

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：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700318

研究課題名(和文) 神経成長における極長鎖脂肪酸伸長酵素の役割

研究課題名(英文) Membrane dynamics and fatty acid elongation in 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)：脂肪酸は鎖長や不飽和数の多様性を生み出すことで膜脂質の性質を調節しており、神経成長に必要な極長鎖脂肪酸伸長酵素は成長円錐の膜輸送にも関与すると考えられる。小胞蛋白質のGFPライブライメーキングで成長円錐周辺領域の小胞がアクチン束の交差や束化の極めて近傍で生じ、薬理学的実験により、それらの小胞がアクチン逆行性流動で逆行性輸送されることを明らかにした。アクチン結合蛋白質ファシンをノックダウンしてアクチン束形成を抑制した結果、周辺領域の小胞数も著しく減少した。これらの小胞はクラスリンが介在しないエンドフィリンによるエンドサイトーシスで生じることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The growth cone is a highly motile structure in the growing tip of a neurite at the stages of the neuronal development and regeneration. To visualize the vesicular trafficking and actin reorganization of the growth cone in detail simultaneously, we analyzed the dynamics of GFP-synaptophysin and mCherry-actin in the growth cone of NG108-15 cells, using a superresolution microscopy. We found that the vesicles arose near the root portions of filopodia, and most of them were retrogradely moving along the actin bundles. Both of such events were inhibited by actin polymerization inhibitors or a myosin light-chain kinase inhibitor. RNAi of fascin also decreased the numbers of vesicles localized at the leading edge. Moreover, the retrogradely moving vesicles were not colocalized with clathrin but with endophilin and dynamin. These results suggest that there is a novel mechanism of membrane retrieval in the growth cone.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経科学

1. 研究開始当初の背景

炭素数が 20 以上の脂肪酸 (極長鎖脂肪酸) は神経成長、正常な精神発達に必要であると考えられているが、その分子機構は明確になっていない。申請者らはプロテオミクス解析で成長円錐に極長鎖脂肪酸の合成と輸送に関わる蛋白質を多数同定し、成長円錐に濃縮する極長鎖脂肪酸伸長酵素 Tscr が軸索伸長に必要であることを突き止めた。

2. 研究の目的

Tscr ノックアウトマウスの表現型解析により、成長円錐における神経成長に不可欠な極長鎖脂肪酸の役割を明らかにする。蛍光プローブによる超解像度ライブイメージングで、成長円錐細胞膜の動態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 極長鎖脂肪酸伸長酵素 Tscr を標的とするターゲティングベクターの構築からキメラマウス作製を行った。TLCN-Cre マウスと Tscr-flox マウスの交配で Tscr ノックアウトマウスを作出した。

(2) 成長円錐の膜動態を高解像度で明らかにするため、神経芽細胞腫 NG108-15 細胞に小胞蛋白質を GFP 融合蛋白質として発現させて超解像顕微鏡による観察を行った。

4. 研究成果

(1) Tscr ノックアウトマウスのヘテロ接合型は正常に成長するが、ホモ接合型は胎生致死であった。成長円錐のリピドミクス解析では、ホスファチジルセリン (22:3 / 22:6)、(20:0 / 22:6) やホスファチジルイノシトール (18:0 / 20:5) が成長円錐膜にのみ含まれることを発見した。括弧内の数字は炭素数と不飽和数を表しており、22:6 はドコサヘキサエン酸、20:5 はエイコサペンタエン酸でいずれも必須脂肪酸として知られる。また抗体による免疫染色により、極長鎖脂肪酸伸長酵素は 4 つの酵素のうち、成長円錐には Tscr のほかに Elovl6、KAR が濃縮していることを確認することができた。これらの結果から、成長円錐に特定の脂肪酸を供給する機構が存在することが示唆された。

(2) 成長円錐先端部では多くの小胞が逆行性に移動し、その速度がアクチン逆行性流動とほぼ一致した。アクチン逆行性流動に参与するミオシン軽鎖キナーゼの阻害剤で小胞の移動速度が減少したことから、成長円錐の逆行性小胞輸送はアクチン逆行性流動を利用していることが強く示唆された。シナプトフィジン陽性の逆行性輸送小胞はアクチンの束が交差、束化される位置で生じることが明らかになった。このとき BAR ドメインをもつエンドフィリンとダイナミンが小胞蛋白

質のシナプトフィジンと共局在したが、クラスリンの集積はほとんど検出されなかった。成長円錐におけるエンドフィリンとクラスリンの分布を比較したところ、クラスリンが成長円錐の中心部、細胞基底面に多く検出されたのに対して、エンドフィリンはクラスリンより先端に近い領域に分布した。アクチン束形成に参与するアクチン結合蛋白質ファシンのノックダウンで成長円錐のエンドフィリン集積が阻害された。さらにマウス皮膚神経細胞の初代培養におけるエンドフィリンのノックダウンは軸索伸長を阻害した。これらの結果から、成長円錐にはクラスリン依存性のエンドサイトーシスとは異なるもう一つのエンドフィリンによるエンドサイトーシス機構が存在し、それは先端近傍で生じるアクチン束化によって誘導されることを強く示唆する。エンドフィリンによるエンドサイトーシスは神経成長に不可欠な細胞内物流に参与していると考えられる。

