

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500361

研究課題名（和文） 神経軸索ガイダンスを制御する成長円錐形質膜の非対称性エンドサイトーシスの研究

研究課題名（英文） Asymmetric endocytosis across the growth cone that controls axon guidance

研究代表者

上口 裕之 (KAMIGUCHI HIROYUKI)

独立行政法人理化学研究所・神経成長機構研究チーム・チームリーダー

研究者番号：10233933

研究成果の概要（和文）：

神経細胞から伸びた軸索突起が標的に到達して神経回路が構築される。軸索先端部（成長円錐）は、細胞外のガイダンス因子を読み取り、正しい方向に旋回することができる。本研究課題では、反発性ガイダンス因子は細胞質カルシウムシグナルを介して成長円錐でのエンドサイトーシスを非対称化すること、このエンドサイトーシス非対称化は反発性旋回の必要十分条件であることが明らかになった。さらに、エンドサイトーシスとエキソサイトーシスのアンバランスが成長円錐の旋回を駆動することを証明した。

研究成果の概要（英文）：

Neuronal circuits are formed by axons that have elongated and reached their targets. The tip of each axon, called the growth cone, explores extracellular guidance cues and can turn in the appropriate direction. In this project, we found that repulsive cues cause asymmetric endocytosis across the growth cone via cytosolic  $Ca^{2+}$  signals and that this asymmetric endocytosis is both necessary and sufficient for repulsive guidance. We also showed that a localized imbalance between endocytosis and exocytosis drives growth cone turning.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：軸索；成長円錐；ガイダンス；エンドサイトーシス；エキソサイトーシス；カルシウム；カルシニューリン；サイクリン依存性キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

脳神経系の機能の中核を担う神経回路が

構築されるためには、発生段階の神経細胞の細胞体から伸長した軸索突起が標的細胞へと到達することが必要である。近年の神経科学領域の研究により、一部の先天性脳奇形や精神神経疾患の諸症状が神経回路の形成異常に起因することが示唆・実証されている。よって神経回路が形成される仕組みを解明することは、精神神経疾患の発症機序の理解に貢献するとともに、損傷された神経回路の再構築を目指す再生医療に新たな戦略を提供する。伸長過程にある軸索突起の先端部は成長円錐と呼ばれ、その細胞外環境に存在する軸索ガイダンス因子を認識しつつ標的へ向かって移動する。成長円錐の形質膜上には、これらのガイダンス因子の受容体が存在しており、成長円錐を正しい方向へ誘導するための細胞内シグナルを生成する。このような細胞内シグナルとして細胞質カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) が中心的な役割を担っており、ガイダンス因子の多くは  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを介して成長円錐の移動方向を制御する。すなわち、ガイダンス因子が成長円錐の受容体に非対称的に (成長円錐の片側でより多く) 結合すると、成長円錐細胞質に  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度勾配 (非対称性  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル) が発生し、成長円錐は旋回する。つまり、誘引性ガイダンス因子が成長円錐の片側に結合すると、結合側で  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが発生し、成長円錐は高  $\text{Ca}^{2+}$  側に旋回する (誘引)。一方、反発性ガイダンス因子が成長円錐の片側に結合すると、結合側で  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが発生し、成長円錐は低  $\text{Ca}^{2+}$  側に旋回する (反発)。このように、成長円錐の非対称性  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルは両方向性の旋回 (誘引と反発) を引き起こす。研究代表者の研究チームは、成長円錐の旋回方向を切り替える仕組みを探索し、細胞質への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入経路が誘引と反発を決定する主要因であることを発見した。具体的には、3型リアノジン受容体 ( $\text{RyR3}$ ) を介する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアから細胞質への  $\text{Ca}^{2+}$  放出 ( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release; CICR) は成長円錐を誘引し、CICR を伴わない  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルは成長円錐を反発することを明らかにした。

次に研究代表者らは、成長円錐の旋回を駆動する  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル下流経路を探索し、以下の知見を得た。(1) 成長円錐を誘引する  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルは、vesicle-associated membrane-protein 2 (VAMP2) を含む膜小

胞の前方輸送とエキソサイトーシスを促進することで、成長円錐の片側により多くの膜成分を挿入させる。(2) 成長円錐の誘引は VAMP2 を介するエキソサイトーシスを必要とするが、成長円錐の反発は VAMP2 依存性エキソサイトーシスを必要としない。これまでの国内外の研究では、成長円錐を前進させる駆動マシナリーの極性が逆転することにより、誘引と反発が切り替わると考えられていた。しかし応募者らの研究成果は、成長円錐の誘引はエキソサイトーシスの非対称化により駆動され、成長円錐の反発は異種の駆動マシナリーに依存することを示していた。そこで研究代表者は、反発性ガイダンスの駆動機構を研究し、クラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシス (クラスリンに被覆された形質膜の陥入部ピットが、ダイナミンの作用でちぎれて小胞となって細胞内に取り込まれる) が成長円錐の反発に必要であることを示唆する実験結果を得た。成長円錐の片側に誘引性  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル (CICR を伴う  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル) あるいは反発性  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル (CICR を伴わない  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル) を生成し、成長円錐の両方向性の旋回を誘起した。クラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスを阻害する各種薬剤 (monodancylcadaverine, Myr-P4, TyrphostinA23) で処理した成長円錐は、誘引性  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルに応答して旋回したが、反発性  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルには応答せず直進した。以上の結果は、反発性  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの下流で、クラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスが成長円錐の旋回を駆動することを示唆していた。

## 2. 研究の目的

上記の背景をふまえ、本課題の具体的な目標 (予想される結果) を下記の通り設定した。

(1) 成長円錐の反発性  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルがクラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスを非対称化することを証明する。(2) クラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスの非対称化が、反発性旋回を駆動する必要十分条件であるか否かを検証する。(3) 反発性  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルがクラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスを促進する分子メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

<エンドサイトーシスの定量的可視化> ニワトリ胚由来の脊髄感覚神経細胞を培養し、赤色蛍光蛋白質付加クラスリンと緑色蛍光蛋白質付加ダイナミンを遺伝子導入し、エバネッセント照射野での蛍光蛋白質の挙動を観察することで、成長円錐でのクラスリン被覆ピット/小胞の動態を単一ピット/小胞レベルで可視化した。成長円錐での単位面積・単位時間あたりのクラスリン被覆ピットの出現数をカウントすることで、クラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスを定量した。

<エキソサイトーシスの定量的可視化> エキソサイトーシスの前後で膜小胞内部は弱酸性から中性に変化することが知られている。VAMP2の小胞内腔側にpH感受性蛍光蛋白質を付加したコンストラクトを作製し、この融合蛋白質を発現する成長円錐での蛍光強度の変化を可視化解析することにより、エキソサイトーシスを定量した (Tojima et al., *Nature Neuroscience* 10: 58-66, 2007)。

<Ca<sup>2+</sup>シグナルの生成>

ケージドCa<sup>2+</sup> (NP-EGTA) を導入した成長円錐の片側に紫外線レーザーを照射してケージドCa<sup>2+</sup>を光解離し、誘引性あるいは反発性Ca<sup>2+</sup>シグナルを生成した (Tojima et al., *Neuron* 66: 370-377, 2010)。

<生理活性物質の細胞外濃度勾配作製>

微細ガラス管に各種生理活性物質 (軸索ガイダンス因子、エンドサイトーシス阻害剤、エキソサイトーシス促進剤など) を充填し、ガラス管の先端部を成長円錐の進行方向45°で50-100 μm離れた場所に置き、細胞外液中に生理活性物質を圧放出した (Akiyama et al., *Science Signaling* 2: ra34, 2009)。これにより作製した生理活性物質濃度勾配の成長円錐に及ぼす影響を、成長円錐の旋回角度およびエンドサイトーシス/エキソサイトーシスを定量することで解析した。

#### 4. 研究成果

成長円錐の細胞外に反発性ガイダンス因子 (セマフォリン3A) の濃度勾配を作製したところ、高濃度セマフォリン3Aに遭遇した片側でより多くのクラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスが観察された。また、成長円錐の片側に反発性Ca<sup>2+</sup>シグナルを生成すると、Ca<sup>2+</sup>シグナル側でより多くのクラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスが観察された。したがって、反発性ガイダンス因

子はCa<sup>2+</sup>シグナルを介して成長円錐でのエンドサイトーシスを非対称化することが判明した。

次に、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤である monodansylcadaverine (MDC) で処理した軸索が、反発性因子 (セマフォリン3A、ミエリン関連糖タンパク質) に応答するか否かを検証した。いずれの反発性因子も、MDC存在下では成長円錐を反発することはできなかった。さらに、細胞質Ca<sup>2+</sup>シグナルによる反発性旋回がエンドサイトーシスを必要とするか否かも検証した。エンドサイトーシスを阻害する各種変異タンパク質 (AP180<sub>C-terminus</sub>あるいはdynamin1<sub>K44A</sub>) を過剰発現した成長円錐は、反発性Ca<sup>2+</sup>シグナルに応答せずに直進した。以上の実験により、成長円錐での非対称的なクラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスが反発性軸索ガイダンスに必要であることが判明した。

次に、成長円錐での非対称的な膜動態は旋回を誘発するための十分条件であるか否かを検証した。成長円錐の細胞外液中にエンドサイトーシス阻害剤あるいはエキソサイトーシス促進剤の濃度勾配を作製して膜トラフイッキングを非対称化すると、成長円錐はエンドサイトーシス抑制側あるいはエキソサイトーシス亢進側に向かって旋回した。以上、エンドサイトーシスとエキソサイトーシスの非対称化は成長円錐の旋回を誘発する十分条件であることが判明した。

さらに、反発性Ca<sup>2+</sup>シグナルはCa<sup>2+</sup>依存性タンパク質脱リン酸化酵素カルシニューリンを介してクラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスを促進することを発見し、成長円錐の反発性旋回もカルシニューリン活性を必要とすることを証明した。しかし、誘引性Ca<sup>2+</sup>シグナルはクラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスに影響を及ぼさず、カルシニューリン活性あるいはクラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスを阻害しても誘引性旋回は抑制されなかった。誘引性Ca<sup>2+</sup>シグナルがクラスリン/ダイナミン依存性エンドサイトーシスを促進しないのは、誘引性Ca<sup>2+</sup>シグナルに含まれるCa<sup>2+</sup>誘発性Ca<sup>2+</sup>放出 (リアノジン受容体を介する小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出) がタンパク質リン酸化酵素 (カルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼ II (CaMKII) およびサイクリン依

存性キナーゼ5 (cdk5) を介してエンドサイトーシスを阻害することに起因することを見出した。これらキナーゼを阻害した成長円錐では、誘引性  $Ca^{2+}$  シグナルがエンドサイトーシスとエキソサイトーシスの両者を促進した。エンドサイトーシスとエキソサイトーシスの両者が亢進した状態では成長円錐は直進したが、各種阻害剤によりエンドサイトーシスとエキソサイトーシスの一方を抑制すると、成長円錐はエンドサイトーシス抑制側あるいはエキソサイトーシス亢進側に向かって旋回した。以上、エンドサイトーシスとエキソサイトーシスのアンバランスが成長円錐の旋回を駆動することを明らかにし、そのシグナル伝達機構の一端を解明した。

反発性軸索ガイダンスは、神経回路の形成過程だけでなく損傷した神経回路の再生不全にも関与する細胞応答であり、その駆動機構を解明することは神経発生再生分野の研究に重要な知見を提供するものと期待できる。

## 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 4 件)

①Tojima T, Hines JH, Henley JR, Kamiguchi H: Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering. *Nat Rev Neurosci* 12: 191-203, 2011 (査読有り)

② Tojima T, Itofusa R, Kamiguchi H: Asymmetric clathrin-mediated endocytosis drives repulsive growth cone guidance. *Neuron* 66: 370-377, 2010 (査読有り)

③ Akiyama H, Matsu-ura T, Mikoshiba K, Kamiguchi H: Control of neuronal growth cone navigation by asymmetric inositol 1,4,5-trisphosphate signals. *Sci Signal* 2: ra34, 2009 (査読有り)

④Tojima T, Itofusa R, Kamiguchi H: The

nitric oxide-cGMP pathway controls the directional polarity of growth cone guidance via modulating cytosolic  $Ca^{2+}$  signals. *J Neurosci* 29: 7886-7897, 2009 (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

① Kamiguchi H: Growth cone membrane trafficking for axon guidance. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Membranes in Motion", Tahoe City, USA, January 27, 2012

②戸島拓郎、糸総るり香、上口裕之: 神経軸索ガイダンスの方向極性を決定するカルシウム依存性エンドサイトーシス. 第 34 回日本神経科学大会、横浜、2011 年 9 月 15 日

③Kamiguchi H: Membrane dynamics in growth cone guidance. The 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, July 16, 2011

④Tojima T, Itofusa R, Kamiguchi H: The signaling pathway controlling clathrin-mediated endocytosis for bidirectional growth cone guidance. The 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, July 16, 2011

⑤ Akiyama H, Tojima T, Kamiguchi H: Attractive axon guidance requires phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane trafficking in the growth cone. The 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, July 16, 2011

⑥戸島拓郎、糸総るり香、上口裕之: 神経軸索ガイダンスを制御するエンドサイトーシス調節経路: CaM キナーゼ II とカルシニューリンの拮抗作用. 第 63 回日本細胞生物学会大会、札幌、2011 年 6 月 27 日

⑦戸島拓郎、糸総るり香、上口裕之: 非対称性クラスリン依存性エンドサイトーシスによる成長円錐ガイダンスの駆動機構. 第 33

回日本神経科学会大会・第 53 回日本神経化学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会、神戸、2010 年 9 月 2 日

⑧戸島拓郎、糸総るり香、上口裕之：神経成長円錐ガイダンスにおけるクラスリン依存性エンドサイトーシスの役割. 第 62 回日本細胞生物学会大会、大阪、2010 年 5 月 19 日

⑨上口裕之：成長円錐ガイダンスにおける非対称性膜動態の役割. 神経組織の成長・再生・移植研究会 第 24 回学術集会、渋川、2009 年 6 月 21 日

⑩戸島拓郎、糸総るり香、上口裕之：成長円錐局所エンドサイトーシスによる反発性軸索ガイダンス制御. 第 61 回日本細胞生物学会大会、名古屋、2009 年 6 月 3 日

〔図書〕 (計 1 件)

Tojima T, Kamiguchi H: The driving machinery for growth cone navigation. In: Advances in Neurobiology “Cytoskeleton of the Nervous System”. (Eds) Nixon RA, Yuan A, Springer, New York, NY, USA, vol 3, pp447-454, 2011

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上口 裕之 (KAMIGUCHI HIROYUKI)

独立行政法人理化学研究所・神経成長機構研究チーム・チームリーダー

研究者番号：1 0 2 3 3 9 3 3

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし