

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20700302
研究課題名（和文）
反発性軸索ガイダンスを駆動する成長円錐での非対称性エンドサイトーシス
研究課題名（英文）
Asymmetric endocytosis across the growth cone drives repulsive axon guidance
研究代表者
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

研究成果の概要（和文）：

神経回路形成中の軸索先端部に現れる成長円錐は、細胞外環境に存在する軸索ガイダンス因子に誘引・反発されることで標的まで辿り着く。本課題では、成長円錐の反発を駆動する分子メカニズムを解析した。反発性ガイダンス因子に遭遇した成長円錐では、クラスリン依存性エンドサイトーシス頻度の左右非対称が観察され、この非対称性エンドサイトーシスが反発性旋回の駆動力を提供していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The neuronal growth cone navigates the axon along the correct path by sensing extracellular attractive and repulsive guidance cues. In this project, we investigated a driving mechanism of growth cone repulsion. We showed that the activity of clathrin-mediated endocytosis becomes polarized in growth cones and that such asymmetry in endocytosis is required and sufficient for repulsive growth cone guidance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
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・神経科学一般

キーワード：神経成長円錐，軸索ガイダンス，クラスリン依存性エンドサイトーシス，ダイナミン1，カルシウム，カルシニューリン，全反射蛍光顕微鏡法，ケージド化合物光解離法

1. 研究開始当初の背景

発生中の神経軸索先端部に現れる成長円錐は、細胞外微小環境に呈示される多種多様な誘引性/反発性軸索ガイダンス因子の濃度勾配を感知し、それに応じて自身の運動性を変化させることで遠隔の標的までの経路を正しく選択する。軸索ガイダンス因子は、成長円錐を引き寄せる作用を持つ「誘引因子」と、成長円錐を遠ざける作用を持つ「反発因子」に大別されるが、どちらの場合も、ガイダンス因子を受容した側に発生するカルシウムシグナルが、成長円錐の旋回運動を誘発する十分条件であることがよく知られている。申請者の所属研究グループでは、誘引・反発の決定が流入するカルシウムチャンネルの種類に依存することを明らかにしている(Ooashi et al., *J Cell Biol.* 170: 1159-1167. 2005)。すなわち、小胞体ストアからのカルシウム放出は誘引性旋回を誘発し、小胞体からのカルシウム放出を伴わないカルシウムシグナルは反発性旋回を誘発する。さらに申請者らは、カルシウムシグナル下流において旋回運動を制御するメカニズムを解析し、成長円錐内での微小管依存性膜小胞輸送およびVAMP2依存性エクソサイトーシスの左右非対称により「誘引性」旋回が誘発されることを明らかにした(Tojima et al., *Nat Neurosci.* 10: 58-66. 2007)。すなわち誘引性旋回は、成長円錐の新たな進行方向に向かって選択的に膜成分を供給するという極めてシンプルな機構により駆動されていることが明らかになっている。しかし興味深いことに、「反発性」旋回には膜小胞輸送およびエクソサイトーシスは寄与しておらず、このことから、成長円錐の誘引と反発は全く異なるメカニズムによって駆動されていることが強く示唆されたが、反発性旋回を司るメカニズムはこれまで解明されていなかった。

2. 研究の目的

上述のように、誘引性旋回にはカルシウムシグナルが生じた側での形質膜成分追加(エクソサイトーシス)が必要であることから、反発性旋回では逆にカルシウムシグナル側の形質膜成分を取り除く機構(エンドサイトーシス)が働いている可能性が考えられた。そこで本研究課題では、「反発性」軸索ガイダンスの駆動メカニズムとして、成長円錐におけるクラスリン依存性エンドサイトーシスの関与を明らかにすることを目的とした。具

体的には、(1)クラスリン依存性エンドサイトーシスが反発性旋回に必要な十分かどうか、(2)反発性旋回を誘発するカルシウムシグナルが、成長円錐においてクラスリン依存性エンドサイトーシスの左右非対称を誘発するかどうかを検証した。

3. 研究の方法

(1)薬理的阻害剤またはドミナントネガティブ変異体発現によりクラスリン依存性エンドサイトーシスを阻害し、ケージドカルシウム光解離法または生理的ガイダンス因子の微小濃度勾配により誘発された成長円錐の誘引性・反発性旋回運動に対する影響を解析した。

(2)成長円錐の片側でエンドサイトーシスを阻害し、エンドサイトーシスの非対称性が旋回運動の十分条件になりうるかどうかを検証した。

(3)全反射蛍光顕微鏡を用いて、成長円錐におけるクラスリン依存性エンドサイトーシスを時空間的に検出・定量化し、旋回を誘発するカルシウムシグナルがエンドサイトーシスの非対称性に与える影響を解析した。クラスリン依存性エンドサイトーシスが起きる際、まず形質膜直下へのクラスリン集積によりクラスリン被覆ピットが形成され、その後さらにダイナミン1が集積することで被覆ピットが形質膜から切り離され細胞質中に遊離する。全反射蛍光顕微鏡では、ガラス基質のごく近傍に存在する蛍光分子のみが励起されるため、基質接着面の形質膜直下に集積したダイナミン1とクラスリン被覆ピットは粒状のシグナルとして観察されるが、エンドサイトーシスにより細胞質中に遊離したクラスリン被覆小胞由来のシグナルは観察領域から外れて検出されない。そのため、蛍光タイムラプス像におけるクラスリンおよびダイナミン1の粒状シグナル消失を指標として、エンドサイトーシスを単一小胞レベルで時空間的に検出・定量できる。

4. 研究成果

平成20年度は、まず培養ニワトリ胚脊髄後根神経節細胞の成長円錐に対してケージドカルシウム光解離法を適用することで誘引性および反発性旋回を誘発し、これらに対する各種エンドサイトーシス阻害剤の効果を検証した。モノダンシルカダベリン、ダイナミン阻害ペプチド、tyrphostin A23を処理したところ、どの薬剤も誘引性旋回には効果が無く、反発性旋回は阻害された。同様に、クラスリン依存性エンドサイトーシスを阻害することが知られているドミナントネガティブ変異体(AP180のC末端断片、ダイナミン1 K44A)を神

経細胞に発現させ、旋回運動に対する効果を解析したところ、両者とも誘引性旋回には効果が無く、反発性旋回は阻害された。続いて、生理的ガイダンス因子（Sema3A, Myelin-associated glycoprotein）を微小ガラス管からパルス状に放出させることで人工的に細胞外微小濃度勾配を作り出し、これによって誘発される成長円錐の誘引・反発に対するエンドサイトーシス阻害剤の効果を検証した。その結果、ガイダンス因子に対する反発は阻害され、誘引には効果がなかった。これらの結果により、成長円錐の誘引性旋回にはエンドサイトーシスは寄与せず、反発性旋回にはエンドサイトーシスが必要であることが証明された。

続いて、微小ガラス管を用いて上記の薬理的エンドサイトーシス阻害剤を成長円錐の片側に作用させたところ、成長円錐は阻害剤濃度の高い方向へ旋回した。さらに、エクソサイトーシス促進剤である α -ラトロトキシンの濃度勾配に対して成長円錐は誘引された。この結果から、成長円錐におけるエンドサイトーシス/エクソサイトーシスの非対称性が旋回運動の十分条件になりうるということが証明された。

平成 21 年度は、旋回運動誘発時における成長円錐内でのクラスリン依存性エンドサイトーシス頻度の左右非対称性を検証した。まず蛍光タンパク質標識されたクラスリンおよびダイナミン 1 遺伝子コンストラクトを培養神経細胞に導入・発現させ、両者の挙動を多波長全反射蛍光顕微鏡により観察することでクラスリン依存性エンドサイトーシスを可視化した。その上で、ケージドカルシウム光離法により成長円錐片側で反発性カルシウムシグナルを誘発したところ、カルシウムシグナル側でクラスリン依存性エンドサイトーシスの頻度が上昇した。この非対称性エンドサイトーシスは、エンドサイトーシス阻害剤およびカルシニューリン阻害剤処理によって消失した。一方で、誘引性カルシウムシグナルではエンドサイトーシスの非対称性は誘発されなかった。さらに、反発性ガイダンス因子 Sema3A の濃度勾配に遭遇した成長円錐においても同様の非対称性エンドサイトーシスが観察された。これらの結果から、反発性ガイダンス因子はカルシウム-カルシニューリンを介してクラスリン依存性エンドサイトーシスを促進し、その結果として成長円錐の反発性旋回が駆動されることが証明された。

以上のように、本研究課題の期間内に全ての研究目標は達成され、形質膜成分の追加と除去のバランスという極めてシンプルな機構により成長円錐の誘引と反発が駆動されることが明らかになった。この研究成果は国内外の学会および国際雑誌において発表された。

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 5 件)

- 1) **Takuro Tojima**, Rurika Itofusa, Hiroyuki Kamiguchi. (2010) Asymmetric clathrin-mediated endocytosis drives repulsive growth cone guidance. *Neuron* 66:370-377. (査読有り)
- 2) **Takuro Tojima**, Rurika Itofusa, Hiroyuki Kamiguchi. (2009) The nitric oxide-cGMP pathway controls the directional polarity of growth cone guidance via modulating cytosolic Ca^{2+} signals. *Journal of Neuroscience* 29:7886-7897. (査読有り)
- 3) Kenji Amano, Morimitsu Fujii, Satoru Arata, **Takuro Tojima**, Masaharu Ogawa, Noriyuki Morita, Atsushi Shimohata, Teiichi Furuichi, Shigeyoshi Itoharu, Hiroyuki Kamiguchi, Julie Korenberg, Akiko Arata, Kazuhiro Yamakawa. (2009) DSCAM deficiency causes loss of pre-inspiratory neuron synchronicity and perinatal death. *Journal of Neuroscience* 29:2984-2996. (査読有り)
- 4) **戸島拓郎**, 上口裕之. (2008) 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. (査読無し)
- 5) 秋山博紀, **戸島拓郎**, 大芦典子, 上口裕之. (2008) カルシウム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* 53:153-163. (査読無し)

[学会発表] (計 8 件)

- 1) **戸島拓郎**, 糸総るり香, 上口裕之. 神経成長円錐ガイダンスにおけるクラスリン依存性エンドサイトーシスの役割. 第62回日本細胞生物学会大会, 大阪, 2010.5.19
- 2) **Takuro Tojima**, Rurika Itofusa, Hiroyuki Kamiguchi. Asymmetric endocytosis drives growth cone repulsion downstream of Ca^{2+} signals. 39th Annual Meeting Society for Neuroscience, Chicago, USA, 2009.10.18
- 3) Rurika Itofusa, **Takuro Tojima**, Hiroyuki Kamiguchi. The role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in switching the directional polarity of growth cone guidance. 39th Annual Meeting Society for Neuroscience, Chicago, USA, 2009.10.18

- 4) 戸島拓郎, 糸総るり香, 上口裕之. 反発性成長円錐ガイダンスにおける非対称性エンドサイトーシスの関与. 第 32 回日本神経科学大会, 名古屋, 2009.9.17
- 5) 戸島拓郎, 糸総るり香, 上口裕之. 成長円錐局所エンドサイトーシスによる反発性軸索ガイダンス制御. 第 61 回日本細胞生物学会大会, 名古屋, 2009.6.3
- 6) 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ク. 第31回日本神経科学大会, 東京, 2008.7.10 (シンポジウム)
- 7) 糸総るり香, 戸島拓郎, 上口裕之. 一酸化窒素による反発性軸索ガイダンスの制御. 第 31 回日本神経科学大会, 東京, 2008.7.9
- 8) 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, 2008.6.29 (シンポジウム)

[図書] (計 1 件)

- 1) 戸島拓郎, 上口裕之. (2008) 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* (東京大学出版会, 東京), 岡本仁(編) pp. 141-185.

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者