

神経成長機構研究チーム

Laboratory for Neuronal Growth Mechanisms

チームリーダー 上 口 裕 之
KAMIGUCHI, Hiroyuki

神経軸索回路網の形成過程において、軸索先端部（成長円錐）はその周囲環境の分子情報を感じ、軸索突起を標的まで誘導・牽引する。成長円錐に発現する神経接着分子は、軸索突起の誘導・成長に重要な役割を担っている。例えば、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する神経接着分子 L1 の遺伝子変異は、ヒトおよびマウスにおいて脳梁・錐体路といった神経軸索路の形成不全の原因となることが知られている。細胞間接着あるいは細胞-細胞外基質間の接着により活性化された神経接着分子は、細胞内情報伝達および細胞骨格との相互作用を介して成長円錐の運動を制御する。我々は、成長円錐における神経接着分子・細胞骨格・情報伝達分子の部位特異的かつ協調的な役割を研究し、軸索成長の分子機構の解明および軸索再生の分子細胞生物学的基盤の確立を目指している。

1. 神経軸索での細胞骨格の機能解析

(1) 細胞骨格関連分子による神経突起の極性維持機構（西村，上口）

軸索と細胞体/樹状突起の形質膜には異なる脂質・タンパク質分子が発現しており、これらの分子の拡散を抑制する軸索起始部拡散障壁の存在が確認されている。我々のこれまでの研究から、細胞骨格関連分子（アンキリン G、 β IV スペクトリン）が軸索起始部拡散障壁を構成することが明らかになっている。本年度については、アンキリン G/ β IV スペクトリンから構成される拡散障壁の分子選択性に関する研究を行った。神経軸索に局限して発現する神経接着分子 L1 の細胞体方向への拡散は本障壁により制限されたが、GPI 結合型膜タンパク Thy-1 の拡散はアンキリン G/ β IV スペクトリンの発現に依存しなかった。また、細胞体/樹状突起に局限して発現する膜タンパク（グルタミン酸受容体、テレンセファリン）の軸索方向への拡散は、軸索起始部よりも細胞体近位に存在する軸索丘（axon hillock）により制限されることが示唆された。よって、アンキリン G/ β IV スペクトリンから構成される軸索起始部拡散障壁以外にも、構成分子と細胞内局在が異なる拡散障壁が存在し、これら複数の拡散障壁が神経突起の極性維持に関与することが示唆された。

(2) 成長円錐の三次元運動解析（玉田，河瀬，上口）

マウス海馬神経細胞を三次元コラーゲン基質内に培養して軸索突起の形態を経時的に解析することにより、成長円錐の新たな運動様式を発見した。この三次元的な運動は、成長円錐糸状仮足に存在するアクチン線維に依存的であり、また軸索の伸長方向の決定に関与することが明らかになった。

2. 軸索成長を制御する細胞内情報伝達系の解析

(1) 成長円錐 Ca^{2+} シグナルの解析（大声，戸島，秋山，上口）

軸索の伸長方向の決定（ガイダンス）には成長円錐細胞質 Ca^{2+} シグナルが重要な役割を担っており、成長円錐の片側性の Ca^{2+} 濃度上昇は軸索伸長の方向を制御することが知られている。脊髄後根神経節神経細胞の成長円錐には、細胞内 Ca^{2+} ストアから細胞質への 2 次的 Ca^{2+} 流入（CICR: Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release）を媒介する 3 型リノドイン受容体（RyR3）が発現しており、RyR3 ノックアウトマウスの解析により軸索ガイダンスにおける CICR の働きが明らかになった。RyR3 からの CICR を伴う成長円錐片側性 Ca^{2+} シグナルは軸索伸長を Ca^{2+} シグナル側に方向転換し、CICR を伴わない片側性 Ca^{2+} シグナルは軸索伸長を反対方向に転換した。このように、成長円錐細胞質への Ca^{2+} 流入源（チャンネル）の相違により軸索伸長方向が逆転するという知見を得た。また、RyR3 ノックアウトマウスの脊髄では後根神経節神経細胞の軸索走行に異常が見られ、RyR3 は個体レベルでの軸索ガイダンスにも関与することが明らかになった。

