

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06459

研究課題名(和文) 軸索伸長の駆動力を生む先端端のアクチン依存性エンドサイトーシス

研究課題名(英文) Actin-dependent endocytosis at the leading edge of the growth cone

研究代表者

野住 素広 (Nozumi, Motohiro)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：00420323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経回路形成や軸索再生を担う成長円錐の先端では、アクチン細胞骨格の伸長によって形質膜が押され、軸索伸長の駆動力が生じる。本研究では、超解像顕微鏡による成長円錐の3次元蛍光像の取得により、成長円錐表面から垂直方向に伸びる非接着性のフィロポディアを発見した。そのフィロポディアには軸索ガイダンス受容体のニューロピリン-1が脂質ラフト依存的に集合し、1分前後で伸長と退縮を繰り返す様子が見られた。この非接着性のフィロポディアは細胞外空間に向けて積極的に受容体を配置し、水溶性リガンドを効率的に捕捉することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

走化性に特化した成長円錐は非神経細胞に比べると非常に小さく、これまで正確な3次元画像の取得が難しかった。本研究ではxy平面だけでなく、z軸方向でも共焦点レーザー顕微鏡の約2倍の分解能をもつ構造化照明法による超解像顕微鏡(3D-SIM)を使い、成長円錐表面の微小突起が走化性に重要な役割を果たしている可能性を初めて示した。非神経細胞では同様の構造がいくつか報告されており、細胞構造の精密な3次元可視化によって新たなメカニズムの解明につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Growth cones are essential for proper neural circuit formation and axon regeneration. At the leading edge of the growth cone, the plasma membrane is pushed by the elongation of the actin cytoskeleton, which generates the driving force for axon outgrowth. In this study, we found non-adhesive filopodia extending vertically from the surface of the growth cones by three-dimensional observations using super-resolution microscopy, 3D-SIM. The filopodia showed lipid raft-dependent accumulation of neuropilin-1, an axon guidance receptor, and repeated elongation and retraction within a minute. The growth cone could actively recruit receptors toward the extracellular space through the filopodia elongation, suggesting that they efficiently capture soluble ligands.

研究分野：細胞生物学

キーワード：成長円錐 アクチン 超解像顕微鏡

### 1. 研究開始当初の背景

神経回路形成時と神経再生時には、軸索の先端に走化性をもつ成長円錐が形成されて、軸索を正しい標的へと先導する。成長円錐の先端では、アクチン細胞骨格の伸長によって形質膜が押し入れ、軸索伸長の駆動力が生じる(図1)。申請者はアクチン骨格の伸長と同時に先端で形質膜の取込みが生じることを発見し、その過程が軸索伸長に必要であることを示した(Cell Rep, 2017)。しかし、先端からの積極的な形質膜取込みが軸索伸長に作用する仕組みは未解明のままであった。

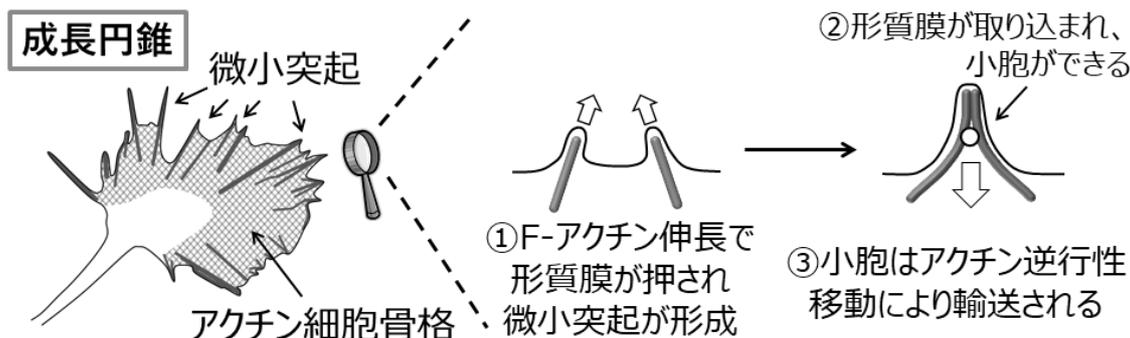


図1 成長円錐の先端で生じるエンドサイトーシスとアクチン細胞骨格の関係

### 2. 研究の目的

成長円錐の先端における F-アクチン、軸索ガイダンス受容体、エンドサイトーシス関連分子の3次元分布を可視化することで、アクチン依存性エンドサイトーシスと軸索ガイダンスの関係性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

神経芽細胞種 NG108-15、およびマウス初代培養大脳皮質ニューロンを用いて、成長円錐の F-アクチンをファロイジン、または mCherry-actin で標識し、構造化照明法による超解像顕微鏡 (Zeiss ELYRA S.1) で蛍光画像を取得した。軸索ガイダンス受容体のニューロピリン1はモノクローナル抗体 (R&D Systems, #AF566) または Nrp1-GFP 発現ベクターで可視化した。成長円錐に発現させた SuperNova-コフィリンを 595nm の LED 照明 (Thorlab Japan) を照射してコフィリンの不活性化を行った。GFP-Sema3a は HEK-293T 細胞にトランスフェクションし、その培養上清を成長円錐に投与することで、成長円錐表面に結合する Sema3a を検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 成長円錐の垂直方向に伸びる非接着性フィロポディアの発見

超解像顕微鏡 3D-SIM でファロイジン染色した成長円錐を 110 nm ごとに断層撮影すると、F-アクチンは成長円錐の非接着面側に沿ってアクチン束(マイクロスパイク)を形成していた。全反射照明蛍光(TIRF)による観察、および膜骨格タンパク質 4.1N と F-アクチンの2重免疫染色の結果から、成長円錐の F-アクチンが接着面ではなく、非接着面の形質膜に沿って分布することが分かった(図2)。非接着面の F-アクチンは先端に向かって伸びるだけでなく、短い微小突起(フィロポディア)を多数形成していた(図2)。この非接着性のフィロポディアの多くは成長円錐の中心領域との境界に近い周辺領域で検出され、先端に対して 10~90度の角度で伸びていた。GFP-アクチンによるライブイメージングにより、非接着性のフィロポディアは約1分前後で伸長と退縮を繰り返すことが分かった。

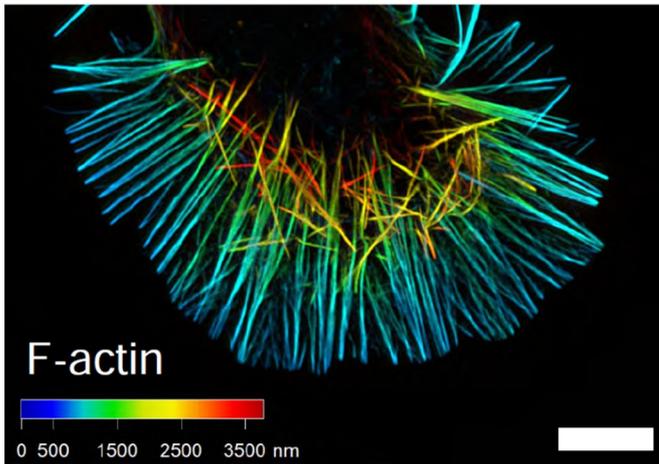


図2 ファロイジン染色した成長円錐の3D-SIM像  
基底面からの高さで色付けされている。黄色と赤色が非接着性のフィロポディア。スケールバーは2  $\mu\text{m}$ 。

(2) 非接着性フィロポディアはコフィリンによってターンオーバーが促進されている

成長円錐の形態を維持しているアクチン束(マイクロスパイク)と非接着性のフィロポディアに含まれるアクチン結合タンパク質の比較を行った。アクチン重合を促進するNPFs (nucleation-promoting factors) の1つであるVASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein)はマイクロスパイク先端と同じく非接着性フィロポディアの先端にも局在した。アクチン重合阻害剤のサイトカラシンD投与によって、先端のアクチン重合端に結合するVASPを強制的に解離させると、直ぐに成長円錐内で非接着性フィロポディアに似た、多数のVASP局在とF-アクチン集積が検出された。アクチン束化因子のファシンはマイクロスパイクよりも約10%程度多く、非接着性フィロポディアに集積した。一方、アクチン切断因子のコフィリンは非接着性フィロポディアに先端より約2.5倍多く存在していた(図3)。

非接着性フィロポディアの形成にコフィリンが寄与していることを確かめるため、光刺激でコフィリンを不活性化できるSuperNova-コフィリンを成長円錐に発現させた。赤色光を照射すると、非接着性フィロポディアの数が約3倍に増加した。この結果は、コフィリンが非接着性フィロポディアを構成するF-アクチンのターンオーバーを促進していることを示唆している。

