

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830053

研究課題名(和文) 形質膜局所での細胞極性化分子活性を制御する細胞内小胞シャトリング

研究課題名(英文) Membrane trafficking that controls localized activation of cell-polarizing molecules

研究代表者

秋山 博紀 (Akiyama, Hiroki)

早稲田大学・人間科学学術院・助教

研究者番号：40568854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：発生期、神経軸索は誘導因子に応じて進路を転換することで正しい標的まで到達する。進路転換には成長円錐局所での極性化が必要になる。これを制御する機構のひとつとして、形質膜との融合に依らない細胞内小胞輸送系の寄与を検討した。成長円錐周辺部へ輸送されたVAMP7陽性小胞は形質膜と完全に融合することなく中心部へ戻ってくることを、また、この小胞輸送頻度の多い側へ進路転換することを見出した。VAMP7小胞に存在する極性化分子の候補としてRacおよびCdc42に着目した。いずれの分子もVAMP7小胞とは異なる挙動を示したことから、Rac、Cdc42の活性を制御する分子等にターゲットを移して解析を行う必要がある

研究成果の概要(英文)：During development, neuronal axons can navigate over long distances to find their targets by following environmental guidance cues. Local polarization in growth cones at the tip of developing axons is essential for changing the direction of migration. Here, I investigated possible involvement of vesicle trafficking machinery that does not exhibit full collapse fusion with plasmalemma in local polarization for growth cone turning. Centrifugally transported VAMP7 vesicles migrated back toward the central domain after reaching the leading edge, and growth cones turned toward the side with more VAMP7 vesicle delivery. I focused on Rac and Cdc42 as candidates for VAMP7 vesicle cargo and analyzed the dynamics of those molecules in growth cones. Rac and Cdc42 did migrate toward the leading edge, but the speed was much faster than that of VAMP7 vesicles. Therefore, further investigations are required to identify the cargoes and to clarify the role of VAMP7 vesicle trafficking in axon guidance.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：軸索ガイダンス 成長円錐 小胞輸送 極性化 VAMP7 small GTPase

1. 研究開始当初の背景

複雑かつ精緻な神経回路網が構築されるには、膨大な数の神経細胞が正しく配線される必要がある。発生期、伸長中の神経細胞軸索先端部に現れる成長円錐は、外環境中に提示される様々な軸索ガイダンス因子の情報を読み取り、正しい標的まで軸索を牽引する。軸索ガイダンス因子は、軸索を引き寄せる誘引因子と遠ざける反誘引因子に大別される。例えば、軸索伸長方向の右側に誘引因子が存在する場合、成長円錐の右側を新たな「前方向」とするために極性化が起こり、誘引因子の方向へ進路を転換する。すなわち、成長円錐局所における極性化がいかにして制御されるか、その機構を解明することにより、軸索ガイダンスの理解は大きく前進する。しかしながら、この極性化制御機構には未だ多くの不明点が残されている。

成長円錐は、細胞骨格や膜成分、細胞外基質との接着構造の動態を制御し前進する。ガイダンス因子に遭遇した場合は、これらの前進に必要な駆動力が左右非対称に制御され、進路を転換すると考えられる。実際、例えば、成長円錐において細胞内小胞の形質膜への輸送を阻害すると、ガイダンス因子への応答性が失われる。これまで、細胞内小胞の機能として、接着分子やガイダンス因子受容体、イオンチャネル等の細胞膜貫通型機能分子の形質膜への挿入が重要だと考えられてきた。この場合、小胞は形質膜と完全に融合する必要はある。しかしながら、研究代表者らは、成長円錐中心部から周辺部へ向かって輸送された vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7) 陽性小胞が先端部に到達後、形質膜と完全に融合せず、逆行性に輸送され中心部へと戻ること、さらに、VAMP7 小胞の接触によって、先端部が顕著に突出することを見出した。

2. 研究の目的

本研究課題は、形質膜との完全な融合に依らない細胞内小胞輸送(すなわち細胞内における小胞のシャトリング)によって、成長円錐局所での極性化が制御される可能性を検討することを目的とした。具体的な作業仮説として、「vesicle-associated membrane protein (VAMP)7 陽性小胞のシャトリングが成長円錐局所での極性化を制御する」を設定し、これを検証するため、以下を行うこととした。

- (1) VAMP7 小胞動態と形質膜上でのアクチン重合促進因子活性の相関解析
- (2) 順行性 VAMP7 小胞とアクチン重合促進因子(カーゴ候補)との共局在解析
- (3) 逆行性 VAMP7 小胞とカーゴ候補分子との共局在解析

3. 研究の方法

本研究課題では、胚生 9 - 10 日のニワトリ胚から調製した脊髄後根神経節(DRG)細胞の分散培養系を用いた。

細胞の分散培養系を用いた。

(1) 生理的ガイダンス因子として pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)を用いた。先端部直径約 1 μ m のガラスピペットに 5 μ M の PACAP を充填し、成長円錐からの距離 100 μ m の位置に軸索伸長方向に対して 45 度となるように置いた。ガラスピペットに間欠的に空気圧(4 psi, 20 ms duration, 2Hz)を与えることで、培養液中に PACAP の濃度勾配を生成した。PACAP 濃度勾配の軸索誘引活性は、濃度勾配負荷開始から 60 分後の成長円錐の位置を基に進路転換の角度を定量し、解析した。PACAP による軸索誘引に対する VAMP7 の寄与を検討するため、shRNA ベクターを作成し、VAMP7 のノックダウンを行った。半減期の長い VAMP7 をノックダウンするため、胚性 2 日目に to12 配列を付した shRNA ベクターと transposase を in ovo 電気穿孔法を用いて導入し、相同組み換えにより shRNA 配列をゲノムに組み込んだ。

(2) 成長円錐内での VAMP7 の動態を可視化するため、mRFP または mCherry 標識した VAMP7 を発現させた。VAMP7 動態は、成長円錐中心部から周辺部へ向かって移動する VAMP7 由来シグナルを秒 2 フレームあるいは 2 秒 1 フレームで撮影し、解析した。

(3) 成長円錐での Rac および Cdc42 の活性は、Förster resonance energy transfer (FRET) 型のセンサー(Komatsu et al., *Mol Biol Cell*, 22(23): 4647-4656; Goto et al., *J Neurosci*, 33(11): 4901-4912), あるいは結合依存型のセンサーによって測定した。FRET 型のセンサーには K-Ras の C 末端配列(CAAX 配列)を付加することで、また、活性型 Cdc42 に結合するドメインと EGFP の融合タンパク質を全反射照明蛍光顕微鏡法により観察することで、形質膜上での Rac, Cdc42 の活性を測定した。

(4) 成長円錐での Rac および Cdc42 の動態を可視化するため、それぞれに PA-Tag-RFP を付加した。ピンホールにより焦点面における照射範囲を直径約 10 μ m に絞ったキセノン光源由来の活性化光(420 nm 付近)を成長円錐の中心部に照射し、この部分に存在する Rac あるいは Cdc42 のみを可視化する。その後ライブイメージングを行い、成長円錐周辺部へ移動するシグナルの速度を定量した。

(5) 成長円錐内で VAMP7 小胞と共局在する分子を探索するため、免疫細胞化学を行った。

4. 研究成果

(1) 生理的軸索ガイダンス因子である PACAP の微小濃度勾配を顕微鏡下で生成した。この濃度勾配に対して VAMP7 機能を阻害していない成長円錐は誘引応答を示したが、VAMP7 をノックダウンした成長円錐では誘引応答が消失したことから、成長円錐の進路転換に VAMP7 機能の必要性が示された。

(2) FRET 型の Rac および Cdc42 のセンサーを発現した成長円錐にこれらの活性化剤を作用させたが、FRET 効率の変化は検出できな

った。一方、阻害剤を加えると FRET 効率が減少した。また、センサーのアクセプターである YFP を退色させるとドナーである CFP の蛍光が大幅に増大した。これらの結果から、成長円錐における Rac および Cdc42 の定常状態での活性が非常に高いことが活性化を検出できない原因だと考えられた。そこで、活性化型 Cdc42 に結合するドメインに GFP を付加したキメラタンパク質を成長円錐に発現させ、全反射照明蛍光顕微鏡法によって Cdc42 の活性変動の検出を試みた。この場合は活性化剤の添加によって蛍光の増大を捉えることに成功したことから、成長円錐における活性化のイメージングが可能であることが示された。研究計画に挙げた「VAMP7 小胞動態と形質膜上でのアクチン重合促進因子活性の相関解析」を行うためには、蛍光 3 波長での同時イメージングが必要となる。FRET 型センサーを用いた 2 波長励起・3 波長蛍光システムは構築可能であったが、結合ドメインの形質膜への移動を捉えるタイプのイメージングでは 3 波長励起（全反射照明系で少なくとも 2 波長）・3 波長蛍光システムが必要とされ、これを構築することができなかった。このため、VAMP7 小胞と Rac あるいは Cdc42 との時空間的な相関解析を行うことができなかった。

(3) Rac および Cdc42 は成長円錐内に偏在しており、通常の蛍光タンパク質を用いた標識では、その動態を解析することができなかった。そこでこれらの分子に光活性化型蛍光タンパク質 PA-tagRFP を付加した融合タンパク質を成長円錐に発現させ、中心部のみに活性化光(420 nm 付近)を照射した。これにより、成長円錐中心部から周辺部へと移動するシグナルの検出に成功した。しかしながら、これらのシグナルの移動速度は、VAMP7 小胞のそれと比較して非常に速く、Rac あるいは Cdc42 がカーゴである可能性は低いことが示された。

(4) VAMP7 小胞と共局在する分子を探索するため、免疫細胞化学を行った。Rac や Cdc42 も一部共局在がみられたが、上記(3)の解析から、これらの分子はカーゴ候補とは言いがたい。そこで、Rac あるいは Cdc42 を活性化する guanine nucleotide exchange factor (GEF) である Tiam1, Dock180, Trio との共局在を検討したところ、いずれの分子も一部が VAMP7 小胞と共局在を示した。

以上の結果から、VAMP7 小胞が成長円錐の進路転換に必要なこと、小胞のカーゴは Rac あるいは Cdc42 ではなくその活性化分子である GEF の可能性があることが示された。順行性および逆行性の VAMP7 小胞それぞれによってどのようなカーゴが輸送されているかを明らかにするためには、ライブイメージングが不可欠である。今後は GEF に焦点を当て、免疫細胞化学によって一部共局在が見られた分子に蛍光標識を付した融合タンパク質を用いた VAMP7 との同時ライブイメージング

を行うことが必要になると考えられる。

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 2 件)

Akiyama H, Fukuda T, Tojima T, Nikolaev VO, and Kamiguchi H. Cyclic nucleotide control of microtubule dynamics for axon guidance. *J Neurosci.* 36(20):5636-5649. 2016

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3596-15.2016.

Akiyama H and Sakakibara S. Cytoskeletons in neuronal development. *J. Phys. Fitness Sports Med.* 5(2):131-142. 2016

DOI: 10.7600/jpfs.5.131

〔学会発表〕(計 8 件)

秋山 博紀, 福田 徹子, 戸島 拓郎, 上口 裕之. サイクリックヌクレオチドは微小管依存的な先端突出の制御を介して軸索の伸長方向を決定する. 第 38 回日本分子生物学会年会. 2015 年 12 月 1 日~2015 年 12 月 4 日, 神戸コンベンションセンター(兵庫)

岩崎 優美, 秋山 博紀, 榊原 伸一. 新規遺伝子 *Inka2* の発生期神経系における発現プロファイルと翻訳産物 *Inka2* の機能解析. 第 38 回日本分子生物学会年会. 2015 年 12 月 1 日~2015 年 12 月 4 日, 神戸コンベンションセンター(兵庫)

石川 達也, 中山 綾子, 戸島 拓郎, 上口 裕之, 秋山 博紀, 寺崎 朝子. 神経細胞の成長円錐における *Iasp-2* の役割. 第 86 回日本動物学会, 2015 年 9 月 17 日~2015 年 9 月 19 日, 新潟コンベンションセンター(新潟)

寺崎 朝子, 佐々木 貴広, 石川 達也, 中川 裕之, 秋山 博紀, 戸島 拓郎, 上口 裕之. 神経細胞の運動における *Iasp-2* の actin 結合領域の機能. 第 67 回日本細胞生物学会, 2015 年 6 月 30 日~2015 年 7 月 2 日, タワーホール船堀(東京)

秋山 博紀, 福田 徹子, 戸島 拓郎, 上口 裕之. サイクリックヌクレオチドは微小管依存的な小胞輸送の調節を介して軸索進路を決定する. 第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 11 日~2014 年 9 月 13 日, パシフィコ横浜(神奈川)

Chan C, Akiyama H, Matsu-ura T, Mikoshiba K, and Kamiguchi H. IP3 receptor/channel and axon guidance. Gordon Research Conferences "Molecular and Cellular Neurobiology", June 29 - July 4 2013, The Hong Kong University of Science and Technology, Hongkong, China

石川 達也, 中山 綾子, 上口 裕之, 秋

山 博紀, 寺崎 朝子 . Iasp 2 の発現抑制が神経細胞の運動性に及ぼす影響, 第 8 5 回日本動物学会, 2014 年 9 月 11 日 ~ 2014 年 9 月 13 日, 東北大学川内キャンパス (宮城)

佐々木 貴広, 中山 綾子, 秋山 博紀, 上口 裕之, 中川 裕之, 寺崎 朝子 . 神経細胞の成長円錐の運動における Iasp 2 のアクチン結合活性の役割, 第 8 5 回日本動物学会, 2014 年 9 月 11 日 ~ 2014 年 9 月 13 日, 東北大学川内キャンパス (宮城)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 博紀 (Akiyama, Hiroki)

早稲田大学

人間科学学術院

助教

研究者番号 : 40568854