

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300137

研究課題名(和文) リゾリン脂質による神経回路の発生再生制御機構

研究課題名(英文) Regulation of neuronal circuit development and regeneration by lysophospholipids

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・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：10233933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：脂質は多様な物理化学的性状を有し、タンパク質の働きでは説明できない生理機能を担うことが推察される。本研究では、発生段階の脊髄内の限局した領域でグリア細胞が産生・放出する新たな脂質LysoPtdGlcを発見した。LysoPtdGlcは、脊髄で痛覚と固有感覚を担う軸索を分別することで、感覚神経回路の構築に重要な役割を担う。さらに、LysoPtdGlcの受容体であるGタンパク質共役型受容体GPR55を同定し、LysoPtdGlcあるいはGPR55の阻害により痛覚と固有感覚の軸索が混線することを示した。本研究により、グリアと神経細胞間の情報伝達を担う新たな脂質とその生理機能が解明された。

研究成果の概要(英文)：Lipids exhibit vast physicochemical diversity and may participate in biological processes inaccessible to protein-based mechanisms. Here we identify lyso-phosphatidyl- β -D-glucoside (LysoPtdGlc), a novel hydrophilic glycerophospholipid that is synthesised and released by radial glia in a patterned spatial distribution. LysoPtdGlc regulates the development of sensory circuits in the vertebrate spinal cord by sorting nociceptive and proprioceptive afferents at a previously unexplained axon segregation checkpoint. The G protein-coupled receptor GPR55 is a high-affinity receptor for LysoPtdGlc, and GPR55 deletion phenocopies LysoPtdGlc loss-of-function in vivo, misdirecting nociceptive axons into proprioceptive zones. This study demonstrates LysoPtdGlc/GPR55 as a crucial mediator of glia-neuron communication for axon spatial patterning and suggests a broader role for lipids in coordinating diverse biological functions.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：脊髄 感覚神経 軸索ガイダンス グリセロリン脂質 Gタンパク質共役型受容体

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の細胞体から伸長した軸索突起が標的とシナプスを形成することで神経回路が構築される。伸長過程にある軸索の先端部(成長円錐)は、細胞外環境に存在するガイダンス分子を認識し、軸索を正確な方向へ誘導・牽引する。他の細胞から産生・放出されたガイダンス分子は、成長円錐に発現する受容体に結合して軸索の伸長速度と方向を制御する。国内外の過去20年間の研究により、軸索ガイダンス分子および受容体として機能する数多くのタンパク質が同定され、その作用機序の解明も進んだ(引用文献)。しかし、これまでに同定されたガイダンス分子のほぼ全てはタンパク質であり、非タンパク性因子による軸索ガイダンスは見逃されてきた。脂質は細胞膜を構成する主要分子であり細胞間情報伝達の重要な媒体となりうるが、生物学的実験手法のみでは解析が困難であるなどの理由で研究が立ち遅れていた。研究代表者らは、有機化学など異分野との連携研究を遂行し、細胞外に放出されたリゾリン脂質が軸索の伸長方向を制御することを発見し、タンパク性因子のみでは説明不可能な軸索ガイダンス機構の存在を示唆する実験結果を得ていた。脂質とその受容体を対象とした本研究を進展させることは、神経回路の発生再生に関する学問分野へ大きく貢献するものと期待されていた。

2. 研究の目的

発生段階の神経組織において、リン脂質 Phosphatidylglucoside (PtdGlc) と Lysophosphatidylglucoside (LysoPtdGlc) および LysoPtdGlc 受容体である G タンパク質共役型受容体 GPR55 の発現と局在を解析し、LysoPtdGlc が軸索ガイダンス分子として機能しうる部位を探索する。GPR55 ノックアウトマウスの脊髄を解析し、神経回路の構築異常の有無を検証する。さらに、分散培養系を用いた実験を行い、LysoPtdGlc の軸索ガイダンス活性を定量する。また、GPR55 下流のシグナル伝達経路を探索し、LysoPtdGlc による軸索ガイダンスの細胞内分子機構の解明を目指す。以上、中枢神経系の発生過程における新規リゾリン脂質 LysoPtdGlc の役割とその作用機序を明らかにし、神経回路の再生過程に LysoPtdGlc/GPR55 が関与することの傍証を得ることを主たる研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脊髄での PtdGlc 産生細胞の同定。

発生段階の脊髄の組織切片および脊髄から分離培養した増殖性の細胞を用いて、一般的な間接抗体法で二重染色を行った。抗 PtdGlc 抗体および神経細胞/グリア細胞の各種マーカー抗体を使用した。

(2) GPR55 ノックアウトマウスの培養神経細胞を用いた軸索ガイダンスアッセイ。

野生型あるいは GPR55 ノックアウトマウス由

来の TrkA 陽性後根神経節神経細胞を培養し、成長円錐の片側の培養液中にガイダンス分子 (LysoPtdGlc など) の濃度勾配を作製し、このガイダンス分子濃度勾配が誘発した成長円錐の旋回角度を定量した。各種阻害剤の培養液中への添加、阻害ペプチドの細胞内導入、RNA 干渉法を組み合わせ、本実験を行った。

(3) GPR55 ノックアウトマウスの脊髄感覚神経回路の解析。

野生型あるいは GPR55 ノックアウトマウスの後根神経節に脂質親和性蛍光プローブ DiI を注入して、痛覚神経軸索および固有感覚神経軸索を選択的に標識し、脊髄内での各感覚神経軸索の走行様式を解析した。また脊髄切片を、痛覚神経軸索と固有感覚神経軸索に特異的なマーカー (それぞれ TrkA と TrkC) で免疫染色し、感覚神経軸索の走行を解析した。

4. 研究成果

(1) 脊髄での PtdGlc 産生細胞の同定。

発生段階の脊髄の組織切片を免疫染色で解析した結果、PtdGlc は脊髄背側に限局して発現し、放射状グリア細胞のマーカーである transitin と共局在した (図 1)。しかし脊髄組織切片において、PtdGlc は神経細胞マーカーである NeuN とは共局在しなかった。脊髄から分散培養した細胞を用いて二重染色を行った結果も同様であった。以上の実験結果から、脊髄背側の放射状グリア細胞が PtdGlc を産生し LysoPtdGlc を放出することが示唆された。

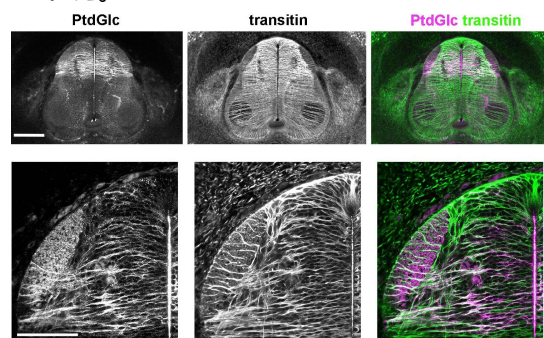


図 1 脊髄での PtdGlc (マゼンタ色) および transitin (緑色) の局在。下段はそれぞれ上段の拡大像。スケールバーは 100 μm に相当。

(2) GPR55 ノックアウトマウスの培養神経細胞の解析。

GPR55 遺伝子を欠損するノックアウトマウスを実験材料として、このマウスの脊髄後根神経節から分散培養した神経細胞に対する LysoPtdGlc の軸索ガイダンス活性を定量的に評価した。野生型あるいは GPR55 ノックアウトマウスの後根神経節神経細胞を神経成長因子存在下で培養し、得られた痛覚神経軸索の成長円錐近傍に各種ガイダンス分子 (LysoPtdGlc、Lysophosphatidylinositol、Lysophosphatidic acid、Semaphorin 3A) の濃度勾配を作製し、成長円錐の旋回角度を測

定した。いずれのガイダンス分子も野生型の成長円錐を反発した。GPR55 ノックアウトマウスの成長円錐は LysoPtdGlc には応答しなかったが、他のガイダンス分子には応答して反発方向に旋回した。LysoPtdGlc が痛覚神経軸索を反発するのは対照的に、neurotrophin-3 存在化で培養した固有感覚神経軸索は LysoPtdGlc 濃度勾配に応答せず直進した。以上、GPR55 は LysoPtdGlc による痛覚神経軸索ガイダンスを特異的に媒介する受容体であることが判明した。

次に、GPR55 下流シグナルを解析した。各種 G 蛋白質阻害ペプチド ($G\alpha$ 蛋白質のカルボキシ末端) を導入した神経細胞の LysoPtdGlc に対する応答性を定量した結果、G 蛋白質 ($G\alpha 13$) が GPR55 に共役し軸索の方向転換に必要であることが判明した (図 2)。さらに RNA 干渉法あるいは G 蛋白質キメラを用いた実験により、GPR55 は $G\alpha 13$ を介して細胞内シグナルを生成することが明らかになった。さらに、G 蛋白質下流のエフェクターを同定するために各種薬理的阻害剤の存在下で軸索ガイダンスアッセイを行った。アクチン骨格制御因子である Rho と Rho キナーゼの阻害剤 (それぞれ CT04 と Y-27632) 存在下では、LysoPtdGlc は痛覚神経軸索を反発しなかったことから、これらのエフェクターの関与が強く示唆された。以上の実験結果を総合的に判断し、GPR55 は $G\alpha 13$ -Rho 経路を介して神経軸索を反発すると結論づけた。

一般的に成長円錐細胞質でのカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度上昇が軸索ガイダンスを誘起するシグナルであることが知られているため、LysoPtdGlc による軸索ガイダンスにおける Ca^{2+} シグナルの関与を検証した。各種 Ca^{2+} チャンネル阻害剤の存在下で軸索ガイダンスアッセイを行った結果、LysoPtdGlc は L, N, P/Q タイプチャンネルを通る細胞外からの Ca^{2+} 流入を介して軸索を反発することが明らかになった。

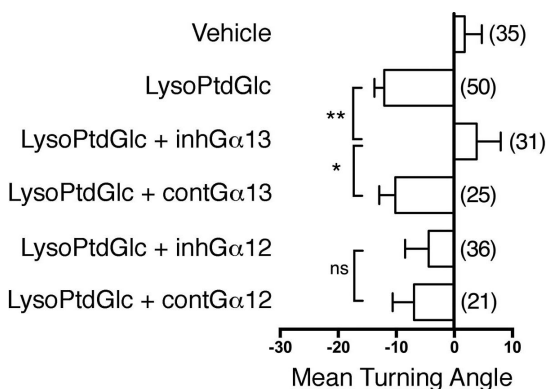


図 2 LysoPtdGlc による痛覚神経軸索の反発。マイナスの旋回角度は反発を示す。 $G\alpha 13$ の阻害ペプチド (inhGα13) は LysoPtdGlc による軸索反発を阻害したが、コントロールペプチド (contGα13) は影響を及ぼさなかった。括弧内の数字は、解析した軸索の本数を示す。

(3) GPR55 ノックアウトマウスの脊髄感覚神経回路の解析。

LysoPtdGlc とその受容体の生体内での役割を検証するために、GPR55 ノックアウトマウスの脊髄感覚神経回路の形態学的解析を行った。脂質親和性蛍光プローブ DiI を脊髄後根神経節の背内側部あるいは腹側部に注入して、それぞれ痛覚神経軸索あるいは固有感覚神経軸索を選択的に標識した。野生型マウスの脊髄では、痛覚神経軸索と固有感覚神経軸索は分離して別個の領域を走行するが、GPR55 ノックアウトマウスの脊髄では痛覚神経軸索が固有感覚神経軸索の領域へ進入するという異常が観察された (図 3)。痛覚神経軸索と固有感覚神経軸索のマーカーである TrkA と TrkC を免疫染色した実験でも、DiI 標識実験と同様の痛覚神経軸索走行異常が確認された。これらの実験結果は、脊髄内での PtdGlc/LysoPtdGlc の局在および培養神経細胞の LysoPtdGlc への旋回応答性と合致する表現型であり、LysoPtdGlc が GPR55 を介して痛覚神経軸索を反発して固有感覚神経軸索から分離させることが明らかになった。

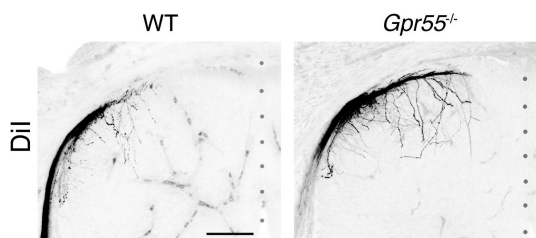


図 3 野生型 (WT) および GPR55 ノックアウトマウス ($Gpr55^{-/-}$) の脊髄での痛覚神経軸索の走行。画像は脊髄の背側 1/4 であり、灰色の点線は正中を示す。DiI で標識された痛覚神経軸索を黒で表示する。スケールバーは 200 μm に相当。

以上、異種の感覚を司る神経軸索を分別して精密な中枢神経回路を構築するために必要な新たな脂質シグナルを発見した。

< 引用文献 >

Kolodkin AL, Tessier-Lavigne: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a001727, 2011
 Tojima T, Hines JH, Henley JR, Kamiguchi H: *Nat Rev Neurosci* 12: 191-203, 2011

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)

Guy AT, Nagatsuka Y, Ooashi N, Inoue M, Nakata A, Greimel P, Inoue A, Nabetani T, Murayama A, Ohta K, Ito Y, Aoki J, Hirabayashi Y, Kamiguchi H: Glycerophospholipid regulation of modality-specific sensory axon guidance

in the spinal cord. Science 349: 974-977, 2015 査読あり

DOI:10.1126/science.aab3516

Akiyama H, Kamiguchi H: Second messenger networks for accurate growth cone guidance. Developmental Neurobiology 75: 411-422, 2015 査読あり

DOI:10.1002/dneu.22157

Kuboyama T, Luo X, Park K, Blackmore M, Tojima T, Tohda C, Bixby J, Lemmon V, Kamiguchi H: Paxillin phosphorylation counteracts proteoglycan-mediated inhibition of axonregeneration. Experimental Neurology 248: 157-169, 2013 査読あり

http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.06.011

Binata Joddar, Guy AT, Kamiguchi H, Yoshihiro Ito: Spatial gradients of chemotropic factors from immobilized patterns to guide axonal growth and regeneration. Biomaterials 34:9593-9601, 2013, 査読あり

http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.019

Fujita A, Koinuma S, Yasuda S, Nagai H, Kamiguchi H, Wada N, Nakamura T: GTP hydrolysis of TC10 promotes neurite outgrowth through exocytic fusion of Rab11- and L1-containing vesicles by releasing exocyst component Exo70. PLoS One 8: 79689, 2013, 査読あり

DOI:10.1371/journal.pone.0079689

〔学会発表〕(計 7 件)

Chan Carmen、秋山博紀、松浦徹、御子柴克彦、上口裕之、Importance of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 (IP3R) in growth cone navigation.第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 13 日、横浜(パシフィコ横浜)

肥田友伸、富山達也、上口裕之、成長円錐旋回運動におけるホスホリパーゼ D とホスファチジン酸の機能解析、第 36 回日本神経科学大会第 56 回日本神経化学大会第 23 回日本神経回路学会大会、2013 年 6 月 21 日、京都(国立京都国際会館)

Guy AT, 上口裕之、The role of lysophosphatidylglucoside and its receptor in spinal cord axon tract formation. 第 36 回日本神経科学大会第 56 回日本神経化学大会第 23 回日本神経回路学会大会、2013 年 6 月 20 日、京都(国立京都国際会館)

上口裕之、リゾホスファチジルグルコシドによる脊髄神経軸索ガイダンス、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場(福岡市)

上口裕之、Lipid-mediated axon

guidance in the developing spinal cord. 第 27 回神経組織の成長・再生・移植研究会、2012 年 10 月 27 日、国立精神・神経医療研究センター(東京都小平市)

上口裕之、Lipid-mediated axon guidance in the developing spinal cord. US-Japan Brain Research Cooperative Program "Growth Cones & Axon Regeneration: Entering the Age of Informatics"、2012 年 10 月 11 日、Hilton New Orleans / New Orleans, USA

上口裕之、Lipid-mediated axon guidance in the developing spinal cord. The 34rd Meeting of the Japanese Association of Neural Tissue Culture and The 2nd International Conference of Neural Tissue Culture、2012 年 6 月 16 日、東京医科歯科大学(東京都)

〔図書〕(計 2 件)

戸島拓郎、上口裕之:中外医学社、Clinical Neuroscience、2015 年 2(474-475)

秋山博紀、上口裕之:Springer、Methods Mol Biol、2014 年 11(17-27)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)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・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号:
10233933

(2)研究分担者

なし
研究者番号:

(3)連携研究
なし
研究者番号：