

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03332

研究課題名(和文) 神経細胞の動態を制御する新機構：細胞内膜系から形質膜への脂質依存性シグナル伝達

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms underlying neuronal dynamic: Lipid-mediated signals from internal membrane to plasma membrane

研究代表者

上口 裕之 (Kamiguchi, Hiroyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・副センター長

研究者番号：10233933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経発生段階の誘引性軸索ガイダンスに必要な酸性リン脂質ホスファチジン酸の合成が脂質代謝酵素ホスホリパーゼDに依存することを示し、成長円錐(軸索先端部)の旋回を駆動するVAMP2陽性膜小胞に局在するホスホリパーゼDアイソフォームを同定した。VAMP2膜小胞が成長円錐形質膜に接近すると、接近部位に限局してホスホリパーゼD依存的にホスファチジン酸量が一時的に増加した。この形質膜領域へ、シンタキシン1A(酸性リン脂質結合ドメインを有する標的膜SNAREタンパク質)が集積し、VAMP2膜小胞のエキソサイトーシスを介して誘引性ガイダンスを引き起こすことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、神経回路の発生再生に中心的な役割を担う軸索ガイダンスを制御する新規メカニズムの解明を目的として、成長円錐の細胞質を軸索伸長方向へ移動する膜小胞が形質膜に及ぼす脂質シグナルを同定し、そのシグナルが形質膜局所での膜小胞エキソサイトーシスと成長円錐の先端端突出を促進する機序を明らかにした。生体内には未知の機能や構造を有する脂質が多数存在すると考えられ、本研究が示した細胞内オルガネラ間の脂質依存性シグナル伝達に類似のメカニズムが様々な細胞機能を制御している可能性が高いため、より普遍的な脂質生物学研究への波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：We showed that the synthesis of acidic phospholipid phosphatidic acid, which is required for attractive axon guidance during neural development, is dependent on the lipid metabolizing enzyme phospholipase D, and identified an isoform of phospholipase D on VAMP2-positive membrane vesicles that drive growth cone turning. When VAMP2 vesicles approach the growth cone plasma membrane, phosphatidic acid levels are transiently increased in a phospholipase D-dependent manner confined to the approach site. Syntaxin 1A, a target membrane SNARE protein bearing an acidic phospholipid-binding domain, accumulates in this plasma membrane region, mediating attractive guidance via exocytosis of VAMP2 vesicles.

研究分野：神経科学

キーワード：軸索ガイダンス 成長円錐 ホスホリパーゼD ホスファチジン酸 シンタキシン1A

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳神経系の発生過程において、神経細胞は適切な位置へ移動し、突起（軸索・樹状突起）を伸長して神経回路を構築する。本研究代表者らの先行研究により、細胞内膜系の輸送と神経細胞形態変化（特に、軸索の伸長と旋回）との間に時空間的相関および因果関係が証明され、内膜輸送が神経細胞の動態を制御するという概念が広く受け入れられるようになった。例えば、軸索先端部（成長円錐）における VAMP 7 陽性膜小胞の前方輸送および形質膜との融合（エキソサイトーシス）は軸索を伸長させ、VAMP 2 陽性膜小胞の成長円錐局所でのエキソサイトーシスは軸索を旋回させることが知られている。

それでは、細胞内膜と形質膜の相互作用はどのような仕組みで神経細胞の動態を制御するのであろうか？ シナプス小胞の開口放出の場であるアクティブゾーンを有するシナプス前部と異なり、成長円錐には SNARE 依存的膜融合に特化した形質膜領域が存在しない。したがって、成長円錐の先端端へ運ばれた膜小胞は、形質膜に働きかけて（例えば、形質膜の分子組成または機能を修飾することで）、膜小胞エキソサイトーシスが可能な状態に形質膜を変化させる必要があるが、この機序は不明である。生体膜は脂質二重層で構成され、神経細胞の形質膜（内葉と外葉の二重層から成る）にもグリセロリン脂質やスフィンゴ脂質などの多種多彩な脂質が存在する。これらの脂質は、生体膜微小環境あるいは膜タンパク質機能に大きな影響を及ぼし、細胞の極性や運動をコントロールする。

