

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650162

研究課題名(和文) 新型走査型プローブ顕微鏡を用いた成長円錐の構造非対称性の証明

研究課題名(英文) Structural asymmetry of the growth cone observed by the novel scanning microscopy

研究代表者

五十嵐 道弘 (IGARASHI, MICHIMIRO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50193173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：成長円錐の静止画像を明確に獲得する方法論を確立した。現時点では、培養系で20分程度で画像を取得することができ、明瞭な3D画像が得られた。これは初代培養系(マウス大脳皮質)および神経系株細胞(PC12, NG108)で成功した。Z軸方向での盛り上がりは正確にとらえられ、大多数が非対称であった。成長円錐の表面のくぼみのクラスターは培養72時間後の成長円錐で最も顕著となり、成長円錐の構造上は非対称であって通常は片側、すなわち伸びて曲がっていく方向で顕著となることが推測された。

研究成果の概要(英文)：We postulated the observation methods of the growth cone using the novel scanning microscopy called scanning ion-conductance microscopy (SICM). At least for 20 min, we could obtain the clear micrographs of the growth cone both in the cortical neurons and in NG108-15 cells using SICM. We observed the clusters of the small pits on the surface of the growth cone. These structures were maximally observed after 3 days from the culture. They were asymmetrically distributed, namely, they were concentrated on the only one side of the growth cone.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：成長円錐 イオン伝導顕微鏡 3D画像 神経成長 イメージング

1. 研究開始当初の背景

成長円錐は神経回路形成に決定的に重要な装置である。この運動性に富んだ構造が神経細胞の先端に形成され、正しい経路に沿って伸長する。その機構を明らかにするため、申請者はプロテオミクスを用いて、成長円錐の機能の特徴づける分子群を明らかにした (Nozumi, Igarashi, et al. PNAS, 2009)。しかし、これらの分子が成長円錐構造のどこに局在するかを解明しなければ機能的な説明は困難であるため、特に成長円錐の3次元構造に興味を持った。また、軸索ガイダンスとの関係で成長円錐の構造非対称性(伸びる方向に、細胞内の構造が左右非対称に分布して伸長する)が仮説として提唱されたが、これも3次元微細形態による実証がなければ、水掛け論に過ぎない。このような状況下で、たまたま申請者の所属機関に、細胞の3次元超微形態が測定可能で、侵襲性がほとんどない新規デバイス「イオン伝導顕微鏡 (scanning ionic conductance microscopy; SICM)」が貸与され、試行で同装置による成長円錐の形態を観たところ、多数のクレーター(陥凹)のクラスター、およびZ軸方向の盛り上がり、明らかに非対称性を示すと考えられた。これは従来の光学顕微鏡では、共焦点レーザー顕微鏡などでも全く見えない構造で、成長円錐構造非対称性が3次元的に作られることを実証する最大の機会と考えた。国内外を通じて、成長円錐の3次元構造は哺乳動物の中枢ニューロンでは全く研究がなく、本装置は新規のデバイスであるため、3次元構造に基づく非対称性の証明、という成長円錐機能の革新的結果が得られる可能性があり、本課題を挑戦的萌芽研究として提案した。

2. 研究の目的

走査型プローブ顕微鏡の1種であるイオン伝導顕微鏡 SICM は、細胞の3次元構造を観察する上で、最新鋭の最も理想的な高解像度顕微鏡である。申請者はこの装置を用いて予備的に検討したところ、哺乳動物中枢ニューロンの成長円錐が、ガイダンス分子なしでも非対称的な3次元構造を取ることで、成長円錐の一部に非対称に多数のクレーター(陥凹)のクラスターが分布すること(このような挑戦的な解釈しかできない画像)を見出した。これらの知見は全く従来の光学顕微鏡画像では見いだせない情報であり、その意義は成長円錐の機能及び分子配置に決定的に重要な寄与を有すると想定される。よって、その解明のため、まだ当装置では世界的に成功していないリアルタイムイメージングに挑戦し、神経成長の機構に迫る新規イメージング法を確立することとした。

3. 研究の方法

神経細胞の初代培養(マウス大脳皮質)