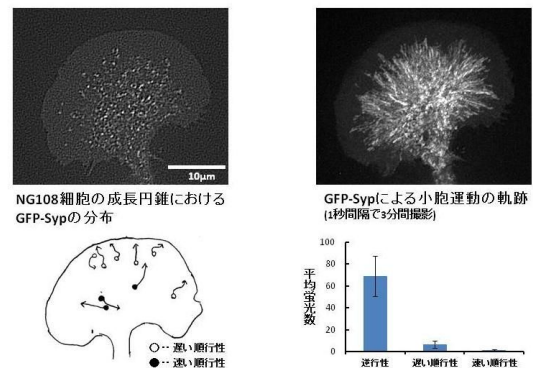


図1 成長円錐における小胞輸送の分類

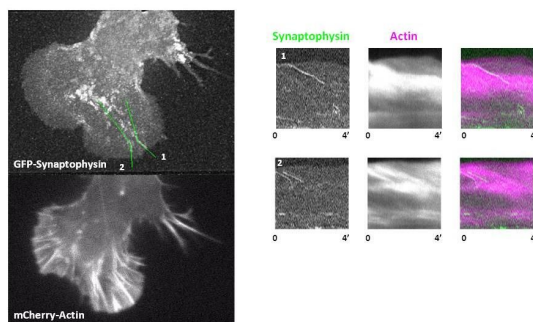


図2 逆行性小胞輸送とアクチン逆行性流動の関係

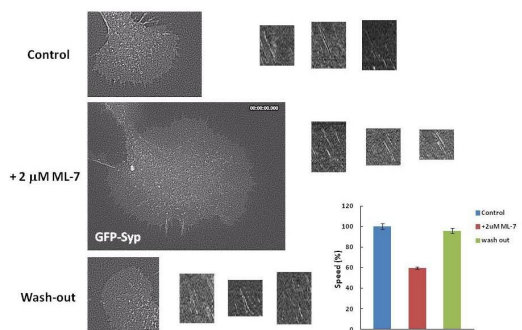


図3 ミオシン軽鎖キナーゼによる逆行性小胞輸送の阻害

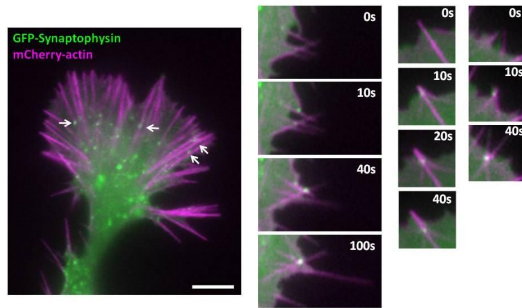


図4 アクチン束と小胞形成の様子

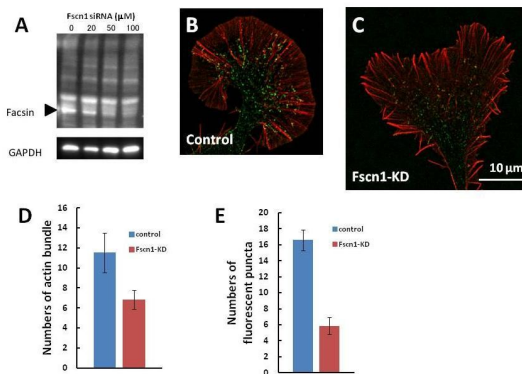


図5 ファシン蛋白質のノックダウンによる小胞数の変化

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0件)

[学会発表](計6件)

Nozumi M, Igarashi M. Actin dynamics control membrane recycling in the growth cone. BRI International Symposium 2015 2015年3月5日 新潟大学脳研究所(新潟県新潟市)

Nozumi M, Igarashi M. Membrane retrieval coincides with the filopodia formation in the neuronal growth cone. ASCB/IFCB Meeting 2014 2015年12月9日 Pennsylvania Convention Center (米国・フィラデルフィア)

Nozumi M, Igarashi M. Vesicular recycling and transport dependent upon F-actin rearrangement in the growth cone. 6th Special Conference of the International Society of Neurochemistry. 2014年9月21日 東京大学(東京都目黒区)

Nozumi M, Katoh K, Takeuchi K, Igarashi M. Vesicular transport with actin rearrangement in 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年6月21日 国立京都国際会館(京都府京都市)

野住 素広、加藤 薫、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 第85回日本生化学会大会 2012年12月15日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

Nozumi M, Katoh K, Igarashi M. Cooperative rearrangement of cytoskeletons and transported vesicles in the growth cone. 第35回日本神経科学大会 2012年09月21日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

[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:
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/index.html>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし