

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590274

研究課題名(和文)マクロピノサイトーシスによる反発性軸索誘導機構の解明と脊髄損傷治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of macropinocytosis-mediated repulsive axon guidance and its application to the treatment of spinal cord injury

研究代表者

樺山 博之(Kabayama, Hiroyuki)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：10332339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：誘因性軸索誘導因子は、神経突起先端部分の成長円錐に働きかけ、正しい神経細胞へと成長を促し、シナプス形成を誘導する。逆に反発性軸索誘導因子は、成長円錐を退縮させることによって神経突起の伸長を止め、間違った神経細胞とのシナプス形成を阻害することが知られている。この成長円錐の退縮は、細胞膜表面積の減少を伴うが、その分子メカニズムはこれまで不明であった。本研究では、反発性軸索誘導分子であるSema3aが、エンドサイトーシスの一つであるマクロピノサイトーシスを誘導することによって、成長円錐の表面膜を大規模に細胞内へと取り込み、成長円錐の退縮や神経突起伸長の抑制を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Growth cone collapse is a crucial process for repulsive axon guidance and is accompanied by a reduction in growth cone surface area. This process of reduction may be regulated by endocytosis; however, its molecular mechanism is unclear. Macropinocytosis is a clathrin-independent form of endocytosis in which large areas of plasma membrane can be engulfed. We examined the effects of macropinocytosis inhibitor, ethylisopropylamiloride (EIPA) on Sema3A-induced growth cone collapse in chicken dorsal root ganglion neurons. We found that EIPA suppressed Sema3A-induced macropinocytosis (uptake of high-molecular weight dextran) and growth cone collapse, as shown in Figure 1. These results indicate that macropinocytosis-mediated massive internalization of the plasma membrane is required for Sema3A-induced growth cone collapse.

研究分野：分子神経生物学

科研費の分科・細目：基礎医学、生理学一般

キーワード：マクロピノサイトーシス エンドサイトーシス 反発性軸索誘導 成長円錐 膜動態 Sema3a syntaxin-1B

1. 研究開始当初の背景

マクロピノサイトーシスは大規模な細胞膜の回収や細胞外液を飲み込む為の特殊なエンドサイトーシスで、微分干渉像でも観察が出来るほどの大きな vacuole (直径 0.2-5 μ m) を形成する。従来よく研究されてきたクラスリン依存性のエンドサイトーシスとは異なり、クラスリン非依存性であり、分子量 10kDa 以上の蛍光デキストランでラベルする事が出来る。クラスリン依存性エンドサイトーシスと異なり、その制御メカニズムや生理的役割については不明な点が多かった。しかし、ごく最近の研究で、数少ないマクロピノサイトーシス制御分子として知られる cdc42 などのドミナントネガティブ変異体などを用いることで、様々なウイルス (Vaccinia virus, HIV-1, Echovirus etc., *Nature Cell Biol.* 2009. (11) p510-) のほ乳類動物細胞への侵入がマクロピノサイトーシス依存性であること、また、狂牛病の原因であるプリオン蛋白の繊維芽細胞への侵入や、膜透過性ペプチドである TAT などもマクロピノサイトーシスを介して細胞内へ取り込まれる事が明らかにされた。さらには、血管内皮細胞内へ取り込まれたマクロピノソーム同士が融合することが血管内腔形成に寄与する事も指摘されている (*Nature*. 2006. (442) p453-)。以上から様々な生命現象にマクロピノサイトーシスが重要な役割を持つ事が明らかにされつつあり、幅広い研究分野において注目されている。しかし、神経細胞においてマクロピノサイトーシスが誘導されるか、あるいは生理的役割を持つかについてはこれまで全く注目もされておらず、明らかにされていなかった。

研究代表者は、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、報告してきた (Kabayama et al., *Mol. Cell. Neuroscience*. 2009)。

(1) 細胞内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。研究代表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 μ m² 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 semaphorin3A 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 semaphorin3A 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唆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退縮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報告した事で重要である。現在では研究代表者のこの報告を皮切りに、他の研究グループからも、成長円錐におけるマクロピノサイトーシス誘導を観察した論文が報告されるようになっており、注目を集めている。

2. 研究の目的

正しい神経回路が形成されるには、誘因性軸索誘導因子と反発性軸索誘導因子という 2 種類の因子が必須である。誘因性軸索誘導因子は、神経突起先端部分の成長円錐に働きかけ、正しい神経細胞へと成長を促し、シナプス形成を誘導する。逆に反発性軸索誘導因子は、成長円錐を退縮させることによって神経突起の伸長を止め、間違った神経細胞とのシナプス形成を阻害することが知られている。この成長円錐の退縮は、細胞膜表面積の減少を伴うが、そのメカニズムはこれまで不明であったが、上述した通り、マクロピノサイトーシスが関与する可能性があり、その検証を分子レベルで行った。

3. 研究の方法

ニワトリ胚、DRG 神経細胞をポリ L リジン、ラミニンコートした 35 mm ガラスボトムディッシュにて培養し、タイムラプスイメージングにて成長円錐の観察を行った。

4. 研究成果

成長円錐におけるマクロピノサイトーシスの分子メカニズムと役割の解明のため、以下の理由により小胞輸送分子 syntaxin1B に着目した。

突起先端の成長円錐にはレクチンである WGA でラベルされる成長円錐小胞と呼ばれる小胞があり、これらの小胞が構成的にエクソサイトーシスすることで細胞表面積が増大し、その結果、突起伸長が達成されるという仮説が提唱されている。なぜなら成熟シナプスでエクソサイトーシスを正に制御している分子である syntaxin1B, snap25 などは成長円錐にも発現しており、それら分子の抑制により、神経突起の伸長が抑制されることが分かっているからである。現在では多くのシナプスのエクソサイトーシスを正に制御する分子の抑制により、突起伸長が抑制されるという

報告をした論文が数多くある。しかしながら、エクソサイトーシス関連分子の抑制により突起伸長が抑制される事が分かって、成長円錐小胞の構成的エクソサイトーシスを阻害した結果、突起伸長が阻害されたかを示した報告は殆どなく、唯一の例外が syntaxin1B を神経毒により切断した場合である。この報告 (*J. Cell. Biol.*1996.134(1)p205-) は Neurotoxin C1 による syntaxin1B の切断によって、WGA ラベルされた小胞の構成的エクソサイトーシスが阻害されたとしている。しかも Neurotoxin C1 によって成長円錐で vacuole が形成されることも報告しており、この蓄積した vacuole の面積は突起伸長時の増大膜面積に匹敵することから、Neurotoxin C1 によってエクソサイトーシス出来なくなった膜面積増大に必要な小胞同士が融合しあって vacuole を形成したという仮説が提唱されている。しかしながらメカニズムは今まで解明されていなかった。研究代表者が既に報告した成長円錐におけるカルシウムや semaphorin3A によるマクロピノサイトーシス依存性 vacuole との類似性から、Neurotoxin C1 による vacuole 形成もマクロピノサイトーシスによるものとの仮説を立て検証し、以下の発見をした。

(1) Neurotoxin C1 による vacuole にマクロピノサイトーシスのマーカーである高分子量デキストランが取り込まれること、それがマクロピノサイトーシス阻害剤であるアミロライド類似体 (EIPA) によって阻害されることから、Neurotoxin C1 による vacuole 形成はマクロピノサイトーシスによるものと分かった。

(2) Neurotoxin C1 の基質である syntaxin1B の発現を抑制する siRNA をエレクトロポレーションにより導入すると、突起伸長の抑制や成長円錐の退縮とともに、マクロピノサイトーシスが誘導されることから、syntaxin1B がマクロピノサイトーシスの負の制御因子であることが分かった。

(3) semaphorin3A により、syntaxin1B 発現が成長円錐で抑制される事も判明し、さらに syntaxin1B の過剰発現によって、semaphorin3A によるマクロピノサイトーシスが抑制され、成長円錐の退縮も抑制される事も明らかとなった。

(4) semaphorin3A 以外の反発性軸索誘導因子である ephrin-A2 によっても syntaxin1B 発現は低下するが、アクチン繊維の脱重合を阻害する jasplakinolide 処理では syntaxin1B の発現は低下しなかったことから、syntaxin1B の発現抑制は反発性軸索誘導分子に共通の現象であることが示唆された。

(5) さらに、semaphorin3A による成長円錐

の退縮はマクロピノサイトーシスの特異的阻害剤の EIPA によりほぼ完全に抑制されることも明らかにした (下図参照)。(*J. Neurosci.*2011)

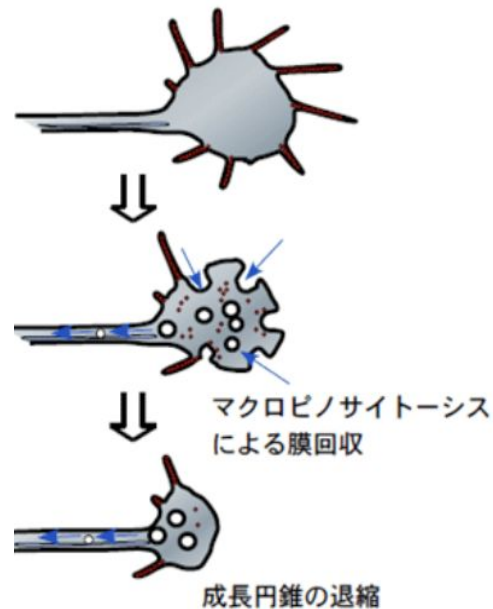


図 成長円錐の退縮のモデル。退縮は表面膜面積の減少を伴う。反発性軸索誘導分子によってマクロピノサイトーシスが誘導されることで形質膜の大規模な取り込みがおき (青矢印)、その結果成長円錐の退縮、突起伸長の抑制がおきる。

(6) さらに、syntaxin1B がどのようにマクロピノサイトーシスを制御しているかを解明するため、結合分子の探索を行い、細胞内カルシウムチャネルである、IP3 受容体を syntaxin1B 結合分子として同定した。IP3R1 の syntaxin1B 結合アミノ酸配列は coiled-coil ドメインを形成することも判明した。

(7) 研究成果を脊髄損傷治療へと応用するため、脊髄損傷時にマクロピノサイトーシスが誘導されるかを調べたところ、マクロピノサイトーシスのマーカーである高分子量デキストランの損傷神経突起への特異的な取り込みは観察されなかった。新たなマクロピノサイトーシスの in vivo での可視化法を開発する必要があることが分かった。

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 1件)

1. Kabayama H*, Takeuchi M, Taniguchi M, Tokushige N, Kozaki S, Mizutani A, and Mikoshiba K. (* corresponding

author)
Syntaxin 1B suppresses macropinocytosis and Sema3a-induced growth cone collapse. *The Journal of Neuroscience*. 2011 May; 31(20):7357-7364
doi: 10.1523/JNEUROSCI.2718-10.2011.

〔学会発表〕(計 2件)

1. 榊山 博之、竹内 誠、谷口 雅彦、徳重 直子、小崎 俊司、水谷 顕洋、中村 健、御子柴 克彦: 「シンタキシン1B 調節性マクロピノサイトーシスを介したセマフォリン 3A による成長円錐の退縮」 第34回日本神経科学大会. (2011年9月17日). パシフィコ横浜
2. Kabayama Hiroyuki, Takeuchi Makoto, Taniguchi Masahiko, Tokushige Naoko, Kozaki Shunji, Mizutani Akihiro, Nakamura Takeshi, and Mikoshiba Katsuhiko: Macropinocytosis mediates Sema3A-induced growth cone collapse 18th International Conference on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease. June 30, 2013. Kiruna, Sweden.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: METHOD OF REGULATING NEURONAL AXON ELONGATION
発明者: Katsuhiko Mikoshiba, Hiroyuki Kabayama
権利者: RIKEN
種類: 特許出願
番号: RK23728/US Non-Provisional Application 2013
出願年月日: 2013年4月
国内外の別: 国外(米国)

取得状況(計 0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

所属研究室ホームページ

<http://mikoshiba-lab.brain.riken.jp/ind>

exj.html

Frontiers 誌ホームページ

<http://community.frontiersin.org/people/HiroyukiKabayama/98808>

Frontiers in Membrane Physiology and Membrane Biophysics 誌にて、マクロピノサイトーシス関連研究をテーマにした Research Topic, Physiological roles and regulatory mechanisms of macropinocytosis-mediated membrane retrieval in health and disease, を guest associate editor としてオーガナイズ(下記サイト参照)

http://www.frontiersin.org/Journal/SpecialTopicDetail.aspx?name=membrane_physiology_and_membrane_biophysics&st=2047&name=Physiological_roles_and_regula

研究紹介記事

<http://www.riken.jp/en/research/rikenresearch/highlights/6677>

研究プレス発表

理化学研究所

<http://www.riken.jp/pr/press/2011/20110518/>

科学技術振興機構

http://www.jst.go.jp/pr/announce/20110518/index.html?utm_medium=twitter

研究紹介テレビ番組

2011, June 25 魔法の金属, 'カルシウム', サイエンスゼロ, NHK.

御子柴克彦、榊山博之

(研究成果であるマクロピノサイトーシス依存的な神経回路形成の解説)

2013. May 15 NHK WORLD

Katsuhiko Mikoshiba, [Hiroyuki Kabayama](http://www3.nhk.or.jp/nhkworld/english/tv/scienceview/archives20130515.html)

<http://www3.nhk.or.jp/nhkworld/english/tv/scienceview/archives20130515.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊山 博之 (KABAYAMA HIROYUKI)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号: 10332339