

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500393

研究課題名(和文) 神経軸索ガイダンスの方向極性を制御するエンドサイトーシス調節因子の同定

研究課題名(英文) Identification of the endocytosis regulator that determines the polarity of neuronal 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・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：00373332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経軸索の先端構造である成長円錐は、周辺環境に存在する軸索ガイダンス因子に誘引・反発されることで遙か遠隔の標的まで辿り着く。過去に我々は、成長円錐の反発がクラスリン依存性エンドサイトーシスの非対称化によって駆動されることを明らかにしていた。本課題では、成長円錐の反発を担うエンドサイトーシス調節因子として、ホスファチジルイノシトール4-リン酸5-キナーゼ γ -90 (PIPK γ 90)を同定した。

研究成果の概要(英文)：During embryonic development, axonal growth cones are guided along their correct routes toward distant targets by a variety of extracellular attractive and repulsive cues. We previously demonstrated that growth cone repulsion, but not attraction, is driven by asymmetric clathrin-mediated endocytosis across the growth cone. In the present study, we identify a 90 kDa splice variant of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type-1 γ (PIPK γ 90) as an endocytosis-adaptor protein that mediates growth cone repulsion.

研究分野：神経科学

キーワード：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 PIPK γ 90 AP2

1. 研究開始当初の背景

神経回路形成過程の神経軸索先端部に現れる成長円錐は、細胞外環境に呈示される多種多彩な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軸索を正しい標的まで牽引する。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、遠ざける作用を持つ「反誘因子」に大別されるが、どちらの場合も因子を受容した側に発生する局所 Ca^{2+} シグナルが巡回運動誘発の必要十分条件である(文献)。研究代表者らの過去の研究により、誘引を引き起こす Ca^{2+} シグナル(誘引性 Ca^{2+} シグナル)と、反誘を引き起こす Ca^{2+} シグナル(反誘性 Ca^{2+} シグナル)の Ca^{2+} 供給源の違いが明らかになっている。細胞質 Ca^{2+} 濃度は、細胞外からの「 Ca^{2+} 流入」または小胞体からの「 Ca^{2+} 放出」により上昇するが、ガイダンス因子受容に伴って Ca^{2+} 流入のみが生じた場合には成長円錐は反誘性巡回を呈し、 Ca^{2+} 流入に伴いリアノジン受容体を介した Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出が起きると誘引性巡回を呈する(文献)。また研究代表者は、これら Ca^{2+} シグナル下流において誘引と反誘を駆動するメカニズムを解析し、誘引性巡回は成長円錐片側での VAMP2 依存性エクソサイトーシス促進によって、反誘性巡回は成長円錐片側でのクラスリン依存性エンドサイトーシス促進によって駆動されることを世界に先駆けて報告した(文献)。これに引き続いて研究代表者は最近、 Ca^{2+} シグナルからエンドサイトーシス促進・抑制に至るシグナル伝達経路について解析を進めた。まず反誘性 Ca^{2+} シグナルの構成要素である「 Ca^{2+} 流入」の下流でエンドサイトーシスを促進するシグナル分子として Ca^{2+} 依存性脱リン酸化酵素カルシニューリンを同定した(文献)。一方、誘引性 Ca^{2+} シグナルが「 Ca^{2+} 放出」と「 Ca^{2+} 流入」の集合であることを考慮すると、誘引性 Ca^{2+} シグナル下流ではエクソサイトーシスのみならずエンドサイトーシスも同時に促進されてしまうことになり、両者の拮抗により成長円錐は巡回運動を呈することができないという矛盾が生じる。これを防ぐためには、「 Ca^{2+} 放出」からエンドサイトーシス抑制に至る経路(交差抑制経路)の存在が必須であると考えられ、この経路を担うシグナル分子として Ca^{2+} 依存性リン酸化酵素 CaM キナーゼ II (CaMKII) とサイクリン依存性キナーゼ 5 (Cdk5) を同定した。

2. 研究の目的

これらの知見に基づき本課題では、 Ca^{2+} シグナル下流においてカルシニューリンと Cdk5 により拮抗的リン酸化制御を受け、成長円錐の巡回方向(誘引/反誘)の決定を担うエンドサイトーシス調節因子を同定することを目的とした。その第一候補として、dephosphin と総称されるクラスリンアダプ

タータンパク質群の一員であるホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ γ -90 (PIPKI γ 90) に焦点を当てた。Dephosphin とはカルシニューリンにより脱リン酸化を受けることでシナプス小胞のクラスリン依存性エンドサイトーシスを促進する分子群で、カルシニューリンによる脱リン酸化部位は Cdk5 によりリン酸化されることが報告されている(文献)。dephosphin に属する分子としては、PIPKI γ 90 の他にも dynamin、amphiphysin、AP180 など現時点で 7 種が同定されているが、これらの成長円錐での機能は全く解明されていなかった。PIPKI γ 90 は、形質膜脂質二重層の内側リーフレットにおいてホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PIP) の 5 位をリン酸化することでホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP $_2$) を合成する酵素である。多くのエンドサイトーシス関連タンパク質は PIP $_2$ 結合領域を持つため、カルシニューリン依存的に PIPKI γ 90 により合成された PIP $_2$ は、これらの分子群を形質膜直下に集積させることでクラスリン依存性エンドサイトーシスを開始させると予測した。

3. 研究の方法

(1) ケージド Ca^{2+} として、アセトキシメチル化 NP-EGTA を成長円錐に取り込ませ、355 nm レーザーを成長円錐内の任意の場所とタイミングで照射することにより Ca^{2+} シグナルを発生させ、巡回運動を誘発した。

(2) 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可視化し定量解析した。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

(1) 研究代表者が実験試料として用いているニワトリの PIPKI γ 90 はこれまでクローニングされていなかったため、まず始めにクローニングを行った。その結果、C 末端領域にクラスリンアダプタータンパク質 AP2 との結合領域を持つバリエーションと持たないバリエーションの 2 種類が存在することを確認し(そ

れぞれ PIPKI γ 90 および PIPKI γ 87) その全長配列を決定した。その上で、発生期ニワトリ脊髄後根神経節細胞における PIPKI γ 90 タンパク質の発現を抗体染色法により確認した。

(2) ニワトリ PIPKI γ 90 の kinase-dead 変異体を作成し、発生期ニワトリ脊髄後根神経節細胞の軸索成長円錐におけるエンドサイトーシスと旋回運動に対する寄与を検証した。その結果、反発性 Ca²⁺シグナルに応じて誘起されるエンドサイトーシスの非対称性および成長円錐の反発性旋回運動に PIPKI γ 90 の kinase 活性が必要であることが示された。一方、成長円錐の誘引性旋回運動には PIPKI γ 90 の kinase 活性は必要無かった。さらに、内在性 PIPKI γ 90 の siRNA ノックダウンによっても同様の結果を得た。

(3) PIPKI γ 90 は AP2 と直接結合することでのキナーゼ活性を上昇させる。成長円錐の反発性旋回運動における PIPKI γ 90 - AP2 間結合の必要性を検証するために、PIPKI γ 90 の AP2 結合領域配列のペプチド断片を合成し、これが成長円錐の旋回運動に及ぼす影響について解析した。その結果、この合成ペプチドはケージド Ca²⁺による誘引性旋回運動には効果が無く、その一方で反発性旋回運動を消失させることが明らかになった。続いて、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可視化解析した。コントロール条件下の成長円錐では反発性 Ca²⁺シグナルに応じてエンドサイトーシスが非対称化したが、PIPKI γ 90 の AP2 結合領域を含む C 末端断片を発現させた成長円錐においては、エンドサイトーシスの非対称化が起きないことが判明した。

以上の結果から、PIPKI γ 90 が成長円錐の反発を担うエンドサイトーシス調節因子として機能することが示された。この研究成果は、Journal of Neuroscience 誌に受理・掲載された(文献)

(4) 成長円錐の旋回運動に対する PIPKI γ 90 - AP2 間結合の必要性をさらに深く検討した。AP2 サブユニットの一つである β 2-adaptin の ear ドメイン内の 1 アミノ酸変異 (K808A) により PIPKI γ 90 との結合を阻害したところ、誘引性旋回運動には影響が無く、反発性旋回運動を消失させた。また、PIP₂ 可視化プローブである蛍光タンパク質標識 PLC δ -PH を用いて成長円錐内での PIP₂ 量の変動を全反射蛍光顕微鏡により観察したが、現在のところ Ca²⁺シグナルに応じた顕著な PIP₂ シグナルの増減は観察されていないため、今後は蛍光プローブの性能の改良等を試みて行く予定である。

<引用文献>

Zheng, JQ. Nature 403, 89-93, 2000.

Ooashi, N. et al. J. Cell Biol. 170, 1159-1167, 2005.

Tojima, T. et al. J. Neurosci. 29, 7886-7897, 2009.

Tojima, T. et al. Nat. Rev. Neurosci. 12, 191-203, 2011.

Tojima, T. et al. Nat. Neurosci. 10, 58-66, 2007.

Tojima, T. et al. Neuron 66, 370-377, 2010.

Cousin, MA. and Robinson, PJ. Trends Neurosci. 24, 659-665, 2001.

Tan, TC. et al. Nat. Cell Biol. 5, 701-710, 2003.

Nakano-Kobayashi, A. et al. EMBO J. 26, 1105-1116, 2007.

Tojima et al. J. Neurosci. 34: 7165-7178, 2014.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Takuro Tojima, Hiroyuki Kamiguchi. (2015) Exocytic and endocytic membrane trafficking in axon development. Development, Growth & Differentiation 57: 291-304. (査読有) doi: 10.1111/dgd.12218.

戸島拓郎, 上口裕之. (2015) 成長円錐はどのように動くのか. Clinical Neuroscience 33: 474-475. (査読無)

Takuro Tojima, Rurika Itofusa, Hiroyuki Kamiguchi. (2014) Steering neuronal growth cones by shifting the imbalance between exocytosis and endocytosis. Journal of Neuroscience 34: 7165-7178. (査読有) doi: 10.1523/JNEUROSCI.5261-13.2014.

Tomoharu Kuboyama, Xueting Luo, Kevin Park, Murray G. Blackmore, Takuro Tojima, Chihiro Tohda, John L. Bixby, Vance P. Lemmon, Hiroyuki Kamiguchi. (2013) Paxillin phosphorylation counteracts proteoglycan-mediated inhibition of axon regeneration. Experimental Neurology 248: 157-169. (査読有) doi: 10.1016/j.expneurol.2013.06.011.

戸島拓郎, 上口裕之. (2013) サイクリック AMP. 脳科学辞典 <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/サイクリックAMP> (査読有)

Takuro Tojima. (2012) Intracellular signaling and membrane trafficking control bidirectional growth cone

guidance. *Neuroscience Research* 73: 269-274. (査 読 有) doi: 10.1016/j.neures.2012.05.010.

秋山博紀, 戸島拓郎, 上口裕之. (2012) 神経軸索突起の進路決定メカニズム. *生化学* 84: 848-853. (査 読 無) <http://www.jbsoc.or.jp/old/event/magazine/pdf/84-10-06.pdf>

[学会発表](計 12 件)

糸総るり香, 戸島拓郎, 上口裕之. 神経軸索ガイダンスを駆動する膜トラフィックの制御機構. 平成 26 年度包括脳ネットワーク冬のワークショップ, 東京医科大学(東京都文京区), 2014 年 12 月 11 日

秋山博紀, 福田徹子, 戸島拓郎, 上口裕之. サイクリックヌクレオチドは微小管依存的な小胞輸送の調節を介して軸索進路を決定する. 第 37 回日本神経科学大会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2014 年 9 月 11 日

糸総るり香, 戸島拓郎, 上口裕之. 膜輸送の不均衡化による神経軸索ガイダンス. 第 37 回日本神経科学大会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2014 年 9 月 11 日

戸島拓郎. 神経成長円錐ガイダンスを制御するシグナル伝達機構. 第 66 回日本細胞生物学会大会, 奈良県新公会堂(奈良県奈良市), 2014 年 6 月 11 日

糸総るり香, 戸島拓郎, 上口裕之. エクソサイトーシスとエンドサイトーシスのバランス調節による神経軸索ガイダンス制御. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市), 2013 年 12 月 3 日

戸島拓郎. 神経軸索ガイダンスを制御するシグナル伝達クロストーク. 第 86 回日本生化学会大会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2013 年 9 月 13 日

糸総るり香, 戸島拓郎, 上口裕之. 軸索ガイダンスを制御するエクソサイトーシスとエンドサイトーシスのバランス調節経路. 平成 25 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 2013 年 9 月 1 日

糸総るり香, 戸島拓郎, 上口裕之. 膜トラフィックの不均衡による成長円錐ガイダンスの制御機構. 第 36 回日本神経科学大会第 56 回日本神経化学会大会第 23 回日本神経回路学会大会合同大会

(Neuro2013), 国立京都国際会館(京都府京都市), 2013 年 6 月 20 日

秋山博紀, 福田徹子, 戸島拓郎, 上口裕之. カルシウムおよびサイクリックヌクレオチドはそれぞれ異なる v-SNARE を介して成長円錐の進路を決定する. 第 36 回日本神経科学大会第 56 回日本神経化学会大会第 23 回日本神経回路学会大会合同大会(Neuro2013), 国立京都国際会館(京都府京都市), 2013 年 6 月 20 日

秋山博紀, 福田徹子, 戸島拓郎, 上口裕之. cAMP/cGMP による微小管依存的な小胞輸送の拮抗制御の成長円錐ガイダンスにおける役割. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 2012 年 9 月 18 日

戸島拓郎, 糸総るり香, 上口裕之. 神経成長円錐ガイダンスを制御するクラスリン依存性エンドサイトーシス調節経路. 2012 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ, 仙台国際センター(宮城県仙台市), 2012 年 7 月 26 日

Takuro Tojima, Rurika Itofusa, Hiroyuki Kamiguchi. Ca^{2+} signaling and membrane trafficking mediate neuronal growth cone guidance. Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市), 2012 年 05 月 30 日

[図書](計 1 件)

Rurika Itofusa, Takuro Tojima, Hiroyuki Kamiguchi. (2015) Visualization of clathrin-mediated endocytosis during Semaphorin-guided axonal growth. *Methods in Molecular Biology* (in press)

[その他]

戸島拓郎の研究者個人ホームページ:
<http://tojimat.web.fc2.com/index.html>

理化学研究所脳科学総合研究センター神経成長機構研究チームのホームページ:
http://www.riken.jp/research/labs/bsi/neur_growth_mech/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸島 拓郎 (TOJIMA, Takuro)
理化学研究所・脳科学総合研究センター・
研究員
研究者番号: 00373332