

平成23年 5 月 31 日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2007～2010

課題番号： 19700302

研究課題名(和文)

マクロピノサイトーシスによる神経突起伸長の抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) The role of macropinocytosis in repulsive axon guidance

研究代表者

樺山 博之 (KABAYAMA HIROYUKI)

独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・客員研究員

研究者番号： 10332339

研究成果の概要(和文)：

反発性軸策誘導因子は、神経突端の先端にある成長円錐の退縮を引き起こし、間違った神経細胞とのシナプス形成を阻害し、正常な神経回路形成に重要な役割を果たす。しかし、成長円錐の退縮時の表面積減少の制御に関わる分子機構の実態は不明であった。この減少はマクロピノサイトーシスによる大規模な形質膜の回収に依存していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

Growth cone collapse is a crucial process for repulsive axon guidance and is accompanied by a reduction in growth cone surface area. This process of reduction may be regulated by endocytosis; however, its molecular mechanism is unclear. Macropinocytosis is a clathrin-independent form of endocytosis in which large areas of plasma membrane can be engulfed. We have reported previously that macropinocytosis is induced in growth cones of chick dorsal root ganglion neurons by semaphorin 3A (Sema3A), a repulsive axon guidance cue, and that Sema3A-induced reduction in growth cone surface area and macropinocytic vacuole area were correlated, suggesting a positive role for macropinocytosis in Sema3A-induced growth cone collapse. In the present study, we found that syntaxin 1B (Syx1B), a membrane trafficking protein, is a negative regulator of macropinocytosis, and its expression is downregulated by Sema3A signaling. Macropinocytosis inhibitor ethylisopropylamiloride or Syx1B overexpression suppressed Sema3A-induced macropinocytosis and growth cone collapse. These results indicate that Syx1B couples macropinocytosis-mediated massive internalization of the plasma membrane to Sema3A-induced growth cone collapse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,200,000	720,000	3,920,000

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：1、マクロピノサイトーシス、2、成長円錐退縮、3、反発性軸索誘導、4、syntaxin1B

## 1. 研究開始当初の背景

マクロピノサイトーシスは大規模な細胞膜の回収や細胞外液を飲み込む為の特殊なエンドサイトーシスで、微分干渉像でも観察が出来るほどの大きな vacuole (直径 0.2-5 $\mu$ m) を形成する。従来よく研究されてきたクラスリン依存性のエンドサイトーシスとは異なり、クラスリン非依存性であり、分子量 10kDa 以上の蛍光デキストランでラベルする事が出来る。クラスリン依存性エンドサイトーシスと異なり、その制御メカニズムや生理的役割については不明な点が多かった。しかし、ごく最近の研究で、数少ないマクロピノサイトーシス制御分子として知られる cdc42 などのドミナントネガティブ変異体などを用いることで、様々なウイルス (Vaccina virus, HIV-1, Echovirus etc., *Nature Cell Biol.* 2009. (11) p510-) のほ乳類動物細胞への侵入がマクロピノサイトーシス依存性であること、また、狂牛病の原因であるプリオン蛋白の繊維芽細胞への侵入や、膜透過性ペプチドである TAT などもマクロピノサイトーシスを介して細胞内へ取り込まれる事が明らかにされた。さらには、血管内皮細胞内へ取り込まれたマクロピノソーム同士が融合することが血管内腔形成に寄与する事も指摘されている (*Nature.* 2006. (442) p453-)。

以上から様々な生命現象にマクロピノサイトーシスが重要な役割を持つ事が明らかにされつつあり、幅広い研究分野において注目されている。しかし、神経細胞においてマクロピノサイトーシスが誘導されるか、あるいは生理的役割を持つかについてはこれまで全く注目もされておらず、明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

正しい神経回路が形成されるには、誘因性軸索誘導因子と反発性軸索誘導因子という 2 種類の因子が必須である。誘因性軸索誘導因子は、神経突起先端部分の成長円錐に働きかけ、正しい神経細胞へと成長を促し、シナプス形成を誘導する。逆に反発性軸索誘導因子は、成長円錐を退縮させることによって神経突起の伸長を止め、間違った神経細胞とのシナプス形成を阻害することが知られている。この成長円錐の退縮は、細胞膜表面積の減少を伴うが、そのしくみメカニズムはこれまで不明であった。本研究ではそのメカニズムを解

明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ニワトリ胚、背根神経節 (DRG) 神経細胞をポリ L リジン、ラミニンコートした 35 mm ガラスボトムディッシュにて培養し、タイムラプスイメージングにて成長円錐の観察を行った。

## 4. 研究成果

ニワトリ胚、背根神経節 (DRG) 神経細胞の成長円錐においてマクロピノサイトーシスが誘導される事を世界に先駆けて以下の様に明らかにし、報告した (Kabayama et al., *Mol. Cell. Neuroscience.* 2009)。

(1) 細胞内カルシウムが反発性軸索誘導に重要である事は既に従来の研究で明らかにされていたが、カルシウムがどのように反発性軸索誘導を起こすのかは不明であった。研究代表者は細胞内カルシウムストアのリアノジン受容体からのカルシウム放出によって、成長円錐に平均面積が 1.5  $\mu$ m<sup>2</sup> の vacuole が形成されること、この vacuole がマクロピノサイトーシスによるものであること、そして、典型的な反発性軸索誘導分子である semaphorin3A によってもマクロピノサイトーシスが誘導される事を明らかにした。

(2) さらに重要な事に、カルシウム上昇や semaphorin3A によって形成される vacuole 面積と成長円錐全体の膜面積は逆相関にあることを明らかにした。これは反発性軸索誘導に必須とされる成長円錐の退縮 (面積の減少を伴う) にマクロピノサイトーシスが寄与するというを示唆した初めての報告である。

(3) また、アクチン繊維の脱重合がカルシウム依存性のマクロピノサイトーシスに必須である事も示し、アクチン繊維の脱重合とそれに引き続くマクロピノサイトーシスによる大規模な細胞膜の回収が協調的に行われる事が成長円錐のコラプスに重要である事を示した。これは従来アクチン骨格系を中心とする研究と膜動態を中心とする軸索誘導研究を結ぶ全く新しい概念を報告した事で重要である。現在では研究代表者のこの報告を皮切りに、他の研究グループからも、成長円錐におけるマクロピノサイトーシス誘導を観察した論文が報告されるようになっており、注目を集めている。

さらに分子メカニズムと役割の解明のため、以下の理由により小胞輸送分子 syntaxin1 に注目した。突起先端の成長円錐にはレクチンである WGA でラ

ベルされる成長円錐小胞と呼ばれる小胞があり、これらの小胞が構成的にエクソサイトーシスすることで細胞表面積が増大し、その結果、突起伸長が達成されるという仮説が提唱されている。なぜなら成熟シナプスでエクソサイトーシスを正に制御している分子である syntaxin1, snap25 などは成長円錐にも発現しており、それら分子の抑制により、神経突起の伸長が抑制されることが分かっているからである。現在では多くのシナプスのエクソサイトーシスを正に制御する分子の抑制により、突起伸長が抑制されるという報告をした論文が数多くある。しかしながら、エクソサイトーシス関連分子の抑制により突起伸長が抑制される事が分かっても、成長円錐小胞の構成的エクソサイトーシスを阻害した結果、突起伸長が阻害されたかを示した報告は殆どなく、唯一の例外が syntaxin1 を神経毒により切断した場合である。この報告 (*J. Cell. Biol.* 1996. 134(1)p205-) は Neurotoxin C1 による syntaxin1 の切断によって、WGA ラベルされた小胞の構成的エクソサイトーシスが阻害されたとしている。しかも Neurotoxin C1 によって成長円錐で vacuole が形成されることも報告しており、この蓄積した vacuole の面積は突起伸長時の増大膜面積に匹敵することから、Neurotoxin C1 によってエクソサイトーシス出来なくなった膜面積増大に必要な小胞同士が融合しあつて vacuole を形成したという仮説が提唱されている。しかしながらメカニズムは今まで解明されていなかった。研究代表者が既に報告した成長円錐におけるカルシウムや semaphorin3A によるマクロピノサイトーシス依存性 vacuole との類似性から、Neurotoxin C1 による vacuole 形成もマクロピノサイトーシスによるものとの仮説を立て検証し、以下の発見をした。

