

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650163

研究課題名(和文)分子のキラリティが生み出す神経系の非対称性：メカニズム解明と分子工学的制御

研究課題名(英文)Generation of neural asymmetry by molecular chirality

研究代表者

玉田 篤史(Tamada, Atsushi)

新潟大学・研究推進機構超域学術院・准教授

研究者番号：60270576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経系は構造的にほぼ左右対称であるとされるが、ヒトで言語中枢が左半球優位であるなど機能的には非対称である。申請者は「神経系の非対称性の根源が分子のキラリティにある」との新規概念を提唱する。本研究では、「アクチンフィラメントの右巻き二重らせん構造とミオシンVモーターのキラルな分子構造が、アクチン系とミオシン系のらせん運動を発生させ、それが成長円錐フィロポディアの右ねじ回転運動を駆動し、それが神経突起の右旋回運動を発生させる」という仮説を立てた。仮説の検証を行うための基盤技術として、ミオシン分子のキラリティを改変する手法と、神経細胞の回転運動を高速・高解像度で捉える画像変換手法を開発した。

研究成果の概要(英文)：The nervous system is structurally and functionally asymmetric along the midline. However, the mechanism underlying the formation of the left-right brain asymmetry is largely unknown. We previously reported that the filopodia of the growth cones at the tips of the neurites autonomously rotate in the direction of the right-handed screw by way of myosin V and suggested that the filopodial rotation could trigger the formation of brain asymmetry. Here we hypothesized that the filopodial rotation originates in the chiral molecular structure of myosin V. To test this hypothesis, we developed the methods of molecular manipulation of the chiral structure of myosin V. To quantitatively analyze the effect of the manipulated myosin V on the filopodial motility, we further developed an efficient method of 3D time-lapse imaging with differential interference contrast microscopy.

研究分野：神経科学

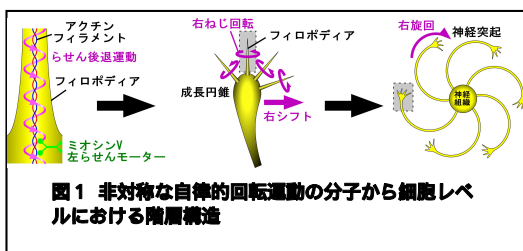
キーワード：成長円錐 フィロポディア ミオシン 微分干渉法 Riesz変換

1. 研究開始当初の背景

申請者は「神経突起が2次元培養基質上で右旋回する」奇妙な現象 (Heacock and Agranoff, Science 198, 64, 1977) からスタートし、以下のことを見出した (Tamada et al., J Cell Biol. 188, 429, 2010)。

- 1) 神経突起先端の成長円錐の各フィロポディアは自律的に右ねじ方向に回転する。
- 2) フィロポディアの回転は左らせんモーターであるミオシンVに駆動される。
- 3) フィロポディアの回転は神経突起の2次元基質上での右旋回の原因である。

この研究成果は、神経細胞の回転運動という新規の運動様式を発見し、分子から神経突起伸長に至る自律的で左右非対称な回転・旋回運動の階層構造とその因果関係を明らかにするものである (図1)。



2. 研究の目的

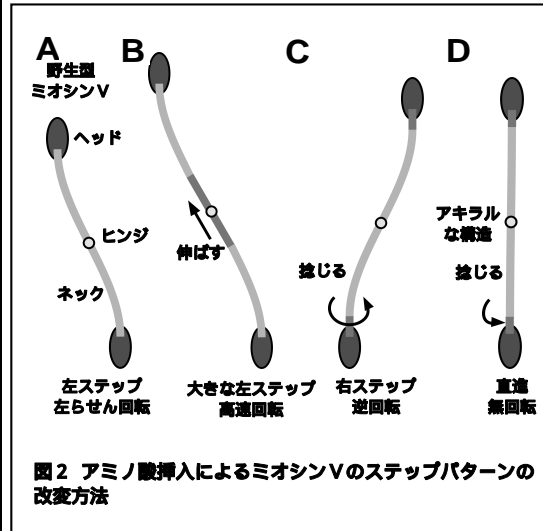
上記の研究により、フィロポディアの右ねじ回転と神経突起の右旋回運動が、アクチンフィラメント上でのミオシンVモーターの左らせん運動に起因することが明らかとなった。しかし、らせん運動を引き起こすアクチンミオシン相互作用のメカニズムは未だ不明である。ここで申請者は、「右巻き二重らせん構造のアクチンフィラメントに対して、キラルな分子構造を持つミオシンVモーターが左方向のバイアスをかけることで左らせん運動が生じる」との新たな仮説を立てて、これを検証することを目的とする。分子工学的的手法によりミオシンVを改変してキラリティを操作し、そのときに現れるアクチンミオシン系の1分子運動、フィロポディアの回転性、神経突起の旋回性を計測し、キラリティと非対称性運動の因果関係を明らかにする。さらに、キラリティ改変により、リニアな運動性を保ったままで無回転・高速回転・逆回転を生じるミオシンモーターを作成し、フィロポディアの回転停止・高速回転・逆回転、神経突起の旋回消失・高速旋回・逆旋回を人為的に引き起こす方法を確立し、神経系の非対称性形成のメカニズムを探索するためのツールを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

ミオシンVモーターの分子改変

ミオシンVは、右巻き二重らせん構造を取るアクチンフィラメント上をマイナス端からプラス端に向かって直線運動する際に左ステップすることにより左らせん運動する

とされる (Ali et al., Nat Struct Biol. 9, 464, 2002)。申請者は、この現象を説明するために、「左ステップの主原因は、ミオシン二量体がヘッドドメインから見てネックドメインが左に曲がったキラルな立体構造を取ることにある」という新たな仮説を立てた (図2)。



仮説を検証するために、ミオシンVのネックドメイン部分にアミノ酸挿入することにより分子構造を改変した分子を作成した (図2)。これらの分子を神経細胞に遺伝子導入法により発現させて、そのときの成長円錐の運動パターンを3次元タイムラプスイメージングにより解析した。

3次元タイムラプスイメージング

神経細胞の3次元タイムラプスイメージングを行う際には、ラベルフリーで高解像度画像が得られて細胞毒性の少ない微分干渉法を用いた。神経組織や分散した細胞を培養皿上あるいは3次元のコラーゲン基質に包埋した状態で、ピエゾステージで高速にフォーカスを変化させながら正立顕微鏡に付けたCCDカメラで3次元撮影した。

Riesz変換微分干渉法による3次元構造の可視化

微分干渉像は、物体にシヤ角方向から光を当てたような陰影の付いた画像になるという欠点を持つ。そこで、1次元信号に対して位相を90度ずらす操作であるヒルベルト変換の多次元拡張版であるリース(Riesz)変換を用いることで、陰影を取り除いて蛍光像のような自己発光画像に変換する手法を開発した。これにより、画像の重ねあわせができるようになり、立体画像の構築と可視化が可能となる。

4. 研究成果

改変ミオシンモーター分子を神経細胞に発現させた結果、神経細胞の成長円錐のフィロポディアの運動パターンが変化すること

が観察できた。しかし、この変化は1枚の微分干渉像に基づくものであり、元来立体構築に適さない微分干渉像から立体的な構造と運動の変化を検知することは難しかった。そこで研究方法に示したように、微分干渉画像から陰影を除去する Riesz 変換の手法を開発した。

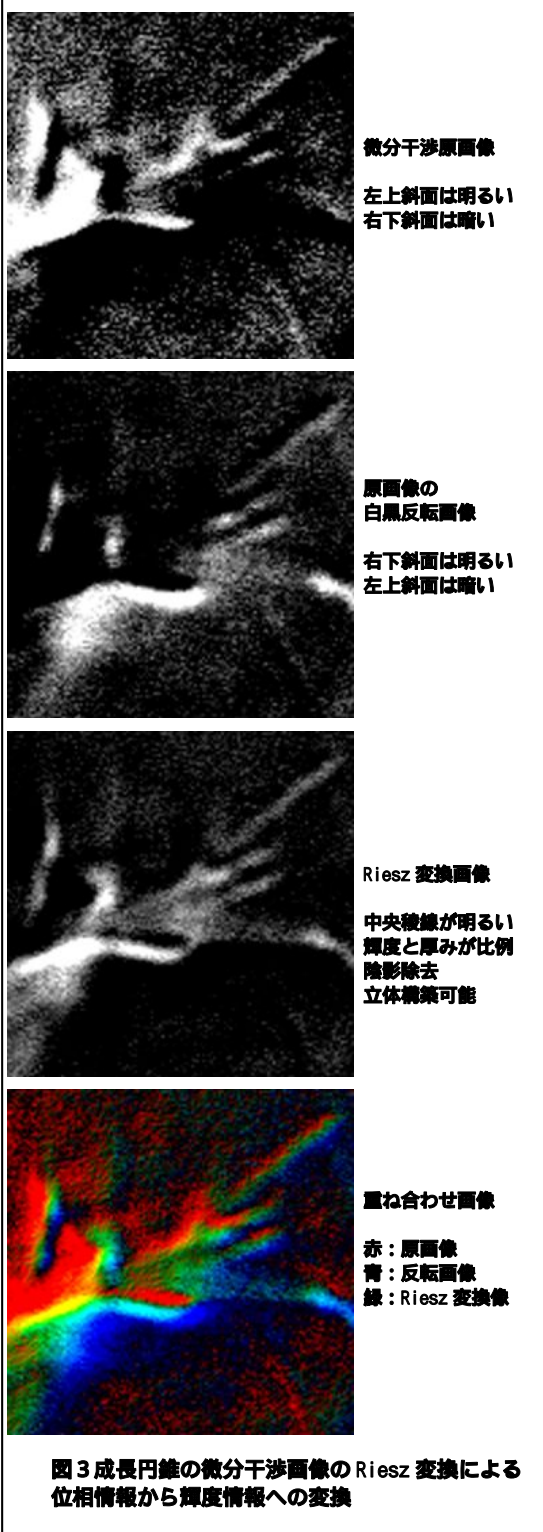
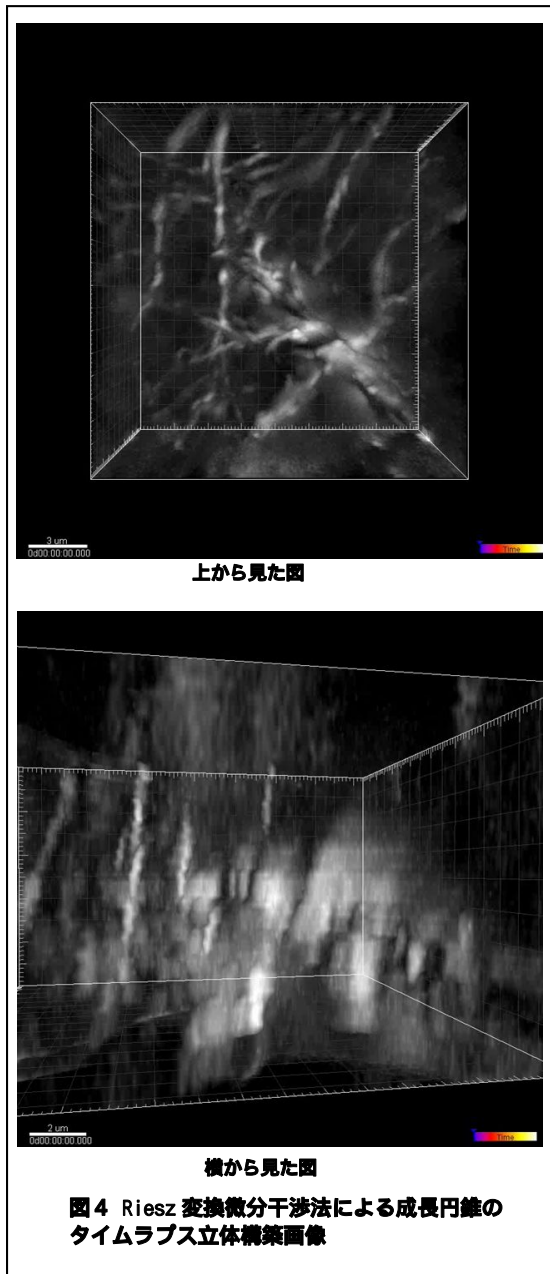


図3のように、微分干渉顕微鏡ではシア方向（この場合は斜め45度方向）に空間微分したような陰影の付いた画像が得られる。これを白黒反転しても陰影の方向が逆になるだ

けである。微分干渉画像では輝度値ベースの数値的・定量的な解析を行うことは不可能である（たとえば、閾値処理などで輝度値分布から物体を抜き出すことはできない）。これに対して、本研究で開発した Riesz 変換の手法を施すと、シア方向の位相が90度変化して、シア方向陰影が除去された画像が得られた。Riesz 変換画像では物体の中心が最も明るくなり、輝度値と物体の厚みが比例関係になった。Riesz 変換像は蛍光像と同等に取り扱うことが可能であり、3次元立体構築や輝度値ベースの標準的な画像解析手法を適用することが可能となった。この手法により、3次元空間内における成長円錐の運動パターンを可視化することに成功した（図4）。



この手法を用いて、様々な改変ミオシンモーター分子を発現させたときの3次元タイムラプス画像を得ることにこれまでに成功している。現在、さらに研究を進めて、3次元タイムラプス画像から成長円錐の立体構造

と運動様式を自動的・数値的に定量化する手法の開発を試みている。一連の手法が開発できれば、恣意的な処理ではなく、客観的な方法で細胞の構造と機能を詳細に解析することが可能となり、分子のキラル構造と細胞運動、さらには個体レベルの非対称性の解明につなげることが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 1 件)

Torigoe M, Yamauchi K, Tamada A, Matsuda I, Aiba A, Castellani V, Murakami F.
Role of neuropilin 2 in the ipsilateral growth of midbrain dopaminergic axons. Eur J Neurosci., 査読有り, 37,1573-1583,2013.

〔学会発表〕(計 6 件)

玉田篤史
細胞運動の可視化・数値化技術の開発と脳の左右非対称性研究への応用 日本機械学会、第 27 回バイオエンジニアリング講演会、新潟 2015/1/10

玉田篤史、五十嵐道弘
細胞運動の 3 次元可視化・数値解析に関する新技術開発とその応用による神経成長円錐のらせん運動の発見 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜 2014/11/27

Tamada A, Igarashi M.
Riesz transform-assisted differential interference contrast imaging: application to three-dimensional kinematic analysis of the growth cone motility. Neuroscience 2014, Washington, USA. 2014/11/15

玉田篤史、五十嵐道弘
Riesz 変換微分干渉イメージング法の開発と成長円錐の 3 次元運動解析への適用 第 37 回日本神経科学大会、横浜 2014/9/13

Tamada A, Igarashi M.
Riesz transform-assisted differential interference contrast imaging for three-dimensional visualization and quantitative analysis of asymmetric neurite extension and growth cone motility. 9th FENS Forum of Neuroscience, Milan, Italy. 2014/7/8

玉田篤史、五十嵐道弘
成長円錐フィロポディアおよび神経突起

の非対称性回転運動の起源 第 35 回日本神経科学大会、横浜 2012/9/18

〔図書〕(計 1 件)

玉田篤史、村上富士夫
成長円錐の走行制御と神経回路形成。脳神経科学イラストレイテッド(第 3 版) 第 3 章-4、羊土社、2013

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉田 篤史 (TAMADA Atsushi)
新潟大学・研究推進機構・超域学術院・准教授
研究者番号： 60270576

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：