および神経系株細胞(PC12, NG108-15)の培養・分化系を用いて、これらの成長円錐に関する画像取得を、SICM法を用いて行った。観察に関しては、120時間までの連続的な観察を行い、画像を取得した。またこれらの細胞について、免疫細胞染色を行って分子の状態を解析した。培養及び免疫染色、従来法との成長円錐像との対比は、代表者の五十嵐が、画像取得技術の開発は分担者の牛木が主に推進した。

4. 研究成果

- 1) 成長円錐の静止画像の完全取得: SICM法に関する成長円錐画像は研究課題開始当初、まだ完全に確立されていなかったため、これを確立することにした。培養条件を設定の後、最終的に固定標本については20分間以内に完全な画像を取得することに成功した。これは初代培養系、培養株細胞系で形状の異なりはあったものの、それを含めて描出できた。
- 2) 成長円錐のリアルタイム画像取得: リアルタイムイメージングを行うために、解析を進めた。これまで成長円錐はAFMなどで直接のスキャンニングを行うと退縮しやすく、観察することが難しかったが、少なくともSICM法では基本的に画像取得が可能であった。但し、成長円錐の運動性が速いので、形態取得はまだ完全に満足すべき結果は得られなかった。一方、予備的に30分で培養したところ、移動の速さが抑えられて形態がよりよい結果が得られた。
- 3) 成長円錐の特異構造の解析: すでに予備的な実験で、成長円錐に陥凹のクラスターが形成されているのを見たが、それを詳細に解析した。まずこのクラスターを観察できるのはすべての成長円錐に存在しているわけではなく、神経成長に基づいて増加し、培養72時間で最大となった。これらの存在は成長円錐の片側に局在しており、偏在性を定量することが可能な画像取得ができた。
- 4) 成長円錐のZ軸方向の計測: 計測の結果、成長円錐の中間部分まで、約5 μ mのZ軸方向の隆起が観察された。これは遠位部軸索から連続しているため、微小管によるものと確定された。これは従来型の、無脊椎動物や末梢神経の成長円錐が極めて平板な構造をしているのに比べて大きな差異があることを明確に示す知見であった。
- 5) 神経成長の非対称性の解析: これは予備的な解析を行って、明らかに微小管の分布は非対称性であることが明確となった。微小管の免疫染色を確実化する必要が残った。

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11件)

1. Namba, T., Kibe, Y., Funahashi, Y., Nakamuta, S., Takano, T., Ueno, T.,

Shimada, A., Kozawa, S., Okamoto, M., Shimoda, Y., Oda, K., Wada, Y., Masuda, T., Sakakibara, A., Igarashi, M., Miyata, T., Faivre-Sarrailh, C., Takeuchi, K., *Kaibuchi, K. (2014) Pioneering axons regulate neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Neuron* 81: 814-829. 査読：有

2. Nagaoka, T., Ohashi, R., Inutsuka, A., Sakai, S., Fujisawa, N., Yokoyama, M., Huang, YH., Igarashi, M., *Kishi, M. (2014) The Wnt/Planar Cell Polarity Pathway Component Vangl2 Induces Synapse Formation through Direct Control of N-Cadherin. *Cell Rep.* 6: 916-927. 査読：有

3. Uemura, S., Nagaoka, T., Yokoyama, M., Igarashi, M., *Kishi, M. (2013) A simple and highly efficient method to identify the integration site of a transgene in the animal genome. *Neurosci. Res.* pii: S0168-0102(13)00267-8. 査読：有

4. Watanabe, Y., Katayama, N., Takeuchi, K., Togano, T., Itoh, R., Sato, M., Yamazaki, M., Abe, M., Sato, T., Oda, K., Yokoyama, M., Takao, K., Fukaya, M., Miyakawa, T., Watanabe, M., Sakimura, K., Manabe, T., *Igarashi, M. (2013) Point mutation in syntaxin-1A causes abnormal vesicle recycling, behaviors, and short term plasticity. *J. Biol. Chem.* 288: 34906-34919. 査読：有

5. Takeuchi, K., Yoshioka, N., Higa Onaga, S., Watanabe, Y., Miyata, S., Wada, Y., Kudo, C., Okada, M., Ohko, K., Oda, K., Sato, T., Yokoyama, M., Matsushita, N., Nakamura, M., Okano, H., Sakimura, K., Kawano, H., Kitagawa, H., *Igarashi, M. (2013) Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. *Nat. Commun.* 4:2740. doi: 10.1038/ncomms3740. 査読：有

6. Ando, K., Kudo, Y., Aoyagi, K., Ishikawa, R., Igarashi, M., *Takahashi, M. (2013) Calmodulin-dependent regulation of neurotransmitter release differs in subsets of neuronal cells. *Brain Res* 1535: 1-13. 査読：有

7. 中島真人, 牛木辰男: 走査型イオン電導顕微鏡とその生物応用. *生物物理* 53: 40-3 (2013) 査読：有

8. Oyamatsu, H., Koga, D., *Igarashi, M., *Shibata, M., *Ushiki, T. (2012) Morphological assessment of early axonal regeneration in end-to-side nerve coaptation models. *J. Plast. Surg. Hand. Surg.* 46: 299-307. 査読：有

9. *五十嵐 道弘 (2012) 成長円錐の蛋白質構成から見たその機能的分子基盤. *生化学*

84: 753-766 (日本生化学会依頼総説) 査読：有

10. Ushiki T, Nakajima M, Choi M, Cho SJ, Iwata F (2012) Scanning ion conductance microscopy for imaging biological samples in liquid: a comparative study with atomic force microscopy and scanning electron microscopy. *Micron* 43(12):1390-8. 査読：有

11. Koga D, Nakajima M, Ushiki T (2012) A useful method for observing intracellular structures of free and cultured cells by scanning electron microscopy. *J Electron Microscop* (Tokyo) 61(2):105-11. 査読：有

〔学会発表〕(計 36 件)

1. 岡田正康、河寄麻実、武内恒成、五十嵐道弘：末梢神経再生における GAP-43 リン酸化制御。第 19 回グリアクラブ、2014.3.1、KKR 湯沢ゆきぐに(新潟)

2. 吉岡望、武内恒成、五十嵐道弘：Perineuronal nets の発達に関する分子解剖学。第 19 回グリアクラブ、2014.3.1、KKR 湯沢ゆきぐに(新潟)

3. 河寄麻実、岡田正康、吉岡望、野住素広、武内恒成、五十嵐道弘：GAP-43 の新規リン酸化部位の解析。第 19 回グリアクラブ、2014.3.1、KKR 湯沢ゆきぐに(新潟)

4. 中島真人, 野住素広, 五十嵐道弘, 牛木辰男: 走査型イオン伝導顕微鏡を用いた成長円錐の微細構造解析。第 19 回グリアクラブ, 湯沢, 2014.2.28~3.2

5. 中島真人, 牛木辰男: 走査型イオン伝導顕微鏡による液中培養細胞観察。日本顕微鏡学会 SPM 分科会: パイオ系 SPM 研究会湯沢, 2013.12.8~12.9

6. 佐藤駿平、渡邊裕美、武内恒成、五十嵐道弘：シナプス小胞エキソサイトーシスへのカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMKII) の関与；変異 Syntaxin-1A(R151G)の解析。第 36 回日本分子生物学会年会、2013.12.5、神戸国際展示場(兵庫)

7. 渡邊裕美、片山憲和、武内恒成、高雄啓三、宮川剛、崎村建司、真鍋俊也、五十嵐道弘：前シナプス可塑性の変化に関する、変異シタキシン 1 A (R 1 5 1 G) ノックインマウスと、カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) 改変マウスの類似性。第 36 回日本分子生物学会年会、2013.12.5、神戸国際展示場(兵庫)

8. 本多敦子、武内恒成、五十嵐道弘：ラミニン刺激に基づく神経極性決定の分子機構。Laminin-dependent molecular machinery for the determination of neuronal polarity. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013.12.5、神戸国際展示場(兵庫)

9. 河寄麻実、岡田正康、吉岡望、野住素広、武内恒成、五十嵐道弘：GAP-43 の新規のリン

酸化は JNK の下流で軸索伸長を促進する。第 36 回日本分子生物学会年会、2013.12.4、神戸国際展示場（兵庫）

10. 武内恒成、本多敦子、伊藤泰行、峯田克彦、五十嵐道弘：神経極性決定に關与する 4 回膜貫通 glycoprotein M6a の機能解析。第 36 回日本分子生物学会年会、2013.12.3、神戸国際展示場（兵庫）

11. 武内恒成、吉岡望、岡田正康、五十嵐道弘：CSGαINAcT1, an Enzyme Required for Chondroitin Sulfate Synthesis, is Critical to Recovery from Neural Injury. Neuroscience2013、2013.11.10、San Diego Convention Center（アメリカ）

12. 牛木辰男、中島真人：走査型イオン伝導顕微鏡による細胞の液中イメージング。平成 25 年度表面科学学会中部支部研究会、金沢、2013.10.25。（招待講演）

13. 武内恒成：New trial of gene knockdown system by the siRNA-absorbent silk sponge to recovery from spinal cord injury. AMWC(Advanced Materials World Congress 2013)、2013.9.18、İzmir, Çeşme（トルコ）

14. Ushiki T, Nakajima M: Imaging of cells and tissues by scanning ion conductance microscopy. 23rd International Symposium on Morphological Sciences, Niigata, 2013.9.10~9.13.（シンポジウム講演）

15. Nakajima M, Ushiki T: Scanning ion conductance microscopy for imaging cultivated cells, in comparison with scanning electron microscopy. 23rd International Symposium on Morphological Sciences, Niigata, 2013.9.10~9.13.（ポスター）

16. 吉岡望、比嘉進、武内恒成、五十嵐道弘：コンドロイチン硫酸合成酵素欠損マウスにおける神経発生・発達異常。第 86 回日本生化学会大会、2013.9.12、パシフィコ横浜（神奈川）

17. 武内恒成、五十嵐道弘：Abnormal brain development/maturation in mice lacking in chondroitin sulfate-synthesizing enzymes. ECMNET(European cooperation in science and technology).2013.9.11、Hotel Remes（ポーランド）

18. 吉岡望、武内恒成、五十嵐道弘：コンドロイチン硫酸合成酵素欠損マウスにおけるペリニューラルネットの解析。包括脳ネットワーク夏のワークショップ、2013.8.31、名古屋国際会議場（愛知）

19. 岡田正康、河寄麻実、武内恒成、五十嵐道弘：リン酸化プロテオミクスにより同定された GAP-43 の新規リン酸化部位は、軸索成長・再生の分子マーカーとなる。脳内環境夏の領域班会議、2013.8.29、京都大学医学芝蘭会館（京都）

20. Ushiki T, Nakajima M: Scanning ion conductance microscopy for imaging

biological samples. 15th International Scanning Probe Microscope Conference, Dijon (France), 2013.6.30~7.3.（国際会議発表）

21. Nakajima M, Ushiki T: Scanning ion conductance microscopy for imaging cultivated cells, in comparison with scanning electron microscopy. 15th International Scanning Probe Microscope Conference, Dijon (France), 2013.6.30~7.3.（国際会議発表）

22. 河寄麻実、野住素広、武内恒成、五十嵐道弘：神経成長円錐マーカー分子 GAP43 新規リン酸化ドメインとその認識抗体の応用。第 35 回神経組織培養研究会、2013.6.30、ホテル阪急エキスポパーク（大阪）

23. 渡邊裕美、片山憲和、武内恒成、崎村建司、真鍋俊也、五十嵐道弘：シタキシン 1A-CaMK 相互作用によるシナプス短期可塑性の制御。Neuro2013（第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神経化学学会大会、第 23 回日本神経回路学会大会）、2013.6.22、国立京都国際会館（京都）

24. 吉岡望、武内恒成、岡田正康、和田芳野、川野仁、五十嵐道弘：コンドロイチン硫酸合成酵素欠損マウスにおける神経発生・発達異常。Neuro2013（第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神経化学学会大会、第 23 回日本神経回路学会大会）、2013.6.22、国立京都国際会館（京都）

25. 河寄麻実、武内恒成、野住素広、五十嵐道弘：成長円錐における網羅的なリン酸化タンパク質の探索。Comprehensive searching of phosphorylated protein of the growth cone. Neuro2013（第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神経化学学会大会、第 23 回日本神経回路学会大会）、2013.6.22、国立京都国際会館（京都）

26. 野住素広、加藤薫、武内恒成、五十嵐道弘：成長円錐におけるアクチン再編に伴う小胞輸送。Neuro2013（第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神経化学学会大会、第 23 回日本神経回路学会大会）、2013.6.21、国立京都国際会館（京都）

27. 本多敦子、武内恒成、五十嵐道弘：M6a-M6BP-Rap2 タンパク質複合体を介した大脳皮質におけるラミニン依存性の神経極性決定制御。Neuro2013（第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神経化学学会大会、第 23 回日本神経回路学会大会）、2013.6.20、国立京都国際会館（京都）

28. 武内恒成、吉岡望、比嘉進、川野仁、五十嵐道弘：グリコサミノグリカン発現制御による神経再生・発生。第 118 回日本解剖学会総会（招待講演）、2013.3.28~3.30、香川国際会議場（香川）

29. 武内恒成、吉岡望、比嘉進、川野仁、五十嵐道弘：グリコサミノグリカン発現制御による神経再生・発生。第 118 回日本解剖学会総会（招待講演）、2013.3.28~3.30、香川国

際会議場（香川）

30.河峯麻実、武内恒成、野住素広、和田芳野、五十嵐道弘：神経発生/再生に関する神経成長円錐 GAP-43 の新規リン酸化部位とその解析。

第 85 回日本生化学会大会、2012.12.14 ~ 2012.12.16、福岡国際会議場（福岡）

31.渡邊裕美、武内恒成、崎村建司、五十嵐道弘：シタキシン 1A (R151G) KI マウスにおける SNARE 複合体構成の変化。第 85 回日本生化学会大会、2012.12.14 ~ 12.16、福岡国際会議場（福岡）

32.本多敦子、武内恒成、五十嵐道弘：Asymmetric Localization of Glycoprotein M6a is Involved in Laminin-dependent Determination of Neuronal Polarity.第 35 回日本分子生物学学会年会、2012.12.11 ~ 12.14、福岡国際会議場（福岡）

33.五十嵐道弘：Proteomic Analysis Reveals the Growth Cone Research.日本脳科学情報交換セミナー（招待講演）2012.10.10 ~ 10.12、New Orleans Hilton(アメリカ合衆国)

34.五十嵐道弘：神経成長・再生を調整する分子群の役割。神経科学・構造生物学融合研究会（招待講演）2012.10.4 ~ 10.5、大阪蛋白質研究所（大阪）

35.吉岡望、武内恒成、阿相皓晃、木村 - 黒田純子、五十嵐道弘、川野仁：損傷脳におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの産生メカニズム。第 35 回日本神経科学会、2012.9.18 ~ 9.21、名古屋国際会議場（愛知）

36.五十嵐道弘：リン酸化プロテオミクスの威力とそれに基づく新しい世界観。包括脳夏のワークショップ（招待講演）2012.7.21 ~ 7.25、仙台国際会議場（宮城）

〔図書〕(計 1 件)

生木 辰男 (2013) 入門組織学(改訂第二版) 南江堂 (ISBN 978-4-524-21617-8)

総ページ：296 ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：抗 Gap43 抗体

発明者：Michihiro Igarashi, Kosei TAKEUCHI, Motohiro NOZUMI, Asami KAWASAKI

権利者：国立大学法人新潟大学

種類：特許

番号：PCT/JP2012/077163

出願年月日：2013 年 4 月 25 日

国内外の別：国内

取得状況(計 1 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

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2>

6. 研究組織

(1)研究代表者 五十嵐 道弘

(Igarashi Michihiro)

(新潟大学・医歯学系・教授)

研究者番号：50193173

(2)研究分担者 牛木 辰男

(Ushiki Tatsuo)

(新潟大学・医歯学系・教授)

研究者番号：40184999

(3)連携研究者

()

研究者番号：