細胞内 Ca^{2+} ストアから細胞質への 2 次的 Ca^{2+} 流入（CICR: Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release）を媒介する 3 型リノドイン受容体（RyR3）が発現しており、RyR3 ノックアウトマウスの解析により軸索ガイダンスにおける CICR の働きが明らかになった。RyR3 からの CICR を伴う成長円錐片側性 Ca^{2+} シグナルは軸索伸長を Ca^{2+} シグナル側に方向転換し、CICR を伴わない片側性 Ca^{2+} シグナルは軸索伸長を反対方向に転換した。このように、成長円錐細胞質への Ca^{2+} 流入源（チャンネル）の相違により軸索伸長方向が逆転するという知見を得た。また、RyR3 ノックアウトマウスの脊髄では後根神経節神経細胞の軸索走行に異常が見られ、RyR3 は個体レベルでの軸索ガイダンスにも関与することが明らかになった。

(2) 神経接着分子トラフィッキングの解析（仲田，上口）

成長円錐周辺部に存在するアクチン線維は、空間特異的重合/脱重合およびミオシンモーターの作用により後方に（成長円錐中心部方向に）移動している。このアクチン後方移動と神経接着分子がクラッチ分子を介して連結すると、アクチン後方移動由来の牽引力が細胞外環境へと伝達され、成長円錐が前方へ移動する。成長円錐前方移動に伴って細胞表面を後方に移動した神経接着分子が何らかの機序により先端縁形質膜へ再利用されることにより、成長円錐の接着性の極性（先端縁での強い接着と後部での脱接着）が維持される。神経接着分子 L1 は細胞内小胞輸送を介した経路により再利用され、この L1 トラフィッキングは軸索伸長に必須であることを明らかにしている。L1 細胞内領域のアミノ酸配列（YRSL）はクラスリンアダプター AP2 と結合し L1 エンドサイトーシスを誘起するが、この YRSL 配列の N 末端側に存在する 1,181 番目のセリン残基のリン酸化がエンドサイトーシスされた L1 の行き先を制御することを示した。1,181 番目のセリンはカゼインキナーゼ II によりリン酸化される。カゼインキナーゼ II 阻害剤投与あるいは 1,181 番目のセリンを置換することにより、L1 は正常のエンドサイトーシス経路を逸脱し、L1 依存性の軸索伸長は抑制された。以上により、L1 細胞内領域セリンリン酸化の機能的意義を明らかにした。

3. 軸索成長における脂質ラフトの機能解析 (小西, 宮川, 上口)

神経細胞の細胞膜にはスフィンゴ脂質とコレステロールと特定のタンパク質が集積した界面活性剤難溶性領域 (脂質ラフト) が存在し, 脂質ラフトは細胞内情報伝達に重要な役割を担うと考えられている。神経接着分子 L1 は脂質ラフトおよび非ラフト領域の双方に存在し, L1 依存性軸索伸長は成長円錐周辺部のラフトを必要とすることを明らかにしている。そこで, L1 による軸索伸長の情報伝達系を明らかにする目的で, L1 へのリガンド結合により脂質ラフト内外を移動するタンパク質の網羅的解析を行った。L1 のホモフィリックリガンドである L1-Fc キメラとその対照として Fc タンパクを大量に作製・精製し, マウス小脳顆粒細胞培養系に添加した。L1-Fc 刺激した培養神経細胞と Fc 処理した培養神経細胞を, それぞれ生化学的手法により脂質ラフト分画と非ラフト分画に分離し, ディファレンシャル二次元電気泳動により発現するタンパク質の網羅的解析を行った。L1-Fc 刺激群・Fc 処理群のラフト・非ラフト分画を比較し, L1-Fc 刺激によりラフト内外で量比に有意な変動が見られたタンパク質スポットを約 40 種類ほど同定した。現在, この量比変動の再現性を確認している。また, 抗体マイクロアレイ法を用いて, L1-Fc 刺激群・Fc 処理群のラフト・非ラフト分画に存在する約 500 種類の抗原をスクリーニングし, L1-Fc 刺激によりラフト内外で量比に有意な変動が見られたタンパク質を約 20 種類ほど同定した。現在, この量比変動の再現性をウェスタンブロットにより確認している。