以上の学問的背景を踏まえ、細胞内膜と形質膜の相互作用を脂質依存性シグナルの視点で解き明かすことを目指した。脂質組成の異なる細胞内膜と形質膜が融合することによる受動的な形質膜脂質環境の変化ではなく、細胞内膜に存在する脂質代謝酵素が形質膜脂質環境を積極的に改変する仕組みを想定した。このようなメカニズムが明らかになれば、細胞内膜から形質膜へと伝達される新たな脂質シグナルが発見され、発生再生過程の神経細胞におけるエキソサイトーシス駆動型細胞動態制御の分子機構の理解が進み、より一般的な細胞生物学・脂質生物学分野への貢献も期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、神経回路構築に重要な役割を担う軸索ガイダンスを制御する新規メカニズムの解明を目的とし、成長円錐の細胞質内を軸索伸長方向へ移動する VAMP 2 陽性膜小胞が形質膜に及ぼす脂質シグナルを同定し、そのシグナルが形質膜局所での膜小胞エキソサイトーシスと成長円錐の先端端突出を促進する機序を明らかにする。軸索の誘引性ガイダンスを担う VAMP 2 陽性細胞内膜小胞に着目し、主として酸性リン脂質ホスファチジン酸合成に関与する脂質代謝について以下の研究を推進する：（1）軸索ガイダンスを担う細胞内膜小胞が運ぶ脂質代謝酵素の同定、（2）膜小胞による形質膜脂質代謝の時空間的解析と因果関係の証明、（3）形質膜脂質代謝が軸索ダイナミクスを制御する分子メカニズムの解明。以上の仕組みが明らかになれば、細胞内膜から形質膜へと伝達される新たな脂質シグナルが発見され、神経細胞におけるエキソサイトーシス駆動型細胞動態制御の分子機構の理解が進む。

### 3. 研究の方法

神経細胞でのホスファチジン酸合成を担う主要な酵素の一つ（ホスホリパーゼD）を対象として、ニワトリ胚から培養した脊髄後根神経節神経細胞での VAMP 2 陽性膜小胞への局在を解析し

た。この脂質代謝酵素とVAMP 2 を免疫二重染色した成長円錐を蛍光顕微鏡で共局在解析し、また生細胞における蛍光付加タンパク質（ホスホリパーゼDとVAMP 2）の共輸送を可視化することで、脂質代謝酵素のVAMP 2 膜小胞への局在を検証した。

次に、細胞外の誘引性ガイダンス分子（神経成長因子）によって巡回誘導された成長円錐を用いて、VAMP 2 陽性膜小胞が先端形質膜に接触する前後で、形質膜内葉のホスファチジン酸量の変化をエバネッセント顕微鏡で可視解析した。具体的には、VAMP 2 陽性膜小胞が成長円錐の形質膜近傍へ輸送されてエバネッセント場に出現するタイミングで、成長円錐に発現させた蛍光タンパク質付加ホスファチジン酸結合ペプチドのエバネッセント場における蛍光強度変化を追跡することで、形質膜内葉のホスファチジン酸を定量した。以上の方法を開発して、膜小胞輸送とホスファチジン酸量の時空間的な相関関係を明らかにするとともに、ホスホリパーゼD阻害薬を用いた実験により両者の因果関係を検証した。

さらに、形質膜脂質代謝が軸索ダイナミクスを制御する分子メカニズムを明らかにするために、VAMP 2 陽性膜小胞が形質膜脂質代謝を促進して、エキソサイトーシスが可能な状態に形質膜を変化させる仕組みを解析した。膜融合を担うSNAREタンパク質のうち、標的膜に存在するシンタキシン1Aは酸性リン脂質結合ドメインを有するため、シンタキシン1Aと酸性リン脂質ホスファチジン酸との相互作用を検証した。まず、この酸性リン脂質結合ドメインが神経成長因子による誘引性軸索ガイダンスに必要であるか否かを明らかにした。続いて、VAMP2陽性膜小胞の接近によりホスファチジン酸量が増加した形質膜領域へのシンタキシン1Aの集積を検証する目的で、野生型あるいは酸性リン脂質結合ドメインに変異を導入したシンタキシン1Aの動態をエバネッセント顕微鏡で定量的に解析した。以上のように、膜小胞が惹起する形質膜脂質代謝がエキソサイトーシスを引き起こす分子機構の解明を目指した実験を行った。

#### 4．研究成果

##### （1）軸索ガイダンスを担う細胞内膜小胞が運ぶ脂質代謝酵素の同定

ニワトリ胚から培養した脊髄後根神経節神経細胞を用いた研究により、成長円錐の形質膜内葉で産生される脂質ホスファチジン酸が、VAMP2（膜融合に関わるSNAREタンパク質）を含む膜小胞のエキソサイトーシスならびに軸索の誘引性巡回応答に必要であること示すデータを得た。また、薬理的阻害実験やRNA干渉法を組み合わせた実験を行い、成長円錐の誘引性巡回応答過程でのホスファチジン酸合成が脂質代謝酵素ホスホリパーゼDに依存することを示し、VAMP 2 陽性膜小胞と共局在するホスホリパーゼDアイソフォームを同定した。