(1) Neurotoxin C1 による vacuole 形成はマクロピノサイトーシスによって形成され、syntaxin1 がマクロピノサイトーシスの負の制御因子である。(2) semaphorin3A により、syntaxin1 発現が成長円錐で抑制される事も判明し、さらに syntaxin1 の過剰発現によって、semaphorin3A によるマクロピノサイトーシスが抑制され、成長円錐のコラプスも抑制される事も明らかとなった。さらに、(3) Neurotoxin C1 や semaphorin3A による成長円錐のコラプスはマクロピノサイトーシスの特異的阻害剤のアミロライドによりほぼ完全に抑制されることも明らかにした。

(*J. Neurosci.* 2011) . 現在世界中で行なわれている神経回路形成や神経再生研究のほとんどが、細胞外環境による細胞内骨格系分子の制御メカニズムに焦点をあてており、本研究で発見したマクロピノサイトーシスによる神経突起伸長の抑制メカニズム研究は極めて独創的である。その分子メカニズムの

解明は基礎科学的な神経回路形成メカニズムの解明のみならず今後は神経再生医学にも貢献できると考えられる。

## 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)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Kabayama H\*, Takeuchi M, Taniguchi M, Tokushige N, Kozaki S, Mizutani A, and Mikoshiba K. (\* corresponding author) Syntaxin 1B suppresses macropinocytosis and Sema3a-induced growth cone collapse. *The Journal of Neuroscience*. 2011 May;31(20):7357-7364 査読有り
  2. Tanaka S, Kabayama H\* Enomoto M, Saito N, Mikoshiba K. (\* corresponding author) Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor interacts with the SNARE domain of syntaxin 1B. *Journal of Physiological Sciences*. 2011 Mar 20. [Epub ahead of print] PMID: 21424589 査読有り
  3. Sasakawa N, Ohara-Imaizumi M, Fukuda M, Kabayama H, Mikoshiba K, Kumakura K. Dissociation of inositol polyphosphates from the C2B domain of synaptotagmin facilitates spontaneous release of catecholamines in adrenal chromaffin cells. A suggestive evidence of a fusion clamp by synaptotagmin. *Neuropharmacology*. 2011 Mar 24. [Epub ahead of print] PMID: 21402086 査読有り
  4. Kabayama H\*, Nakamura T, Takeuchi M, Iwasaki H, Taniguchi M, Tokushige N, Mikoshiba K. (\* corresponding author) Ca<sup>2+</sup> induces macropinocytosis via F-actin depolymerization during growth cone collapse. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2009 Jan;40(1):27-38. Epub 2008 Sep 11. 査読有り
  5. Kabayama H\* Tokushige N, Takeuchi M, Mikoshiba K. (\* corresponding author) Syntaxin 6 regulates nerve growth factor-dependent neurite outgrowth *Neuroscience Letters*. 2008 May 16;436(3):340-4. Epub 2008 Mar 26. 査読有り
- [学会発表] (計 2 件)
1. 榎山博之、中村健、竹内誠、岩崎広英、谷口雅彦、徳重直子、御子柴克彦  
Ca<sup>2+</sup> induces macropinocytosis via F-actin depolymerization during growth cone

- collapse 第36回 国際生理学会 2009年7月30日京都 国立京都国際会館
2. 樺山博之、中村健、竹内誠、岩崎広英、谷口雅彦、徳重直子、御子柴克彦  
**Ca<sup>2+</sup> induces macropinocytosis via F-actin depolymerization during growth cone collapse** 第32回 日本分子生物学会  
2009年12月12日  
横浜 パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

理化学研究所ホームページ

<http://www.riken.go.jp/r-world/info/release/press/2011/110518/index.html>

発生神経生物研究チームホームページ

<http://www.riken.go.jp/r-world/research/lab/nokagaku/develop/develop/index.html>

1

科学技術振興機構ホームページ

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20110518/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

樺山 博之 (KABAYAMA HIROYUKI)

独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・客員研究員

10332339

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者