Complex yet precise neural networks are formed by axons that have elongated and reached their appropriate targets. The tip of an elongating axon, called the growth cone, explores guidance cues in its microenvironment and navigates the axon along the correct path. The growth cone expresses a variety of cell surface molecules including cell adhesion molecules (CAMs) that serve as receptors for the guidance cues and play critical roles in axon tract development. For example, mutations of L1, which belongs to the immunoglobulin superfamily of CAMs, cause defects in major axon pathways, such as the corpus callosum and the corticospinal tract, in humans and mice. In response to cell-cell or cell-extracellular matrix contacts, CAMs generate intracellular signals, interact with cytoskeletal components, and regulate the motility of growth cones. Spatially localized actin polymerization/depolymerization and actin-myosin interactions generate a retrograde flow of actin filaments (F-actin), which then produces the traction force to pull the growth cone forward when coupled mechanically with CAMs via a molecular clutch. Furthermore, the growth cone actively internalizes, transports, and recycles CAMs in a way important for its directed migration. Therefore, we aim to investigate the region-specific and coordinated roles of CAMs, signaling molecules, and cytoskeletal components in the growth cone and to reveal how dynamic interactions between these molecules control growth cone migration and navigation. These revelations will help elucidate the fundamental mechanisms of axon growth and establish the molecular and cellular biological basis for axon regeneration. In the fiscal year 2004, we have obtained the following results:

1. Functional analyses of the cytoskeleton in the axon

Using 3-dimensional neuronal cultures, we found a novel mode of growth cone motility that is driven by the actin cytoskeleton in the filopodia. This motile behavior of the filopodia is likely to influence the direction of axon elongation. We also demonstrated that β IV spectrin and ankyrinG form a selective barrier in the initial axon segment that blocks lateral diffusion of an axon-specific molecule into the somatodendrites. In this way, these cytoskeletal components may be involved in the maintenance of axon-dendrite polarity.

2. Studies on the intracellular signals that regulate axon growth and guidance

We demonstrated that axon guidance is controlled by Ca^{2+} influx to the growth cone cytoplasm via the ryanodine receptor type 3 (RyR3). While a localized elevation of cytoplasmic Ca^{2+} concentration on one side of a growth cone induces axon turning, the turning direction is dependent on the secondary Ca^{2+} release (CICR) from the internal stores through the RyR3. Unilateral Ca^{2+} signals accompanied by RyR3-CICR induce growth cone attraction whereas Ca^{2+} signals without CICR induce repulsion.

3. Functional analyses of lipid rafts in growing axons

The plasma membrane of the growth cone periphery contains lipid rafts (detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-enriched membranes) that are required for axon growth stimulated by L1 and N-cadherin. We performed comprehensive surveys to search for proteins that translocate into or out of lipid rafts in response to L1 ligation. We identified about 40 protein spots by 2-dimensional electrophoresis analyses and about 20 proteins by antibody microarrays.

Staff

Laboratory Head

Dr. Hiroyuki KAMIGUCHI

Research Scientists

Dr. Akio KONISHI

Dr. Kazunari NISHIMURA

Dr. Atsushi TAMADA

Dr. Takuro TOJIMA

Technical Staff I

Mr. Hiroki AKIYAMA

Mr. Satoshi KAWASE

Ms. Yukie MIYAKAWA

Ms. Asuka NAKATA

Ms. Noriko OOASHI

Technical Staff II

Ms. Natsuko MATSUZAKI

Assistants

Ms. Hiroko IWASAKI

Junior Research Associates

Ms. Mie MITSUI

RIKEN/BSI Collaborators

Dr. Yoshio HIRABAYASHI (Hirabayashi Res. Unit., BSI)

Dr. Katsuhiko MIKOSHIBA (Lab. Dev. Neurobiol., BSI)

Dr. Atsushi MIYAWAKI (Lab. Cell Funct. Dyn., BSI)

Outside Collaborators

Dr. Akira FUTATSUGI (Int. Coop. Res. Project "Calcium Oscillation", Japan Sci. Technol. Coop.)

Dr. Masayuki KOMADA (Dept. Biol. Sci., Tokyo Inst. Technol.)

Dr. Vance LEMMON (The Miami Project to Cure Paralysis, Univ. Miami, USA)

Visiting Scientists

Dr. Adam T. GUY (JSPS)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Itoh K., Cheng L., Kamei Y., Fushiki S., Kamiguchi H., Gutwein P., Stoeck A., Arnold B., Altevogt P., and Lemmon V.: "Brian development in mice lacking L1-L1 homophilic adhesion", *J. Cell Biol.* **165**, 145–154 (2004). *

(総 説)

上口裕之: "成長円錐脂質ラフトによる神経軸索伸長制御", *細胞工学* **23**, 1044–1046 (2004).

伊藤恭子, 上口裕之: "X連鎖性遺伝性水頭症のモデル動物", *細胞工学* **23**, 1414–1417 (2004).

戸島拓郎, 上口裕之: "神経軸索ガイダンスを制御する細胞内シグナル伝達のダイナミクス", *実験医学* **22**, 2130–2135 (2004).

上口裕之: "神経突起成長の力学的メカニズム: クラッチ機構と細胞接着空間的制御", *神経化学* **43**, 17–25 (2004).

上口裕之: "神経軸索成長の分子機構の研究", *神経化学* **43**, 671–676 (2004).

西村一成, 上口裕之: "神経軸索成長を制御する分子クラッチ機構", *蛋白質 核酸 酵素* **49**, 2206–2214 (2004).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Nishimura K., Yoshihara F., Tojima T., Ooashi N., Yoon

W., Mikoshiba K., Bennett V., and Kamiguchi H.: "L1-dependent neuritogenesis involves ankyrinB that mediates L1 coupling with retrograde actin flow.", 57th Ann. Meet. of the Japan Soc. for Cell Biology, Toyonaka, May (2004).

Kamiguchi H.: "The role of ankyrins in neurite growth and polarization", 5th Ann. Retreat of Picower Center for Learning and Memory, Kennebunkport, USA, June (2004).

Kamiguchi H.: "Molecular mechanisms of neurite growth and polarization", JSPS Academic Seminar, (Maison Universitaire France-Japon), Strasbourg, France, June (2004).

Kamiguchi H.: "The role of lipid microdomains in axon growth", Seminar in the Neurosciences Institute, (Universite Louis Pasteur), Strasbourg, France, June (2004).

Kamiguchi H.: "The role of lipid microdomains in axon growth", Sapporo Summer Conf. 2004, Sapporo Sphingolipid Symp., (Hokkaido University), Sapporo, July (2004).

Tamada A.: "Role of choroid plexus-derived chemorepellents in neuronal circuit formation", 16th Int. Congr. of the IFAA: Anatomical Science 2004 from Gene to Body, Kyoto, Aug. (2004).

Kamiguchi H.: "Regulation of axon growth by cell adhesion molecules", 56th Ann. Meet. of The Korean Physiological Soc., Suwon, Korea, Oct. (2004).

Nishimura K.: " β IV spectrin forms a diffusion barrier that maintains polarized L1 distribution in the axon", 6th China-India-Japan-Korea Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics (NBNI-2004), (National Brain Research Centre, India), Manesar, India, Nov. (2004).

Kamiguchi H.: "The role of Ankyrins in neurite growth and polarization", 6th China-India-Japan-Korea Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics (NBNI-2004), (National Brain Research Centre, India), Manesar, India, Nov. (2004).

Kamiguchi H.: "The molecular clutch regulating neurite growth", 8th Membrane Research Forum, 18th Cell Biology Symp., (Japan Society for Cell Biology and others), Nagoya, Nov. (2004).

(国内会議)

上口裕之: "神経突起成長の力学的メカニズム", 第3回日本再生医療学会総会, 千葉, 3月 (2004).

上口裕之: "神経軸索成長の分子機構の研究", 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9月 (2004).

上口裕之: "The role of Ankyrins in neurite growth and polarization", 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月 (2004).