

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：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700353

研究課題名（和文） 神経成長円錐ガイダンスを制御するエンドサイトーシス経路

研究課題名（英文） Endocytic pathways controlling neuronal growth cone guidance

研究代表者

戸島 拓郎 (TOJIMA TAKURO)

独立行政法人理化学研究所・神経成長機構研究チーム・研究員

研究者番号：00373332

研究成果の概要（和文）：

神経軸索先端部に現れる成長円錐は、周辺環境に存在する軸索ガイダンス因子に誘引・反発され標的まで辿り着く。過去に我々は、Ca²⁺シグナルに応じて成長円錐内で非対称的にエクソサイトーシス・エンドサイトーシスが誘起されることで成長円錐の誘引と反発が駆動されることを明らかにした。本課題では、Ca²⁺シグナル下流においてエンドサイトーシスを促進・抑制するシグナル伝達経路を同定した。

研究成果の概要（英文）：

The neuronal growth cone navigates the axon along the correct path by sensing extracellular guidance cues. We previously demonstrated that, downstream of Ca²⁺ signals, growth cone attraction and repulsion are driven by asymmetric exocytosis and endocytosis, respectively. In this project, we identified the signaling pathways that link Ca²⁺ signals with endocytosis for bidirectional growth cone guidance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経成長円錐、軸索ガイダンス、クラスリン依存性エンドサイトーシス、カルシニューリン、CaM キナーゼ II、Cdk5

1. 研究開始当初の背景

神経回路形成過程の神経軸索先端部に現れる成長円錐は、細胞外環境に呈示される多種多様な軸索ガイダンス因子の濃度勾配を感

知し、それに応じて自身の運動性を変化させることで軸索を正しい標的まで牽引する。軸索ガイダンス因子は、成長円錐を引き寄せる作用を持つ「誘引因子」と、遠ざける作用を持つ「反発因子」に大別されるが、どちらの

場合も、因子を受容した側に発生する局所 Ca^{2+} シグナルが旋回運動誘発の十分条件である。過去の我々の研究により、誘引を引き起こす Ca^{2+} シグナル (誘引性 Ca^{2+} シグナル) と、反発を引き起こす Ca^{2+} シグナル (反発性 Ca^{2+} シグナル) の空間的プロファイルの違いが明らかになっている (Ooashi et al., *J Cell Biol.* 170: 1159-1167. 2005; Tojima et al., *J Neurosci.* 29: 7886-7897. 2009)。すなわち、ガイダンス因子受容に伴う細胞外からの一次的な Ca^{2+} 流入に応じて、小胞体ストア由来の二次的な Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出 (CICR) が起きると成長円錐は誘引性旋回を呈し、一次的な Ca^{2+} 流入単独の場合には反発性旋回を呈する。さらに我々は、これら Ca^{2+} シグナル下流において誘引・反発を駆動するメカニズムを解析し、誘引性旋回は成長円錐片側の Vesicle associated membrane protein 2 (VAMP2) 依存性エクソサイトーシスの促進によって、反発性旋回は成長円錐片側のクラスリン依存性エンドサイトーシスの促進によって駆動されることを明らかにした (Tojima et al., *Nat Neurosci.* 10: 58-66. 2007; Tojima et al., *Neuron* 66: 370-377. 2010)。すなわち、成長円錐の誘引・反発は、 Ca^{2+} シグナル下流において形質膜成分を領域依存的に追加・除去するという極めてシンプルな機構により駆動されていることが明らかになった。

しかしながら、誘引性・反発性 Ca^{2+} シグナルからエクソサイトーシス・エンドサイトーシス促進に至るシグナル伝達経路については不明であった。また、反発性 Ca^{2+} シグナル (Ca^{2+} 流入のみ) は誘引性 Ca^{2+} シグナル (Ca^{2+} 流入と CICR の集合) の真部分集合であることを考慮すると、誘引性 Ca^{2+} シグナルの下流ではエクソサイトーシスのみならずエンドサイトーシスも同時に促進されてしまうことになり、両者の拮抗により成長円錐は旋回運動を呈することができないと考えられる。これを防ぐための経路として、小胞体由来 CICR からエンドサイトーシス抑制に至る経路 (交差抑制経路) の存在が強く示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究課題では以下の課題に取り組んだ。

