

研究報告書

「神経軸索ガイダンスを制御する普遍的シグナル伝達の時空間解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 戸島 拓郎

1. 研究のねらい

複雑かつ精緻な神経回路網を形成するために、発生中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を感知し、それに応じて自身の進行方向を転換(誘引/反発)することで遠隔の標的までの経路を正しく選択する。ガイダンス因子の濃度勾配に遭遇した成長円錐内部では、空間的非対称性を持った Ca^{2+} 濃度上昇が観察される。この Ca^{2+} シグナルは、軸索ガイダンス因子の作用が誘引の場合も反発の場合も同様の空間分布(ガイダンス因子濃度の高い側で高濃度)をとり、この非対称性 Ca^{2+} シグナルが誘引/反発を引き起こすための必要十分条件であることが良く知られていた。一般に、細胞質中の Ca^{2+} 濃度は細胞外からの「 Ca^{2+} 流入」と小胞体からの「 Ca^{2+} 放出」により上昇するが、過去の報告において我々は、成長円錐の誘引を引き起こす Ca^{2+} シグナルには、小胞体膜 Ca^{2+} チャネルであるリアノジン受容体からの Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出(CICR)が含まれる一方、反発性 Ca^{2+} シグナルの構成要素は細胞外 Ca^{2+} 流入のみ(CICR を含まない)であることを明らかにした(Tojima et al, J Neurosci 29: 7886-7897, 2009)。さらに我々は、非対称性 Ca^{2+} シグナルによって誘発される成長円錐の方向転換を駆動する分子メカニズムとして膜トラフィッキングに着目し、VAMP2 依存性エクソサイトーシスが誘引を駆動すること、その一方でクラスリン依存性エンドサイトーシスが反発を駆動することを明らかにしてきた。(Tojima et al, Nat Neurosci 10: 58-66, 2007; Tojima et al, Neuron 66: 370-377, 2010)。

これらの結果に基づいて本課題では、(A)非対称性 Ca^{2+} シグナルから膜トラフィッキングに至るシグナル伝達経路、(B)非対称性環状ヌクレオチドシグナルによる軸索ガイダンス駆動機構、(C)複数の軸索ガイダンス因子による成長円錐の方向転換制御機構、の3点について研究を進めた。

2. 研究成果

(1)概要

発生中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に導かれて移動し遠隔の標的に正しく投射する。本課題では、成長円錐がガイダンス因子の濃度勾配を読み取り自らの運動性へ変換するための細胞内シグナル伝達経路を解析した。ガイダンス因子受容時に成長円錐内で空間非対称的に発生する Ca^{2+} シグナルの下流においては、カルシニューリン、CaM キナーゼ II、Cdk5、PIP キナーゼ $\text{I}\gamma 90$ 等のシグナル分子を介してクラスリン依存性エンドサイトーシスと VAMP2 依存性エクソサイトーシスのバランスが不均衡化され、その結果成長円錐が方向転換することが示された。一方、非対称性環状ヌクレオチド(cAMP、cGMP)シグナルの下流においては、微小

管動態と VAMP7 依存性エクソサイトーシスが方向転換に寄与していた。さらに、複数のガイダンス因子の呈示に対して成長円錐が正確な経路選択を行う機構についても解析した。これらにより、ガイダンス因子受容から成長円錐の運動制御に至る普遍的シグナル伝達ネットワークの全貌が明らかになりつつある。

(2) 詳細

研究テーマ A 「非対称性 Ca^{2+} シグナルから膜トラフィッキングに至るシグナル伝達経路」

本項目では、誘引性 Ca^{2+} シグナル(Ca^{2+} 流入と CICR)および反発性 Ca^{2+} シグナル(Ca^{2+} 流入のみ)の下流においてクラスリン依存性エンドサイトーシスを調節するシグナル伝達経路について解析した。過去のプレシナプスでの研究から、エンドサイトーシス調節因子群の形質膜局在に必要な PIP_2 の合成酵素である PIP キナーゼ $\text{I}\gamma 90$ がシナプス小胞のエンドサイトーシスに寄与することが示されていた。また、PIP キナーゼ $\text{I}\gamma 90$ の活性はカルシニューリンによる脱リン酸化により上昇し、Cdk5 によるリン酸化で抑制されることが知られている。これらの知見に基づいて我々は、軸索ガイダンスにおける PIP キナーゼ $\text{I}\gamma 90$ 、カルシニューリンおよび Cdk5 の寄与を検証した。その結果、反発性 Ca^{2+} シグナルの下流におけるエンドサイトーシス促進には PIP キナーゼ $\text{I}\gamma 90$ とカルシニューリンの活性が必要であることが判明した。その一方で、誘引性 Ca^{2+} シグナルの下流においては CaM キナーゼ II を介して Cdk5 がエンドサイトーシス抑制に働いていた。重要なことに、Cdk5 阻害剤または CaM キナーゼ II 阻害剤の存在下では、誘引性 Ca^{2+} シグナルに応じてエクソサイトーシスとエンドサイトーシスの両者が成長円錐の片側(Ca^{2+} シグナル側)で活性化しており、この時成長円錐は方向転換できずに直進した。この直進は、エンドサイトーシス阻害剤 MDC の追加投与により誘引に、エクソサイトーシス阻害剤 TeNT の追加投与により反発に転換した。以上の結果により、異なる二つの Ca^{2+} 依存性経路によってエンドサイトーシスが拮抗的制御を受けること、さらには、成長円錐の進行方向は成長円錐の片側でのエクソサイトーシスとエンドサイトーシスのバランス制御により決定されることが明らかになった(J Neurosci 誌に原著論文投稿中)。

研究テーマ B 「非対称性環状ヌクレオチドシグナルによる軸索ガイダンス駆動機構」

細胞外環境に存在する軸索ガイダンス因子の空間情報を感知して成長円錐が方向転換(誘引/反発)するためには、成長円錐内部で何らかのシグナル分子が非対称化する必要があるが、上述のように、これまでは空間情報をコードするセカンドメッセンジャーとして Ca^{2+} のみが同定されていた。一方で、環状ヌクレオチド(cAMP、cGMP)は同一のガイダンス因子に対する成長円錐の応答性の切替え(誘引 \rightleftharpoons 反発)に重要なセカンドメッセンジャーとして知られてきたが、その成長円錐内での空間分布は不明であった。そこで本項目では、成長円錐内における環状ヌクレオチドの空間分布の重要性を解析した。成長円錐の片側でケージド cAMP またはケージド cGMP を光解離したところ、成長円錐はそれぞれ誘引または反発を呈した。すなわち、非対称的な空間分布を持った cAMP/cGMP シグナルが方向転換の十分条件になりうるということが判明した。そこで、これら環状ヌクレオチド下流で成長円錐の方向転換を駆動する分子メカニズムについて解析を進めた。ケージド cAMP/cGMP 光解離に応じた微小管動態の変化を観察したところ、cAMP/cGMP 上昇に応じて成長円錐周辺部への微小管の侵入が促進/抑制された。またそれに伴って、成長円錐周辺部への VAMP7 陽性小胞の微小

管依存性順行輸送の頻度が増加／減少した。さらに、VAMP7 依存性エクソサイトーシスの阻害により、cAMP/cGMP 依存的な成長円錐の誘引／反発は阻害された。その一方で、非対称性 Ca²⁺シグナルの下流では微小管動態およびVAMP7の寄与は無かった。過去の我々の報告では、Ca²⁺シグナル下流では VAMP2 依存性エクソサイトーシスが機能することが明らかになっていることから、cAMP/cGMPはCa²⁺とは異なる膜トラフィッキング機構を用いて方向転換を誘発することが明らかになった。

研究テーマAの結果と併せて考えると、ガイダンス因子受容時の成長円錐内では Ca²⁺と環状ヌクレオチドの両方が非対称化しており、そのそれぞれが異なる膜トラフィッキング機構を活性化していることが強く示唆される(図1)。これら複数のシグナル経路の共存は、成長円錐の運動の正確性を補償すると推察される。また、Ca²⁺と環状ヌクレオチドの相互作用(ポジティブフィードバック、側方抑制)により、細胞外で緩やかな濃度勾配分布を示すガイダンス因子の空間情報が成長円錐内で急峻化される効果も考えられる。

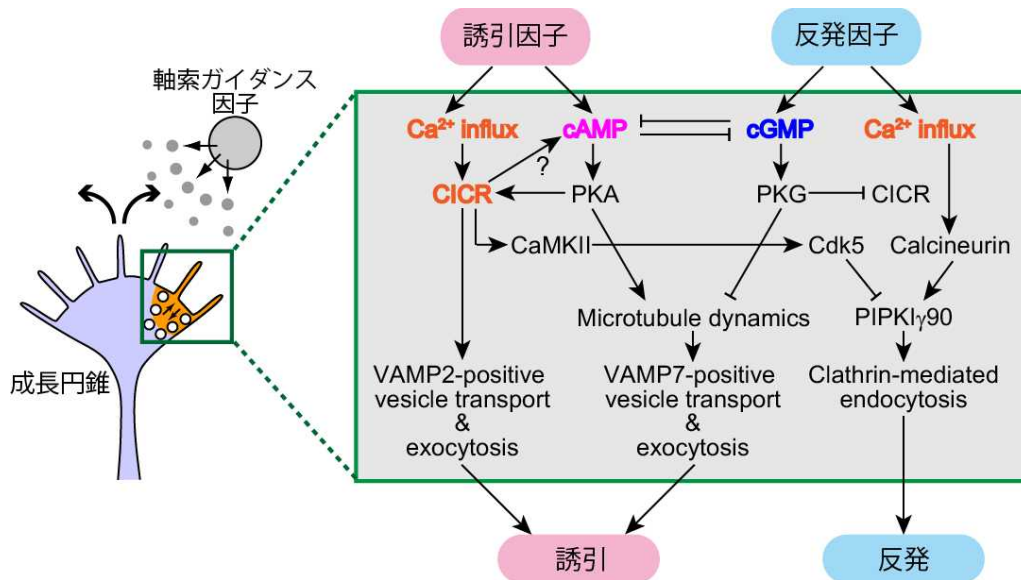


図1. 成長円錐の誘引と反発を制御するシグナル伝達ネットワーク
成長円錐の片側でこれらのシグナル伝達ネットワークが活性化し、エクソサイトーシスとエンドサイトーシスのバランスが不均衡化されることで成長円錐は進行方向を転換する。

研究テーマC 「複数の軸索ガイダンス因子による成長円錐の方向転換」

上述のように、培養系を用いた研究により、一つの成長円錐が一つのガイダンス因子に対して応答する「一対一対応」の細胞内メカニズムの概要が明らかになってきた。しかし一方で、生体組織内での軸索ガイダンスを司る細胞内シグナル伝達の研究は立ち遅れている。興味深いことに、組織内においては複数のガイダンス因子が相補的な空間プロファイルを持って発現している領域が多く見られる。代表的な例は、発生期の脊髄底板の頭尾軸方向に形成される誘引因子 Wnt4 と反発因子 Shh の相補的な濃度勾配であり(頭側で Wnt4、尾側で Shh が高濃度)、正中交差後の脊髄交連神経の軸索成長円錐はこれに誘導されて頭方向へ方向転換する。このことから、一つの成長円錐が複数の因子の異なる空間情報を同時に読み取ることが、組織内での経路選択の正確性に重要であると考えられる。そこで本項目では、一つ

の成長円錐が同時に二つのガイダンス因子に遭遇した際の、「多対一対応」の制御メカニズムについて研究を行った。まず培養実験系において、誘引因子 PACAP と反発因子 Sema3A の相補的濃度勾配に対する成長円錐の応答性を解析した。その結果、PACAP または Sema3A の単独投与では成長円錐が反応出来ない濃度条件においても、両者が共存することにより成長円錐が方向転換できるようになることが明らかになった。続いて、成長円錐内での環状ヌクレオチドを可視化解析したところ、PACAP と Sema3A の相補的濃度勾配存在下では、環状ヌクレオチドの非対称的分布が見られた。以上の結果により、複数のガイダンス因子の情報が成長円錐内でセカンドメッセンジャーにより統合・増幅されることでより正確な軸索投射が達成される可能性が示された。

3. 今後の展開

今後は、組織内を走行する成長円錐内でのセカンドメッセンジャー動態を可視化解析してゆく。現在までに我々は、in ovo 電気穿孔法を用いてニワトリ胚脊髄交連神経細胞に各種蛍光タンパク質センサーを導入し卵内で発生させた後、脊髄オープンブック標本を作製し多光子励起レーザー顕微鏡により観察する実験系を確立した。この系によって、組織内で複数のガイダンス因子に遭遇して方向転換を行っている最中の成長円錐内の環状ヌクレオチドおよび Ca^{2+} 動態を観察してゆく予定である。これにより、今まで主に培養細胞のみを用いて研究されてきた軸索ガイダンスの細胞内メカニズムの知見が生体内においても機能しているのかどうかを確認し、普遍的な神経回路形成機構の包括的解明へと繋げて行きたい。さらに、これらの知見を応用することで、脳脊髄損傷後の再生軸索成長円錐を本来の正しい標的へ誘導するための再生医療技術開発に貢献したい。

4. 評価

(1) 自己評価

本課題では、神経回路形成を担う極めて重要な素過程の一つである神経軸索ガイダンスを制御する細胞内シグナル伝達メカニズムについて研究を進めた。分散培養系を用いて行った研究では非常に多くの知見を得ることができ、その成果の一部をまとめた原著論文を現在投稿中である。またこれらの知見により、多種多彩な軸索ガイダンス因子に反応して成長円錐が臨機応変に自らの移動方向を選択するための普遍的な原理を提唱することが出来たと考えている (Tojima et al, Nat Rev Neurosci 12: 191-203, 2011)。一方で、本課題の最終目標であった、生体組織内を走行する成長円錐における解析は、その実験系の確立までに留まった。今後はこの実験系を用いて、より複雑な生体内における軸索ガイダンス機構を解明して行きたい。組織内での成長円錐内ライブイメージングは非常に困難でチャレンジングな課題であったが、さきがけの手厚いサポートを頂いたおかげで、今後の研究の発展につながる重要な基礎を築くことが出来た。総括の村上富士夫先生をはじめ、アドバイザーの先生方、さきがけ研究者の皆様、JST関係者の皆様に心より感謝を申し上げます。

(2) 研究総括評価

神経軸索が正しい標的に誘導されるメカニズムについては古くから研究がなされて、軸索

ガイダンス因子に関する研究は大きく進んだ。それを受容する成長円錐における細胞内メカニズムについてはその研究が遅れていたが、先の戸島研究者らによる小胞体からのCa放出および膜トラフィッキングの意義に関する先導的発見により大きく展開した。本研究では、Caシグナルから膜トラフィッキングへのシグナル系、および環状ヌクレオチド(cAMP, cGMP)シグナルなどについて解析を展開し、プロテインキナーゼ/フォスファターゼ群の関与によるエクソ/エンドサイトーシスの制御、および両環状ヌクレオチド濃度の軸索先端部における空間分布などを見出し、成長円錐の方向転換を制御するメカニズムの機構の理解を大きく進展させたものであり、その意義は非常に大きい。こうして浮き彫りにされてきた軸索ガイダンスの精妙複雑な分子メカニズムに基づき、生体内での複数のガイダンス因子シグナルの統合・増幅を理解できる視界が開け、またこの重要な生理プロセスの正確性を保証するロバストネスが得心できるようになった。今後は、準備を進めている生体組織内での解析においてこれらの発見が確認・拡張され、さらに他の細胞種との関係を含め in vivo 特有の現象の解析が進展して、例えば脊髄損傷などの臨床的課題において単なる軸索再生のみでなく機能的再生へと誘導できる手掛かりが得られることが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kuboyama T, Luo X, Park K, Blackmore MG, **Tojima T**, Tohda C, Bixby JL, Lemmon VP, Kamiguchi H. Paxillin phosphorylation counteracts proteoglycan-mediated inhibition of axon regeneration. *Experimental Neurology* 248: 157-169, 2013.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表(シンポジウム、招待講演のみ)

1. **Takuro Tojima**. Signaling mechanisms of neuronal growth cone guidance induced by chondroitin sulfate. International Symposium on Glyco-Neuroscience, Awaji, 2014年1月9日
2. **Takuro Tojima**. Signaling and driving mechanisms underlying bidirectional axon guidance. NIG Symposium 2013 "Frontiers of Genetics in NIG", Mishima, 2013年9月23日
3. **戸島拓郎**. 神経軸索ガイダンスを制御するシグナル伝達クロストーク. 第86回日本生化学会大会、横浜、2013年9月13日
4. **戸島拓郎**. 軸索ガイダンスを制御する糖鎖受容機構の解明. 平成25年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ、名古屋、2013年9月1日
5. **Takuro Tojima**. Ca²⁺-dependent regulation of membrane trafficking controls

- neuronal growth cone guidance. 熊本大学発生医学研究所 平成 24 年度リエゾンラボ研究会、熊本、2013 年 3 月 6 日
6. **戸島拓郎**. 神経成長円錐ガイダンスを駆動するシグナル伝達機構. 生理学研究所 所長招聘セミナー、岡崎、2013 年 2 月 1 日
 7. **戸島拓郎**. 神経成長円錐の応答性を指標とした糖鎖機能ドメインの解析. 平成 24 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ、仙台、2012 年 7 月 25 日
 8. **Takuro Tojima**, Rurika Itofusa, Hiroyuki Kamiguchi. Ca²⁺ signaling and membrane trafficking mediate neuronal growth cone guidance. Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, Kobe, 2012 年 5 月 30 日

受賞

1. 理研研究奨励賞、2011 年 3 月 10 日
2. 日本神経科学学会奨励賞、2011 年 9 月 15 日

総説論文

1. **Tojima T**. Intracellular signaling and membrane trafficking control bidirectional growth cone guidance. *Neuroscience Research* 73: 269-74, 2012.
2. 秋山博紀, **戸島拓郎**, 上口裕之. 神経軸索突起の進路決定メカニズム. *生化学* 84: 848-853, 2012.
3. **Tojima T**, Hines JH, Henley JR, Kamiguchi H. Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering. *Nature Reviews Neuroscience* 12: 191-203, 2011.
4. **戸島拓郎**, 秋山博紀, 上口裕之. 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, 2011.

著作物等

1. **戸島拓郎**, 上口裕之. サイクリック AMP. *脳科学辞典* <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/サイクリックAMP>
2. **Tojima T**, Kamiguchi H. 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, 2011.