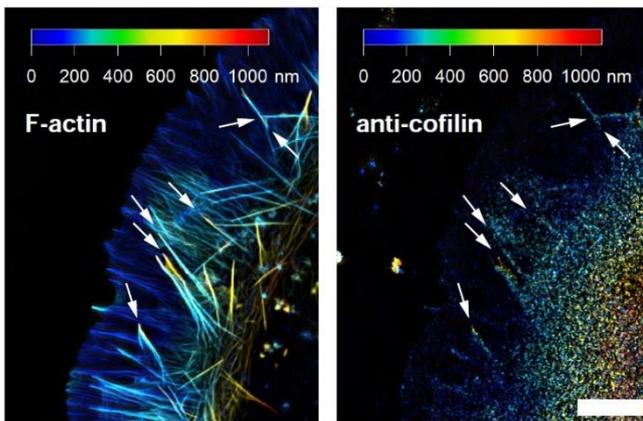
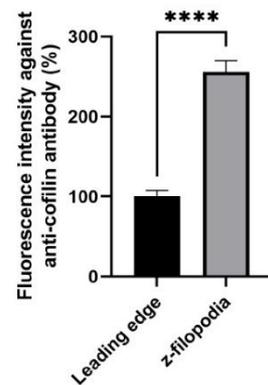


図3 非接着性フィロポディアにおけるコフィリンの局在



スケールバーは2  $\mu\text{m}$ 。

(3) 非接着性フィロポディアには軸索ガイダンス受容体のニューロピリン-1が集合し、効率的なりガンド捕捉を行う

抗体による免疫染色で非接着性フィロポディアに局在する軸索ガイダンス受容体の探索を行った。ニューロピリン-1の抗体は非接着性フィロポディアを明瞭に染色した(図4)。ニューロピリン-1は先端領域と比較して、100倍近く非接着性フィロポディアに集積していた。このニューロピリン-1の局在は、コレステロール除去剤のメチルシクロデキストリンによって阻害されたため、脂質ラフト依存性である可能性が高い。

GFP-Sema3aを含む培養上清を成長円錐に投与したところ、非接着性フィロポディア上に結合したSema3aが検出された。これらの結果から、成長円錐がニューロピリン-1が集積した非接着性フィロポディアを頻りに伸長を繰り返すことで、水溶性リガンドであるSema3aを積極的に捕捉することが示唆された。加えて、非接着性フィロポディアにはエンドフィン介在性エンドサ

イトーシスの関連分子が高頻度で集合しており、脂質ラフト依存的にニューロピリン-1 受容体を回収する可能性も示唆される。

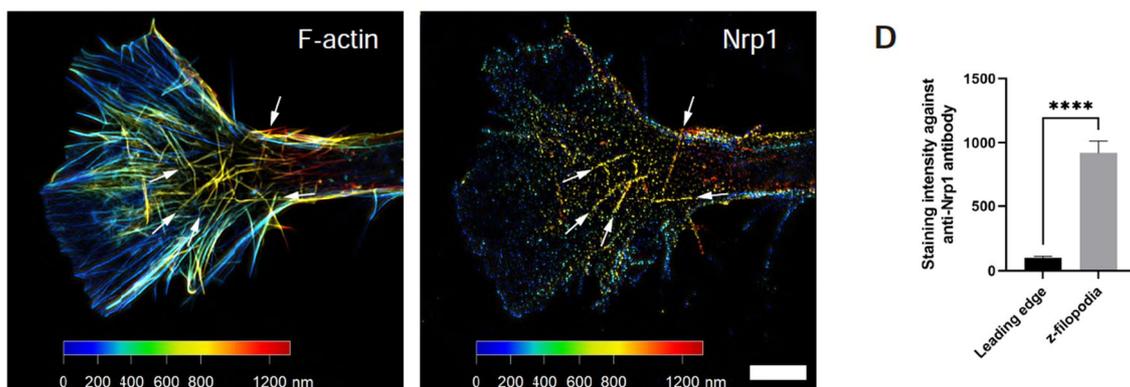


図4 非接着性フィロポディアにおけるニューロピリン-1(Nrp1)の局在  
スケールバーは2  $\mu\text{m}$ 。

<参考文献>

- 1) Nozumi M, Nakatsu F, Katoh K, Igarashi M. Coordinated Movement of Vesicles and Actin Bundles during Nerve Growth Revealed by Superresolution Microscopy. *Cell Rep.* 2017 Feb 28;18(9):2203-2216. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.008.
- 2) Igarashi M, Nozumi M, Wu LG, Cella Zanacchi F, Katona I, Barna L, Xu P, Zhang M, Xue F, Boyden E. New observations in neuroscience using superresolution microscopy. *J Neurosci.* 2018 Oct 31;38(44):9459-9467. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1678-18.2018.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wei Ran, Sugiyama Arika, Sato Yuta, Nozumi Motohiro, Nishino Hironori, Takahashi Miyuki, Saito Taro, Ando Kanae, Fukuda Mitsunori, Tomomura Mineko, Igarashi Michihiro, Hisanaga Shin-ichi	4. 巻 168
2. 論文標題 Isoform-dependent subcellular localization of LMTK1A and LMTK1B and their roles in axon outgrowth and spine formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 23 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Doki Chihiro, Nishida Kohei, Saito Shoma, Shiga Miyuki, Ogara Hikari, Kuramoto Ayumu, Kuragano Masahiro, Nozumi Motohiro, Igarashi Michihiro, Nakagawa Hiroyuki, Kotani Susumu, Tokuraku Kiyotaka	4. 巻 168
2. 論文標題 Microtubule elongation along actin filaments induced by microtubule-associated protein 4 contributes to the formation of cellular protrusions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 295 ~ 303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Igarashi Michihiro, Nozumi Motohiro, Wu Ling-Gang, Cella Zanacchi Francesca, Katona Istvan, Barna Laszlo, Xu Pingyong, Zhang Mingshu, Xue Fudong, Boyden Edward	4. 巻 38
2. 論文標題 New observations in neuroscience using superresolution microscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 9459 ~ 9467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1678-18.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Igarashi Michihiro, Honda Atsuko, Kawasaki Asami, Nozumi Motohiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Neuronal Signaling Involved in Neuronal Polarization and Growth: Lipid Rafts and Phosphorylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2020.00150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okada Masayasu, Kawagoe Yosuke, Sato Yuta, Nozumi Motohiro, Ishikawa Yuya, Tamada Atsushi, Yamazaki Hiroyuki, Sekino Yuko, Kanemura Yonehiro, Shinmyo Yohei, Kawasaki Hiroshi, Kaneko Naoko, Sawamoto Kazunobu, Fujii Yukihiko, Igarashi Michihiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Phosphorylation of GAP-43 T172 is a molecular marker of growing axons in a wide range of mammals including primates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00755-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Motohiro Nozumi, Michihiro Igarashi
2. 発表標題 3D analysis of the intracellular structures in growth cones using superresolution microscopy
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motohiro Nozumi
2. 発表標題 New relationships between F-actin organization and membrane trafficking in the growth cone revealed by SIM
3. 学会等名 Neuroscience 2018, Society for Neuroscience (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motohiro Nozumi, Michihiro Igarashi
2. 発表標題 Structured illumination microscopy (SIM) reveals a 3D intracellular structure in the neuronal growth cones
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会 年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野住素広
2. 発表標題 先端端におけるアクチン束の空間分布が局所的エンドサイトーシス、受容体局在を決定付ける
3. 学会等名 2019年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motohiro Nozumi, Michihiro Igarashi
2. 発表標題 Super-resolution imaging unveils the novel structures in growth cones
3. 学会等名 第63回日本神経化学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Motohiro Nozumi, Michihiro Igarashi
2. 発表標題 Actin reorganization and plasma membrane trafficking in three-dimensional space of nerve growth cones
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回 日本生理学会大会 合同大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本多 敦子、野住 素広、内野 春希、有田 誠、五十嵐 道弘
2. 発表標題 神経発生における極長鎖脂肪酸合成酵素GPSN2の生理機能
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

超解像顕微鏡SIMで撮影した写真がJournal of Neuroscienceの表紙に掲載  
[https://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2/news/index.html#anq\\_h45](https://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2/news/index.html#anq_h45)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊藤 泰行  (Ito Yasuyuki)  (70710573)	新潟大学・医歯学系・助教    (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	CNRS			