##### （2）膜小胞による形質膜脂質代謝の時空間的解析と因果関係の証明

培養液中に形成した誘引性ガイダンス分子（神経成長因子）の微小濃度勾配によって巡回誘導されつつある成長円錐を用いて、形質膜内葉のホスファチジン酸を追跡した。具体的には、VAMP 2 陽性膜小胞が先端形質膜に近接する前後で、成長円錐細胞質に発現させた蛍光タンパク質付加ホスファチジン酸結合ペプチドをエバネッセント顕微鏡で観察し、エバネッセント場での蛍光シグナルを定量した。この方法で形質膜内葉のホスファチジン酸を追跡したところ、VAMP 2 陽性膜小胞が形質膜に近接した直後に、近接部位から約 1  $\mu\text{m}$ の領域に局限した一時的なホスファチジン酸量の増加を検出することに成功した。以上の方法により、膜小胞輸送とホスファチジン酸量の時空間的な相関関係を明らかにし、さらにホスホリパーゼD阻害薬を用いた実験により両者の因果関係を証明した。

### (3) 形質膜脂質代謝が軸索ダイナミクスを制御する分子メカニズムの解明

標的膜SNAREタンパク質のうち、シンタキシン1Aはホスファチジン酸などの酸性リン脂質と結合するドメインを有するため、ホスファチジン酸量の増加に応答して膜融合を担うタンパク質としてシンタキシン1Aに着目した。神経細胞のシンタキシン1Aをロックダウンすると、その成長円錐は神経成長因子に応答せず誘引性ガイダンスを示さなくなった。野生型シンタキシン1Aはこの軸索誘引応答をレスキューしたが、酸性リン脂質結合ドメインに変異を有するシンタキシン1Aはこの応答をレスキューできないこと、すなわちシンタキシン1Aとホスファチジン酸との結合が誘引性ガイダンスに必要であることを示唆するデータを得た。続いて、成長円錐に発現する蛍光タンパク質付加シンタキシン1Aをエパネッセント顕微鏡で定量的に解析し、VAMP2陽性膜小胞の接近によりホスファチジン酸量が増加した形質膜領域へシンタキシン1Aが集積することを示した。この実験を、酸性リン脂質結合ドメインを欠損した蛍光タンパク質付加シンタキシン1Aを用いて行い、シンタキシン1Aの集積には酸性リン脂質結合ドメインが必要であることを明らかにした。以上のように、膜小胞が惹起する形質膜脂質代謝がエキソサイトーシスを引き起こす分子機構を明らかにし、軸索ガイダンスを駆動する新規脂質シグナルを同定した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Guy AT, Kamiguchi H	4. 巻 66
2. 論文標題 Lipids as new players in axon guidance and circuit development.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Curr Opin Neurobiol	6. 最初と最後の頁 22-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.conb.2020.09.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Carmen Chan, Noriko Ooashi, Hiroki Akiyama, Tetsuko Fukuda, Mariko Inoue, Toru Matsu-ura, Tomomi Shimogori, Katsuhiko Mikoshiba, Hiroyuki Kamiguchi	4. 巻 23
2. 論文標題 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 3 Regulates Neuronal Growth Cone Sensitivity to Guidance Signals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.100963	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Michiko Shirane, Hiroyuki Kamiguchi	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular machinery regulating organelle dynamics during axon growth and guidance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Semin Cell Dev Biol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcdb.2022.02.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Tomonobu Hida, Tatsuya Mori, Hiroyuki Kamiguchi
2. 発表標題 The roles of phospholipid signaling in axon guidance
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ooashi N, Chan C, Akiyama H, Matsuura T, Shimogori T, Mikoshiba K, Kamiguchi H
2. 発表標題 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 3 Regulates Neuronal Growth Cone Sensitivity to Guidance Signals
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and The 62nd Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hida T, Mori T, Kamiguchi H
2. 発表標題 Functional analysis of phospholipid metabolites in axon guidance
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and The 62nd Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hida T, Mori T, Kamiguchi H
2. 発表標題 Functional analysis of phosphatidic acid in exocytosis that regulates axon guidance.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 CJK第1回国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------