(1) 反発性 Ca^{2+} シグナル下流においてエンドサイトーシスを促進するシグナル経路 (経路①) の同定。(2) CICR 下流においてエンドサイトーシスを抑制する交差抑制経路 (経路②) の同定。具体的なシグナル分子の候補としては、経路①を担う分子として Ca^{2+} 依存的脱リン酸化酵素カルシニューリンを、経路②を担う分子として Ca^{2+} 依存的リン酸化酵

素である CaM キナーゼ II および Cdk5 を想定しこれを検証した。

3. 研究の方法

(1) ケージド Ca^{2+} として、アセトキシメチル化 NP-EGTA を成長円錐に取り込ませ、355 nm レーザーを成長円錐内の任意の場所とタイミングで照射することにより Ca^{2+} シグナルを発生させ、旋回運動を誘発した。

(2) 微小ガラスピペットに生理的ガイダンス因子 Myelin-associated glycoprotein (MAG) を充填し、成長円錐の進行方向に対して斜め 45 度の角度から空気圧でパルス状に放出させることで濃度勾配を持って作用させ、旋回運動を誘発した。

(3) 全反射蛍光顕微鏡を用いて成長円錐におけるクラスリン依存性エンドサイトーシスを時空間的に可視化し定量解析した。クラスリン依存性エンドサイトーシスが起きる際、まず形質膜直下へのクラスリン集積によりクラスリン被覆ピットが形成され、その後さらにダイナミン 1 が集積することで被覆ピットが形質膜から切り離され細胞質中に遊離する。全反射蛍光顕微鏡では、ガラス基質のごく近傍に存在する蛍光分子のみが励起されるため、基質接着面の形質膜直下に集積したダイナミン 1 とクラスリン被覆ピットは粒状のシグナルとして観察されるが、エンドサイトーシスにより細胞質中に遊離したクラスリン被覆小胞由来のシグナルは観察領域から外れて検出されない。そのため、蛍光タイムラプス像におけるクラスリンおよびダイナミン 1 の粒状シグナル消失を指標として、エンドサイトーシスを単一小胞レベルで時空間的に検出・定量できる。

4. 研究成果

平成 22 年度は、まずケージド Ca^{2+} 光解離法によって誘発された成長円錐の反発性旋回運動に対するカルシニューリンの寄与を検証した。成長円錐の反発はカルシニューリン阻害剤である Cyclosporin A および Deltamethrin によって抑制され成長円錐は直進したが、誘引にはこれら薬剤の効果は無かった。続いて、成長円錐の誘引性旋回に対する CaM キナーゼ II の寄与を検証した。成長円錐の誘引は CaM キナーゼ II 阻害剤である KN93 または Myr-AIP によって抑制され成長円錐は直進した。興味深いことに、Myr-AIP と同時に VAMP2 依存性エクソサイトーシス阻害剤である破傷風毒素を投与すると、成長円錐は反発を呈した。また、Myr-AIP と同時にクラスリン依存性エンド

サイトーシス阻害剤である MDC を投与すると成長円錐は誘引を呈した。一方、成長円錐の反発には KN93 および Myr-AIP は効果が無かった。これらの結果から、CaM キナーゼ II 阻害剤の単独投与時に成長円錐が直進した理由として、CICR 下流でエンドサイトーシスを阻害する経路が阻害されたことでエクソサイトーシスとエンドサイトーシスが両方活性化し、それらの拮抗により形質膜の増減が相殺されたためと推定された。同様に、Cdk5 の阻害剤である Roscovitine または Olomoucine の成長円錐の誘引・反発に対する効果を検証したところ、CaM キナーゼ II 阻害剤投与時と全く同じ効果が見られた。

以上の結果から、反発性 Ca²⁺シグナル下流においてエンドサイトーシスを促進するシグナル経路（経路①）にはカルシニューリンが寄与し、その一方で誘引性 Ca²⁺シグナル下流においてエンドサイトーシスを阻害する経路（経路②）には CaM キナーゼ II および Cdk5 が寄与していることが強く示唆された。

続いて、成長円錐におけるクラスリン依存性エンドサイトーシスを全反射蛍光顕微鏡を用いて可視化し、その非対称性に対するカルシニューリン、CaM キナーゼ II および Cdk5 の寄与を検証した。ケージド Ca²⁺光解離により発生させた反発性 Ca²⁺シグナルに対して、成長円錐内のエンドサイトーシス頻度の非対称が誘発された（Ca²⁺側で高頻度）が、これはカルシニューリン阻害剤により消失した。一方、誘引性 Ca²⁺シグナルに対してエンドサイトーシス頻度の対称性は維持されたが、CaM キナーゼ II 阻害剤または Cdk5 阻害剤存在下では非対称化した（Ca²⁺側で高頻度）。これらの結果により、反発性 Ca²⁺シグナルの下流においてはカルシニューリンがエンドサイトーシス促進に働く一方、誘引性 Ca²⁺シグナルの下流では CaM キナーゼ II および Cdk5 がエンドサイトーシス抑制に働くことが示された。

これに引き続いて平成 23 年度は、生理的なガイダンス因子である MAG の濃度勾配に対する成長円錐の旋回運動に対して同様の解析を行った。微小ガラスピペットを用いて MAG 濃度勾配を成長円錐に作用させたところ成長円錐は誘引され、培養液中に cAMP アンタゴニスト Rp-cAMPS あるいは CICR 阻害剤である高濃度リアノジンを投与すると、MAG に対する成長円錐の応答は反発に変わった。すなわち、MAG による旋回方向は cAMP および CICR 依存的に決定されることが確認された。その上で、MAG による誘引・反発に対する CaM キナーゼ II および Cdk5 の寄与を検証した。MAG による誘引は CaM キナーゼ II の阻害剤 (Myr-AIP) または Cdk5 の阻害剤 (Roscovitine) によって抑制され成長円錐は直進した。Myr-AIP または

Roscovitine と同時に破傷風毒素を投与すると成長円錐は反発を呈し、MDC を同時投与すると成長円錐は誘引を呈した。一方、MAG による反発には Myr-AIP および Roscovitine の効果は無かった。これらの結果から、人工的なケージド Ca²⁺光解離法によって誘発される成長円錐の旋回運動のみならず、生理的なガイダンス因子 MAG によって誘発される旋回運動においても、CaM キナーゼ II および Cdk5 が交差抑制経路（経路②）を担うことが確認された。

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 3 件）

- ① 戸島拓郎, 秋山博紀, 上口裕之. (2011) 神経軸索突起をターゲットへ導く細胞内メカニズム. *生物物理* 51: 214-217. 査読有
- ② Takuro Tojima, Jacob H. Hines, John R. Henley, Hiroyuki Kamiguchi. (2011) Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering. *Nature Reviews Neuroscience* 12: 191-203. 査読有
- ③ 戸島拓郎. (2010) エンドサイトーシスによる神経軸索ガイダンス制御. *神経科学ニュース* 184: 20-21. 査読無

〔学会発表〕（計 6 件）

- ① 戸島拓郎, 糸総り香, 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制御機構. *第 34 回日本神経科学大会*, 横浜, 2011 年 9 月 14 日
- ② Takuro Tojima, Rurika Itofusa, Hiroyuki Kamiguchi. The signaling pathways controlling clathrin-mediated endocytosis for bidirectional growth cone guidance. *8th IBRO World Congress of Neuroscience*, Florence, 2011 年 7 月 14 日
- ③ Hiroki Akiyama, Takuro Tojima, Hiroyuki Kamiguchi. Attractive axon guidance requires phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane trafficking in the growth cone. *8th IBRO World Congress of Neuroscience*, Florence, 2011 年 7 月 14 日
- ④ 戸島拓郎, 糸総り香, 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回日本細胞生物学学会大会**, 札幌, 2011年6月27日
- ⑤ **戸島拓郎**. 膜トラフィッキングによる神経軸索ガイダンス駆動機構. **第5回メカノセンシング研究会**, 京都, 2010年11月25日
- ⑥ **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回日本神経科学大会**, 神戸, 2010年9月2日

[図書] (計1件)

- ① **Takuro Tojima**, Hiroyuki Kamiguchi. (2011) The driving machinery for growth cone navigation. *Cytoskeleton of the Nervous System, Advances in Neurobiology* (Springer, New York), R.A. Nixon, A. Yuan (eds.), vol. 3 pp. 447-454.

[その他]

ホームページ等

<http://tojimat.web.fc2.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸島 拓郎 (TOJIMA TAKURO)

独立行政法人理化学研究所・神経成長機構研究チーム・研究員

研究者番号：00373332