤(monodancylcadaverine (MDC), Myr-P4, TyrphostinA23)により抑制され、成長円錐は直進した。しかし、ラミニン基質上でSp-cAMPS存在下での誘引性旋回およびL1基質上での誘引性旋回は、エンドサイトーシス阻害剤による影響を受けなかった。この結果は、反発性Ca²⁺シグナルはクラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスを介して成長円錐の旋回を誘起するが、誘引性旋回はクラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスを必要としないことを示唆している。

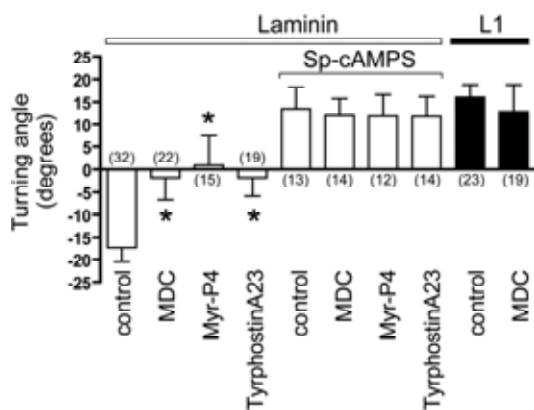


図1：成長円錐の反発性旋回はクラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスを必要とする。縦軸は成長円錐の旋回角度で、プラスは誘引、マイナスは反発を示す。
*Laminin 基質上 control と比較して $P < 0.05$

次に、成長円錐細胞質 Ca^{2+} シグナルがクラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスを制御するか否かを検証した。異なる波長特性の蛍光蛋白を付加したクラスリンおよびダイナミン1を発現する成長円錐をエバネッセント蛍光顕微鏡で観察したところ、クラスリン被覆ピットの形成・ダイナミン1の集積・クラスリン被覆小胞として細胞内への取り込みといった一連の過程を可視化することに成功した(図2)。

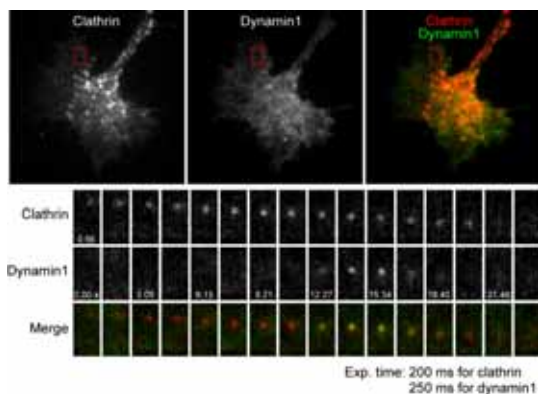


図2：成長円錐でのクラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスの可視化。クラスリン蛍光画像(赤)、ダイナミン1蛍光画像(緑)および重ね合わせ画像を示す。タイムラプス画像(図下、数字は秒)は、赤線で囲った領域の拡大像。

成長円錐の片側に反発性 Ca^{2+} シグナルを作製すると、シグナル側でのみエンドサイトーシスの頻度が高まった。しかし、成長円錐の片側に誘引性 Ca^{2+} シグナルを作製しても、エンドサイトーシスの頻度は変化しなかった。以上の結果から、反発性 Ca^{2+} シグナルは成長円錐でのクラスリン/ダイナミン依存性エ

ンドサイトーシスを非対称化することが判明した。

研究代表者らの過去の研究により、成長円錐での非対称性エキソサイトーシスが誘引性旋回を駆動することが明らかになっている。そこで、成長円錐でのエンドサイトーシス/エキソサイトーシスの非対称化が旋回を駆動するために十分であるか否かを検証した。クラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤(MDC, Myr-P4)の微小濃度勾配を作製して成長円錐でのエンドサイトーシスを非対称化すると、成長円錐は薬剤高濃度側に旋回した。エキソサイトーシス促進剤(α -latrotoxin)の微小濃度勾配を作製して成長円錐でのエキソサイトーシスを非対称化すると、成長円錐は薬剤高濃度側に旋回した。よって、成長円錐での膜動態の非対称性は旋回の駆動に十分であることが示された。

以上、成長円錐での反発性 Ca^{2+} シグナルの下流で起こる非対称性エンドサイトーシスを発見し、反発性軸索ガイダンスの駆動機構を解明した。

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 6件)

Ooashi N, Kamiguchi H: The cell adhesion molecule L1 controls growth cone navigation via ankyrin_B-dependent modulation of cyclic AMP. Neurosci Res (in press) 査読有り

秋山博紀、戸島拓郎、大芦典子、上口裕之: Ca^{2+} シグナルによる軸索ガイダンスの制御機構. 蛋白質 核酸 酵素 53: 157-163, 2008 査読なし

大芦典子、上口裕之: 神経リアノジン受容体の機能. Clinical Neuroscience 26: 122-123, 2008 査読なし

戸島拓郎、上口裕之: 誘引性・反発性軸索ガイダンスを制御するカルシウムシグナル. 実験医学 26: 1852-1858, 2008 査読なし

上口裕之: 成長円錐ガイダンス. 生体の科学 59: 428-429, 2008 査読なし

Kamiguchi H: The role of cell adhesion molecules in axon growth and guidance. Adv

Exp Med Biol 621: 95-103, 2007 査読有り

〔学会発表〕(計 9件)

Kamiguchi H: The role of Ca^{2+} signals in growth cone guidance. Topical Problems of Biophotonics-2007, Nizhny Novgorod, Russia, August 8, 2007

上口裕之: 成長円錐ガイダンスを制御する非対称性 Ca^{2+} シグナルと膜輸送. 第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同学会、横浜、2007年9月12日

Kamiguchi H: The role of Ca^{2+} signals in axon guidance. The 2nd Japan-Korea Neuroscience Symposium "Cutting Edge of Neuroscience", Yokohama, September 13, 2007

戸島拓郎、糸総るり香、上口裕之: 一酸化窒素による神経軸索ガイダンスの制御機構. 第27回神経組織培養研究会、東京、2007年10月13日

上口裕之: 神経接着分子とカルシウムシグナルによる軸索ガイダンスの制御機構. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007年12月11日

上口裕之: 軸索ガイダンスの分子機構. 第23回神経組織の成長・再生・移植研究会、幕張、2008年5月17日

戸島拓郎、秋山博紀、糸総るり香、上口裕之: カルシウムシグナルによる神経突起ガイダンスの制御機構. 第60回日本細胞生物学会大会、横浜、2008年6月29日

糸総るり香、戸島拓郎、上口裕之: 一酸化窒素による反発性神経軸索ガイダンスの制御. 第31回日本神経科学大会、東京、2008年7月9日

戸島拓郎、秋山博紀、糸総るり香、上口裕之: 神経軸索ガイダンスを駆動する成長円

錐での非対称性膜トラフィッキング. 第31回日本神経科学大会、東京、2008年7月10日

〔図書〕(計 3件)

Mori T, Inagaki N, Kamiguchi H: Neuronal Process Outgrowth. In: Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. (Ed) Mikoshiba K, Springer-Verlag, New York, NY, USA, vol 1 (in press)

Tojima T, Kamiguchi H: The driving machinery for growth cone navigation. In: Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. (Eds) Nixon R, Rao M, Springer-Verlag, New York, NY, USA, vol 13 (in press)

戸島拓郎、上口裕之: 神経軸索の伸長とガイダンス制御. シリーズ脳科学4「脳の発生と発達」岡本仁編集、東京大学出版会、東京、第4巻、pp141-185, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上口 裕之 (KAMIGUCHI HIROYUKI)
独立行政法人理化学研究所・神経成長機構研究チーム・チームリーダー
研究者番号: 10233933

(2) 研究協力者

戸島 拓郎 (TOJIMA TAKURO)
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: 00373332

糸総るり香 (ITOFUSA RURIKA)
独立行政法人理化学研究所・神経成長機構研究チーム・テクニカルスタッフ