

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19700302

研究課題名(和文) マクロピノサイトーシスによる神経突起伸長の抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of macropinocytosis-mediated repulsive axon guidance

研究代表者

樺山 博之 (Kabayama Hiroyuki)

独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・客員研究員

研究者番号：10332339

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：反発性軸索誘導、マクロピノサイトーシス、セマフォリン、カルシウム

1. 研究計画の概要

神経突起伸長は神経回路形成に重要な過程であり、エクソサイトーシスによる細胞膜面積の増大により達成されると仮定されている。一方、突起伸長の抑制は間違っただ標的シナプス形成しないために必要な過程であるが、これはエクソサイトーシスの抑制により達成されると信じられている。しかし、申請者は神経突起伸長の抑制がエクソサイトーシスの抑制ではなく、マクロピノサイトーシスという特殊なエンドサイトーシスによる細胞膜の大規模な細胞内への回収により達成されるという、今までの概念を覆す発見をした。しかも、神経回路形成に重要であるカルシウムや反発性ガイダンス分子がマクロピノサイトーシスを誘導することで突起伸長を抑制している事を明らかにした。本研究ではそのマクロピノサイトーシスによる新規な神経回路形成機構を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の進捗状況

代表者はニワトリ胚、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 (Kabayama et al., *Mol. Cell. Neuroscience*. 2009)。

(1) カルシウムが反発性軸索誘導に重要である事は既に従来の研究で明らかにされていたが、カルシウムがどのように反発性軸索誘導を起こすのかは不明であった。申請者は細胞内カルシウムストアのリアノジン受容体からのカルシウム放出によって、成長円錐に平均面積が $1.5 \mu\text{m}^2$ の vacuole が形成されること、この vacuole がマクロピノサイトーシスによるものであること、そして、典型的な

反発性軸索誘導分子であるセマフォリン3Aによってもマクロピノサイトーシスが誘導される事を明らかにした。

(2) さらに重要な事に、カルシウム上昇やセマフォリン3A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した初めての報告である。

(3) また、アクチン繊維の脱重合がカルシウム依存性のマクロピノサイトーシスに必須である事も示し、アクチン繊維の脱重合とそれに引き続くマクロピノサイトーシスによる大規模な細胞膜の回収が協調的に行われる事が成長円錐のコラプスに重要である事を示した。これは従来のアクチン骨格系を中心とする研究と膜動態を中心とする軸索誘導研究を結ぶ全く新しい概念を導入した事で重要である。

(4) さらに分子メカニズムと役割の解明を続け、セマフォリン3Aにより、プロテアソーム依存的に syntaxin が成長円錐で分解される事も判明した。さらに syntaxin の過剰発現によって、セマフォリン3Aによるマクロピノサイトーシスが抑制され、成長円錐のコラプスも抑制される事も明らかとなった。syntaxin の過剰発現によってセマフォリン3Aによる成長円錐の反発性旋回運動も抑制される事も明らかにした。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。研究課題の応募時の予備実験では軸索反発誘導分子

セマフォリン3Aにおける実験結果は予想していなかった成果であり、論文として誌上発表をすることが出来た。さらに詳細な分子メカニズム(上記研究の進捗状況(4))の成果を現在投稿中である。

4. 今後の研究の推進方策

研究計画は順調に遂行されている。現在投稿中の論文を年度内での受理を目指す。

5. 代表的な研究成果

(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 2件)

1. Kabayama H, Nakamura T, Takeuchi M, Iwasaki H, Taniguchi M, Tokushige N, Mikoshiba K. Ca²⁺ induces macropinocytosis via F-actin depolymerization during growth cone

collapse. *Molecular and Cellular Neuroscience* (2009) 40. 27-38. 査読あり

2. Kabayama H, Tokushige N, Takeuchi M, Mikoshiba K. Syntaxin 6 regulates nerve growth factor-dependent neurite outgrowth. *Neuroscience Letters*. (2008) 436. 340-344 査読あり

[学会発表] (計 2件)

1. 樺山博之、中村健、竹内誠、岩崎宏英、谷口雅彦、徳重直子、御子柴克彦 Ca²⁺ induces macropinocytosis via F-actin depolymerization during growth cone collapse 第36回 国際生理学会 2009年7月30日 国立京都国際会館
2. 樺山博之、中村健、竹内誠、岩崎宏英、谷口雅彦、徳重直子、御子柴克彦 Ca²⁺ induces macropinocytosis via F-actin depolymerization during growth cone collapse 第32回日本分子生物学会 2009年12月12日 パシフィコ横浜