

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460309

研究課題名(和文) マクロピノサイトーシスによる膜動態変化依存的な神経回路形成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of macropinocytosis-mediated neural circuit formation

研究代表者

樺山 博之 (Kabayama, 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・研究員

研究者番号：10332339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：発達期において、シナプス前部の前駆体である神経突起の先端部分の成長円錐はダイナミックな形態変化を示すことが知られている。反発性軸索誘導因子は成長円錐を退縮させることによって、神経突起伸長をとめ、間違った細胞とのシナプス形成を阻害する。この成長円錐の退縮は、マクロピノサイトーシスによる形質膜表面積の細胞内への取り込みによる。本研究では、成長円錐のマクロピノサイトーシスの負の制御因子であるsyntaxin1Bが、細胞内カルシウムストアであるIP3Rのcoiled-coil domainに結合することによって、カルシウム依存性のマクロピノサイトーシスを制御していることを示唆するデータを得た。

研究成果の概要(英文)：During development, a repulsive axon guidance cue semaphorin 3A (sema3A)-induced growth cone collapse is caused by macropinocytosis-mediated membrane retrieval. I have identified syntaxin1B as negative regulator of macropinocytosis in growth cones. In this study, I focused on the molecular mechanism of syntaxin1B-mediated macropinocytosis and found that syntaxin1B regulates the function of IP3R1 by binding with coiled-coil domain of IP3R1, thereby mediating Ca²⁺-dependent macropinocytosis.

研究分野：神経科学

キーワード：マクロピノサイトーシス 膜動態 syntaxin1B IP3R 反発性軸索誘導

1. 研究開始当初の背景

(1) マクロピノサイトーシスについて

マクロピノサイトーシスは大規模な細胞膜の回収や細胞外液を飲み込む為の特殊なエンドサイトーシスで、微分干渉像でも観察が出来るほどの大きな vacuole (直径 0.2-5 μ m) を形成する。従来よく研究されてきたクラスリン依存性のエンドサイトーシスとは異なり、クラスリン非依存性であり、分子量 10kDa 以上の蛍光デキストランでラベルする事が出来る。クラスリン依存性エンドサイトーシスと異なり、その制御メカニズムや生理的役割については不明な点が多かった。しかし、ごく最近の研究で、数少ないマクロピノサイトーシス制御分子として知られる Rac1, cdc42 などのドミナントネガティブ変異体、マクロピノサイトーシス阻害剤であるアミロライドなどを用いることで、様々なウイルス (Vaccinia virus, HIV-1, Echovirus etc., *Nature Cell Biol.* 2009. (11) p510-) のほ乳類動物細胞への侵入がマクロピノサイトーシス依存性であること、また、狂牛病の原因であるプリオン蛋白の繊維芽細胞への侵入や、膜透過性ペプチドである TAT などもマクロピノサイトーシスを介して細胞内へ取り込まれる事が明らかにされた。さらには、がん細胞の増殖にもマクロピノサイトーシスによる細胞外タンパクの取り込みが重要であることも明らかにされており (*Nature*. 2013 May 30; 497(7451):633-7.)、マクロピノサイトーシスの様々な生命現象における分子メカニズムや生理的役割の解明が進みつつある。

(2) 神経回路形成とマクロピノサイトーシスについて

神経細胞においてマクロピノサイトーシスが誘導されるか、あるいは生理的役割を持つかについてはこれまで全く注目もされておらず、明らかにされていなかったが、申請者は、ニワトリ胚、培養背根神経節 (DRG) 神経細胞の成長円錐においてマクロピノサイトーシスが誘導される事を世界に先駆けて以下の様に明らかにし、報告した (*Mol. Cell. Neuroscience*. 2009)。Sema3A によって形成される vacuole 面積と成長円錐全体の膜面積は逆相関にあることを明らかにした。これは反発性軸索誘導に必須とされる成長円錐の退縮 (面積の減少を伴う) にマクロピノサイトーシスが寄与するというを示唆した初めての報告となった。さらに Sema3A による成長円錐の退縮はマクロピノサイトーシス阻害剤によりほぼ完全に抑制できることも明らかにし (*J. Neuroscience* 2011) 従来
の研究では全く注目されていなかった、マクロピノサイトーシスによる膜動態変化依存的な神経回路形成機構の分子メカニズムの解明を推進してきた。

成長円錐におけるマクロピノサイトーシスの負の制御因子として syntaxin1B を同定しているが、syntaxin1B がどのようにマクロ

ピノサイトーシスを制御しているか、また、細胞内カルシウム上昇はマクロピノサイトーシスを誘導することを報告しているが、その分子制御メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、マクロピノサイトーシスによる膜動態変化依存的な神経回路形成機構を、分子、細胞、個体レベルで明らかにすることを目的とした。既に成長円錐におけるマクロピノサイトーシスの負の制御因子として syntaxin1B を同定しているが、syntaxin1B がどのようにマクロピノサイトーシスを抑制しているかに焦点をあて解析した。

3. 研究の方法

syntaxin1B 結合分子として、細胞内カルシウムストアのカルシウムチャネルである IP3R1 を同定しており、syntaxin1B と IP3R1 の相互作用が、マクロピノサイトーシスに及ぼす影響を神経様細胞である PC12 細胞を用いて解析した。また、末梢、中枢神経の軸索伸長にマクロピノサイトーシスが関与しているかを調べるため、マクロピノサイトーシス制御分子であり、マクロピノサイトーシス阻害剤の標的分子である Na⁺/H⁺ exchanger (ナトリウム・プロトン交換体 1: NHE1) のノックアウトマウスを、ゲノム編集技術を用いて作成した。

4. 研究成果

IP3R1 上の syntaxin1B 結合ドメインは coiled-coil 構造を形成するが、この結合部位を GST 融合タンパク質として PC12 細胞に発現させたところ、核へ移行することが判明した。また、coiled-coil 構造を破壊する点変異を導入すると、核への移行が阻害されることが分かり、この syntaxin1B 結合部位が IP3R の核への移行を制御するドメインであることが示唆された。また、ブラジキニン刺激による IP3R1 からのカルシウム放出 (IICR) によって、PC12 細胞にマクロピノサイトーシスが誘導されることが分かった。その IICR によるマクロピノサイトーシスは、syntaxin1B の過剰発現により、有意に抑制されることが分かった。さらに、この syntaxin1B による効果は、IP3R 結合部位の GST 融合タンパク質の共発現により阻害される可能性が示唆された。GST タグを融合した Syntaxin1B 結合部位をレンチウイルスベクターによって、効率よく神経細胞に発現させることが可能になった。

また、NHE1 ノックアウトマウスを B6 野生型マウスと戻し交配を行い、胎生期の神経回路形成にマクロピノサイトーシスが関与しているかを調べる事が可能になった。

また、本研究において、マクロピノサイトーシス阻害剤がドーパミン神経細胞からの構成的なドーパミン放出を促進することを明

らかにした。これは、マクロピノサイトーシスがドーパミン放出の負の制御メカニズムであることを示唆している。また、運動障害を呈するパーキンソン氏病の原因遺伝子の一つである Parkin のノックアウトマウスでは線条体におけるドーパミンの放出が低下していることが報告されているが、そのメカニズムは不明であった。そこで、parkin ノックアウトマウスにおけるドーパミン放出の低下にマクロピノサイトーシスが関与しているかを調べた。脱分極刺激依存的にマクロピノサイトーシスマーカーである高分子量デキストランのドーパミン神経細胞への取り込みの亢進が認められた。Parkin は基質タンパク質をポリユビキチン化することでプロテアソーム依存的に基質を分解する E3 ユビキチンリガーゼである。本研究では新たな Parkin 基質タンパク質分子として、synaptotagmin IV (Syt IV) を同定した。PC12 細胞において、プロテアソーム阻害剤である epoxomicin は有意に Syt IV の発現を増強することが分かった。リソソーム阻害剤では Syt IV の発現は変化しなかった。PC12 細胞やマウス線条体において、内因性の Syt IV と Parkin の結合が確認された。また、COS7 細胞を用いた実験系において、Parkin 過剰発現によって、Syt IV のポリユビキチン化が増強されることが分かった。さらに、Parkin ノックアウトマウスの線条体において Syt IV の発現が増加していることが明らかとなった。以上から、Syt IV が Parkin の基質であることが明らかとなった。さらに、VAMP2-pHluorin を用いて exocytosis への影響を調べたところ、Parkin 依存的な Syt IV の分解によって、exocytosis が有意に変化することが判明した。この成果の一部は論文として発表した (Molecular and Cellular Neuroscience, 2017)。Parkin ノックアウトマウスでは、LTP が低下し、Syt IV ノックアウトマウスでは LTP が増強されることが既に方奥されており、Parkin による Syt IV の分解が上記の LTP 異常の分子メカニズムである可能性が高いと考えられた。

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 1 件)

1. Parkin promotes proteasomal degradation of Synaptotagmin IV by accelerating polyubiquitination. Hiroyuki Kabayama, Naoko Tokushige, Makoto Takeuchi, Miyuki Kabayama, Mitsunori Fukuda, and Katsuhiko Mikoshiba. **Molecular and Cellular Neuroscience**. 2017. 80. P89-99 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

Calcium Signaling: from basic to bedside

2014. July 3. Macropinocytosis mediates Sema3A-induced growth cone collapse. Kabayama Hiroyuki, Takeuchi Makoto, Taniguchi Masahiko, Tokushige Naoko, Kozaki Shunji, Mizutani Akihiro, Hirohide Iwasaki, Nakamura Takeshi, and Mikoshiba Katsuhiko. Stockholm Sweden.

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

所属研究室ホームページ

<http://mikoshiba-lab.brain.riken.jp/index.html>

Frontiers 誌ホームページ

<http://loop.frontiersin.org/people/98808/overview>

Frontiers in Membrane Physiology and Membrane Biophysics 誌にて、マクロピノサイトーシス関連研究をテーマにした Research Topic, Physiological roles and regulatory mechanisms of macropinocytosis-mediated membrane retrieval in health and disease, を guest associated editor としてオーガナイズ(下記サイト参照)

<http://journal.frontiersin.org/research-topic/2047/physiological-roles-and-regulatory-mechanisms-of-macropinocytosis-mediated-membrane-retrieval-in-health>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樺山 博之 (KABAYAMA 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・研究員

研究者番号：10332339

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()