

2006年12月11日  
独立行政法人 理化学研究所

## 神経細胞の突起が伸びる方向を転換するメカニズムを発見

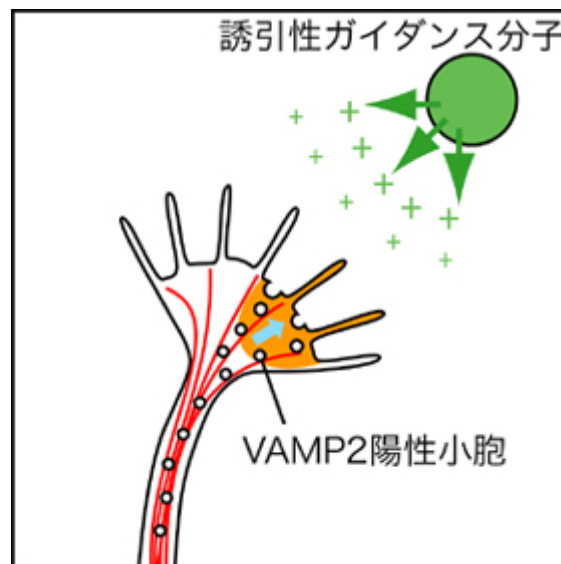
- 神経回路網の構築に重要な役割を果たす新たな知見 -

私達の脳神経系の神経回路は、数多くの神経細胞から伸びた突起（神経突起）が、複雑で精巧に絡み合うとともに、さまざまな組織の中を通り抜けながら作られる連絡網です。神経突起が正しい方向に伸び、目的のところに到達して神経回路が出来上がりますが、そのメカニズムはまだ明らかになっていません。

理研脳科学総合研究センター神経成長機構研究チームの上口裕之チームリーダーらは、神経突起が伸びていく方向を定める機構を明らかにし、神経回路が作られる時に重要な役割を担っている“神経突起ガイダンス”の分子機構の一端を明らかにしました。

神経突起の先端部は、“成長円錐”と呼ばれ、周囲にある“ガイダンス分子”を感受して移動方向を決定していきます。この成長円錐内部の細胞膜の袋（小胞）には、細胞膜同士の融合を担う機能分子“VAMP2”が含まれていて、この小胞が非対称に輸送されて成長円錐表面を覆う膜と融合することによって、神経突起の伸びる方向が転換されていたのです。

この発見は、神経回路が作られる仕組みの解明に役立つばかりか、損傷した神経回路を修復する技術開発に大きな革新をもたらすと考えられます。



(イメージ図) 神経突起ガイダンスの仕組み

2006年12月11日  
独立行政法人 理化学研究所

## 神経細胞の突起が伸びる方向を転換するメカニズムを発見

- 神経回路網の構築に重要な役割を果たす新たな知見 -

### ◇ポイント◇

- 神経突起での非対称的な細胞膜の輸送を発見
- 神経突起が誘引性物質に向かって方向転換する際には非対称膜輸送が駆動力に
- 損傷した神経回路の修復技術開発に貢献することが期待

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、神経細胞の神経突起<sup>※1</sup>の内部にある膜構造（細胞内膜）が動く様子を詳しく解析し、曲がる方向への細胞内膜の非対称輸送により、神経突起の伸びる方向を変えていることを世界で初めて発見しました。このことは、神経回路の構築に重要な役割を果たす神経突起ガイダンス<sup>※2</sup>の分子機構に新たな知見をもたらすものです。理研脳科学総合研究センター（甘利俊一センター長）神経成長機構研究チームの上口裕之チームリーダー、戸島拓郎基礎科学特別研究者らによる研究成果です。

脳神経系の神経回路は、多数の神経細胞から伸びた突起が複雑かつ精巧に絡み合った連絡網です。成長円錐<sup>※3</sup>と呼ばれる神経突起の先端部は、その周囲環境に存在する標識（ガイダンス分子<sup>※4</sup>）を感受して移動方向を決定します。ガイダンス分子には、成長円錐を誘引する因子と反発する因子があります。例えば、成長円錐の片側が誘引性ガイダンス分子に遭遇すると、成長円錐は遭遇側へと旋回し、神経突起は誘引性ガイダンス分子に向かって伸長します。

研究チームでは、神経突起の成長円錐の内部には細胞膜の小胞<sup>※5</sup>が多く存在し、これらの小胞には成長円錐の移動を制御する機能分子も含まれていることを明らかにしました。通常これらの小胞は、成長円錐の後部から中心部に集積していますが、成長円錐の片側が誘引性ガイダンス分子に遭遇すると、遭遇側でのみ成長円錐の先端に向かって小胞が輸送され、小胞と形質膜<sup>※6</sup>の融合・一体化（エキソサイトosis<sup>※7</sup>）が起こります。このように、誘引性ガイダンス分子による神経突起の伸長は、成長円錐内部での小胞輸送の非対称化といった比較的単純なメカニズムにより駆動されていることが分かりました。

発生期に神経回路が作られる仕組みを解明し、また損傷した神経回路を修復する技術を開発するためには、神経突起を正しい方向に誘導するメカニズムの理解が必須です。本研究は、方向を転換する際の成長円錐での非対称性膜輸送の存在を証明し、神経突起ガイダンスの新たな駆動機構を発見した意義のある成果です。

本研究成果は、米国の科学雑誌「Nature Neuroscience（2006年12月10日・オンライン）」に公開されます。

## 1. 背景

脳神経系の働きの中心を担う神経回路は、多数の神経細胞から伸びた突起が複雑

かつ精巧に絡み合った連絡網を形成していますが、どのような仕組みで連絡網をつくっているかは、まだ十分に解明されていません。神経細胞の突起の先端部（成長円錐）は、アメーバ状に広がった運動性に富む構造で（図1）、周囲の細胞外環境に存在するガイダンス分子を感受して、神経突起を正しい方向へ伸ばすことが明らかとなっています。多くのガイダンス分子は、成長円錐から離れた場所にある細胞から産生・放出されて、成長円錐近傍の細胞外に濃度の勾配を作ります。ガイダンス分子には成長円錐を誘引する因子と反発する因子があり、成長円錐は誘引性ガイダンス分子の濃度勾配を上る方向あるいは反発性ガイダンス分子の濃度勾配を下る方向に移動します（図2）。誘引性と反発性のガイダンス分子は、成長円錐の表面（形質膜）に存在する受容体に結合し、細胞質カルシウムイオン（ $\text{Ca}^{2+}$ ）シグナル<sup>\*8</sup>を生成して、最終的に神経突起を誘引もしくは反発します。成長円錐の片側により多く結合したガイダンス分子は、同側の細胞質で $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を上昇させて成長円錐の移動方向を転換します。すなわち、成長円錐の片側（ガイダンス分子に遭遇した側）で発生した $\text{Ca}^{2+}$ シグナルは、成長円錐をどちらの方向にも旋回させることができます（図2）。すでに研究チームでは、成長円錐を誘引する $\text{Ca}^{2+}$ シグナルと反発する $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの性質の違いを明らかにしており、また成長円錐の片側に誘引性あるいは反発性 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを人工的に生成する手法を確立しています。

このように成長円錐片側の $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが神経突起ガイダンスを誘起することは知られていましたが、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルがどのような駆動機構を活性化して神経突起の伸長方向を自由に転換するのかは未解決の問題でした。研究チームは、成長円錐の $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの下流で起きている細胞内現象を詳細に解析し、神経突起ガイダンスの駆動機構を解明するための研究を行ってきました。

## 2. 研究手法と成果

研究チームは、発生期のニワトリの脊髄神経節神経細胞を分散培養し、FM1-43という脂溶性蛍光色素を使用して細胞内膜を標識しました。この神経細胞を顕微鏡の観察用ステージ上で培養し、細胞体から伸長した神経突起の先端部（成長円錐）に $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを人工的に生成し、FM1-43標識された内膜系の動態を解析しました。 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル生成前には、FM1-43標識された細胞内膜小胞は成長円錐の中心部に集積していましたが、誘引性 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを生成すると、FM1-43標識膜小胞は成長円錐周辺部へ輸送されました（図3）。この小胞輸送は誘引性 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル発生から5秒以内に開始し、また $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが生成している反対側では小胞輸送は促進されませんでした。FM1-43標識小胞とは異なる細胞内膜の動態も解析するため、VAMP2<sup>\*9</sup>というタンパク質を含む小胞の動きも追跡しました。すると、FM1-43標識小胞と同じように、成長円錐片側での誘引性 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルはVAMP2陽性小胞の非対称的輸送を促進しました。

次に、誘引性 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルにより成長円錐周辺部へ運ばれた膜小胞がエキソサイトーシスされるか否かを検証しました。形質膜と融合した膜小胞の形態を光学顕微鏡で観察することはできないため、膜小胞が形質膜と融合する前後に小胞内のpHが変化することを利用してエキソサイトーシスを間接的に観察しました。小胞内腔のpH値は約5.5の弱酸性ですが、小胞が形質膜と融合すると、小胞内腔は細胞外液（pH=7.3の中性）と混ざるためpH値が上昇します。理研脳科学総合研究センター

細胞機能探索技術開発チーム（宮脇敦史チームリーダー）が作製したpH感受性蛍光タンパク質をVAMP2に付加した人工的なタンパク質を神経細胞に導入すると、VAMP2陽性小胞の内にpH感受性蛍光タンパク質を局在させることができます。すなわち、このpH感受性蛍光タンパク質が発する蛍光強度を定量することで、膜小胞のエキソサイトーシスを観察することができました（図4）。この手法とCa<sup>2+</sup>シグナル生成法を組み合わせた実験を行い、成長円錐片側の誘引性Ca<sup>2+</sup>シグナルにより周辺部へ運ばれた膜小胞はエキソサイトーシスされること、すなわち成長円錐周辺部に非対称的に膜成分が供給されることを証明しました（図5）。

さらに、このような非対称性の膜小胞輸送とエキソサイトーシスが成長円錐の旋回に必須か否かを検証するために、破傷風毒素を使ってVAMP2機能阻害実験を行いました。VAMP2は、膜小胞が形質膜と融合してエキソサイトーシスされるために必要なタンパク質ですが、神経細胞を破傷風毒素で処理すると、VAMP2が切断されて不活性化されるため、成長円錐での膜小胞エキソサイトーシスが阻害されました。このように膜小胞をエキソサイトーシスできない成長円錐は、誘引性Ca<sup>2+</sup>シグナルに反応して旋回することができず（図6）、また誘引性ガイダンス分子の濃度勾配を感受して旋回することもできないことが明らかとなりました。この実験により、成長円錐での非対称性小胞エキソサイトーシスは神経突起の誘引性ガイダンスに必須であることが証明されました。

また、神経突起の反発性ガイダンスにおける非対称性膜輸送の関与も検証しました。成長円錐片側に反発性Ca<sup>2+</sup>シグナルを生成しても、膜小胞輸送は非対称化されませんでした。また破傷風毒素で膜小胞エキソサイトーシスを阻害しても、成長円錐は反発性に旋回することができました。すなわち、成長円錐でのVAMP2陽性膜小胞動態の非対称化は、神経突起の誘引性ガイダンスには必須ですが、反発性ガイダンスには関与しないことが示されました（図7）。これまでの当該研究分野の常識的解釈としては、成長円錐において同一の駆動機構の方向が左右逆転することで、神経突起の誘引と反発が切り替わるものと考えられてきました。しかし本研究成果により、神経突起の誘引と反発は異なる駆動機構に依存することが明らかになりました。

### 3. 今後の期待

本研究成果は、神経回路構築のメカニズムに新たな概念を提供します。今後は、成長円錐で非対称的に膜小胞を輸送するモーター系の同定とその制御機構の解明を行い、神経突起の誘引性ガイダンスの分子機構の全容を明らかにしていきます。さらに、誘引性ガイダンスとは異なる駆動機構に依存する反発性ガイダンスの仕組みを研究し、神経突起が様々なガイダンス分子に応答して伸長方向を決定するメカニズムの解明を目指します。神経突起ガイダンスの本質的な仕組みを理解することは、神経回路の修復過程において神経突起を正しい方向へ誘導する技術の開発に貢献します。

（問い合わせ先）

独立行政法人理化学研究所

脳科学総合研究センター 神経成長機構研究チーム  
チームリーダー 上口 裕之  
Tel : 048-467-6137 / Fax : 048-467-9795

脳科学研究推進部 嶋田 庸嗣  
Tel : 048-467-9596 / Fax : 048-462-4914

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

## <補足説明>

### ※1 神経突起

神経細胞から伸びる細長い突起で、電気的情報を遠隔部位に存在する他の神経細胞や筋肉細胞などに伝える。複雑かつ精巧に張り巡らされた神経突起のネットワーク（神経回路）が、脳神経系の働きの中心的役割を担っている。

### ※2 神経突起ガイダンス

神経突起の伸長する方向を制御して、神経突起が正しい標的にたどり着くようにすること。

### ※3 成長円錐

神経系の発生再生過程において、伸長している神経突起の先端部に形成される手の平の形をした領域。

### ※4 ガイダンス分子

神経突起が伸長する道筋付近に提示され、成長円錐の移動方向を制御する分子群。

### ※5 小胞

細胞内膜に囲まれた球状あるいは桿状の構造体。細胞の内部（細胞質）を移動し、小胞に含まれるタンパク質や脂質などの分子を輸送する。

### ※6 形質膜

細胞質の外表面を包み、細胞の表面を構成する膜構造。

### ※7 エキソサイトーシス

細胞質の小胞が形質膜（後述）と融合・一体化することにより、小胞の内容を細胞外へ放出し、小胞の膜成分を形質膜に組み込むこと。

## ※8 細胞質Ca<sup>2+</sup>シグナル

細胞質のCa<sup>2+</sup>濃度の上昇。様々な分子の働きを制御して、細胞機能に影響をおよぼすことができる。

## ※9 VAMP2(vesicle-associated membrane-protein 2)

小胞の膜を貫通するタンパク質で、小胞内腔に突出する領域と細胞質側に存在する領域を有する。小胞と形質膜の融合（エキソサイトーシス）を担う。

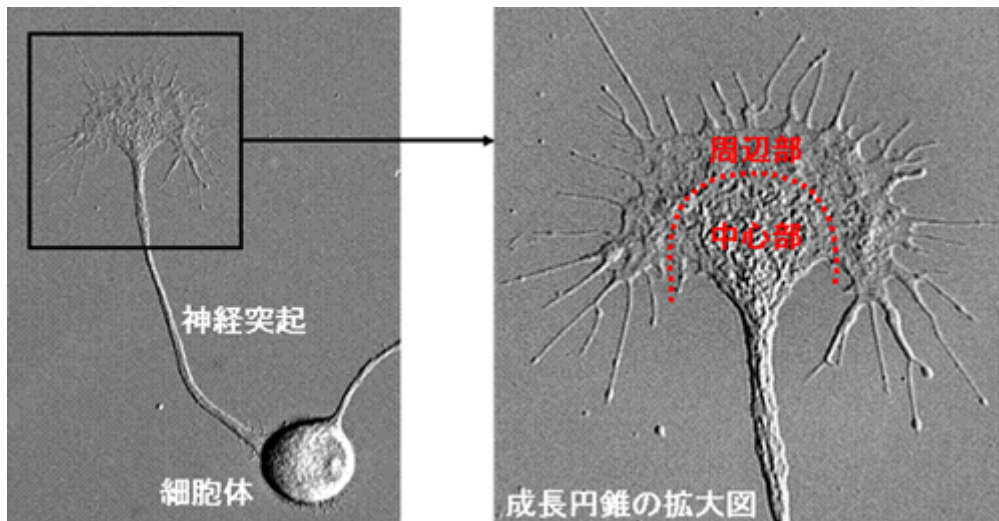


図1 神経突起と成長円錐の形態

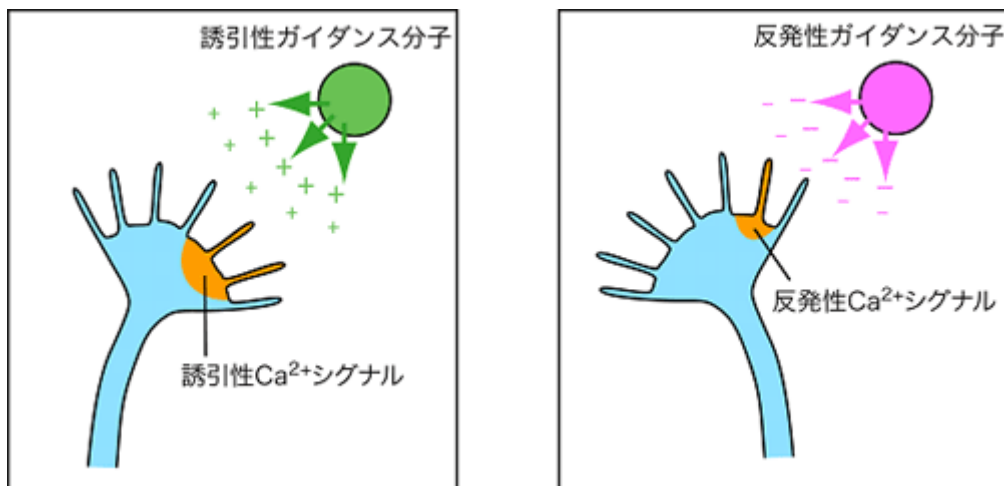


図2 神経突起の誘引性／反発性ガイダンスにおける成長円錐Ca<sup>2+</sup>シグナルの局在

誘引性／反発性ガイダンス分子の濃度勾配に遭遇した成長円錐は、遭遇側にCa<sup>2+</sup>シグナル（橙色）を発生し、誘引／反発方向に旋回する。Ca<sup>2+</sup>シグナルの性質の違い（Ca<sup>2+</sup>を細胞質へ供給するチャンネルの違い）が、成長円錐の旋回方向を決定する。

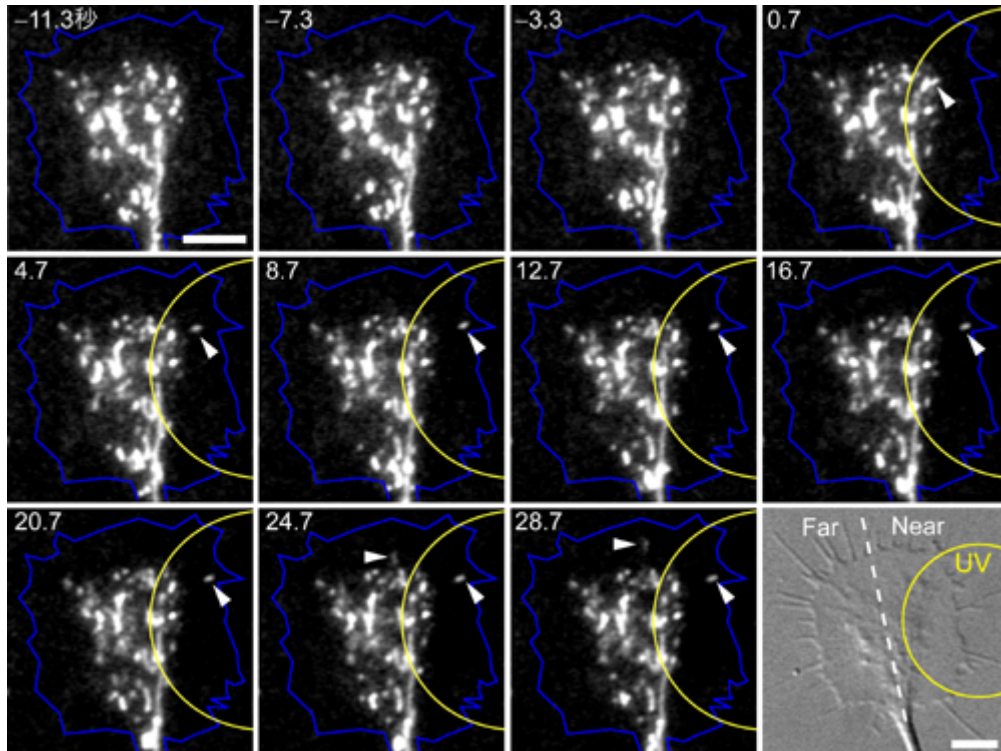


図3 成長円錐片側の誘引性Ca<sup>2+</sup>シグナルによる非対称性膜小胞輸送

青線は成長円錐の輪郭を示す。ゼロ秒の時点から、Ca<sup>2+</sup>シグナルを紫外線（UV）照射により誘発した（黄線はUV照射範囲を示す）。成長円錐の中心部に集積していた膜小胞（白い斑点）は、Ca<sup>2+</sup>シグナル誘発側でのみ成長円錐周辺部に向かって移動した（矢頭）。スケールバーは 5 μm（マイクロメートル）に相当。

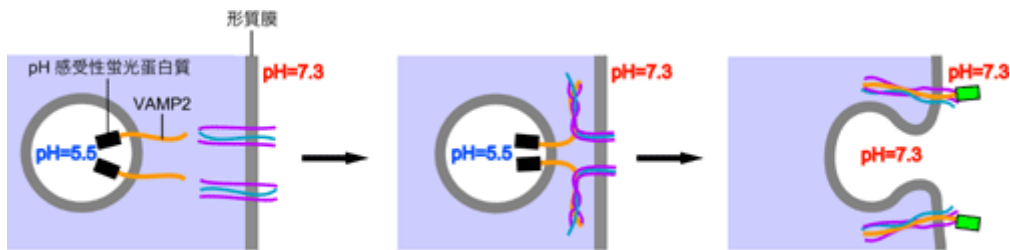


図4 pH感受性蛍光タンパク質を利用した膜小胞エキソサイトーシスの観察

VAMP2の小胞内腔に突出した領域にpH感受性蛍光タンパク質を付加し、小胞内腔のpHをモニターすることにより、小胞と形質膜の融合を間接的に可視化した。エキソサイトーシス前後で、小胞内腔のpH値は、弱酸性（約5.5）から中性（約7.3）に変化し、pH感受性蛍光タンパク質の蛍光強度が増強した（図中では黒から緑に変化）。この蛍光強度の変化を観察することで、生きた細胞での小胞エキソサイトーシスを画像としてとらえることができた。小胞のエキソサイトーシスが阻害された状態では、pH感受性蛍光タンパク質の蛍光強度は変化しなかったことから、本法により小胞エキソサイトーシスを特異的に検出することができた。

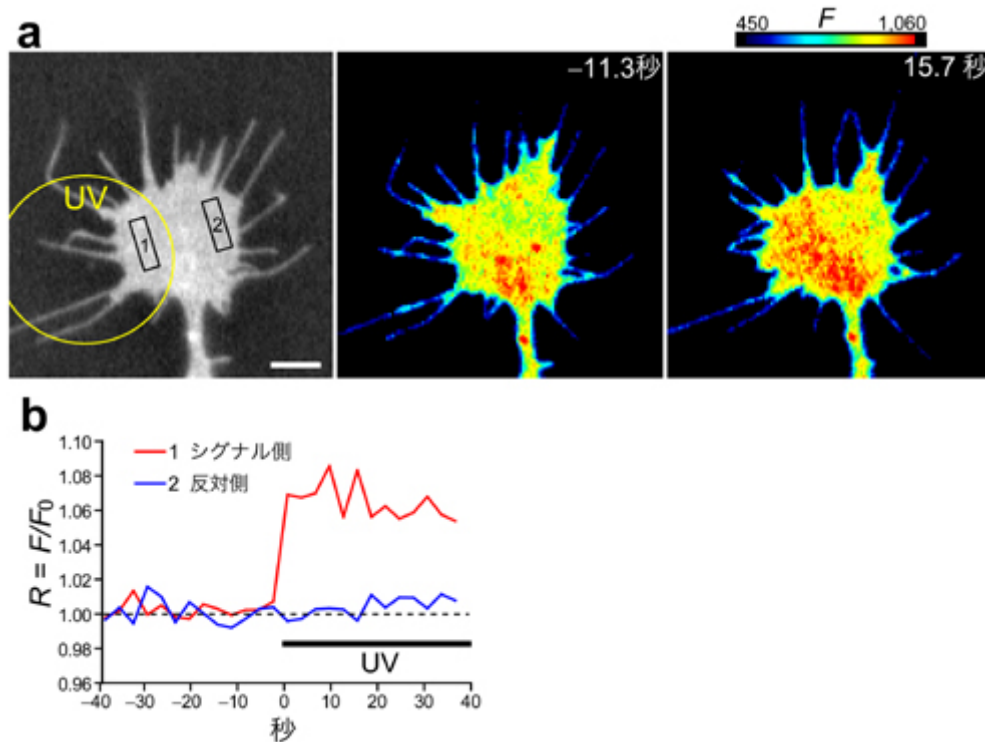


図5 成長円錐片側の誘引性Ca<sup>2+</sup>シグナルによる非対称性膜小胞エキソサイトーシス

- (a) pH感受性蛍光タンパク質を小胞内腔に発現している成長円錐。ゼロ秒の時点から、Ca<sup>2+</sup>シグナルをUV照射により誘発した（黄線はUV照射範囲を示す）。擬似カラーは、pH感受性蛍光タンパク質の蛍光強度を表す（青は弱い蛍光で赤は強い蛍光）。スケールバーは 5 μm に相当。
- (b) (a) の黒線で囲った長方形の領域の平均蛍光強度の変化。Ca<sup>2+</sup>シグナル生成前後での、シグナル側（赤線）と反対側（青線）の蛍光強度の経時変化を示す。Ca<sup>2+</sup>シグナルにより、膜小胞エキソサイトーシスが非対称的に促進された。



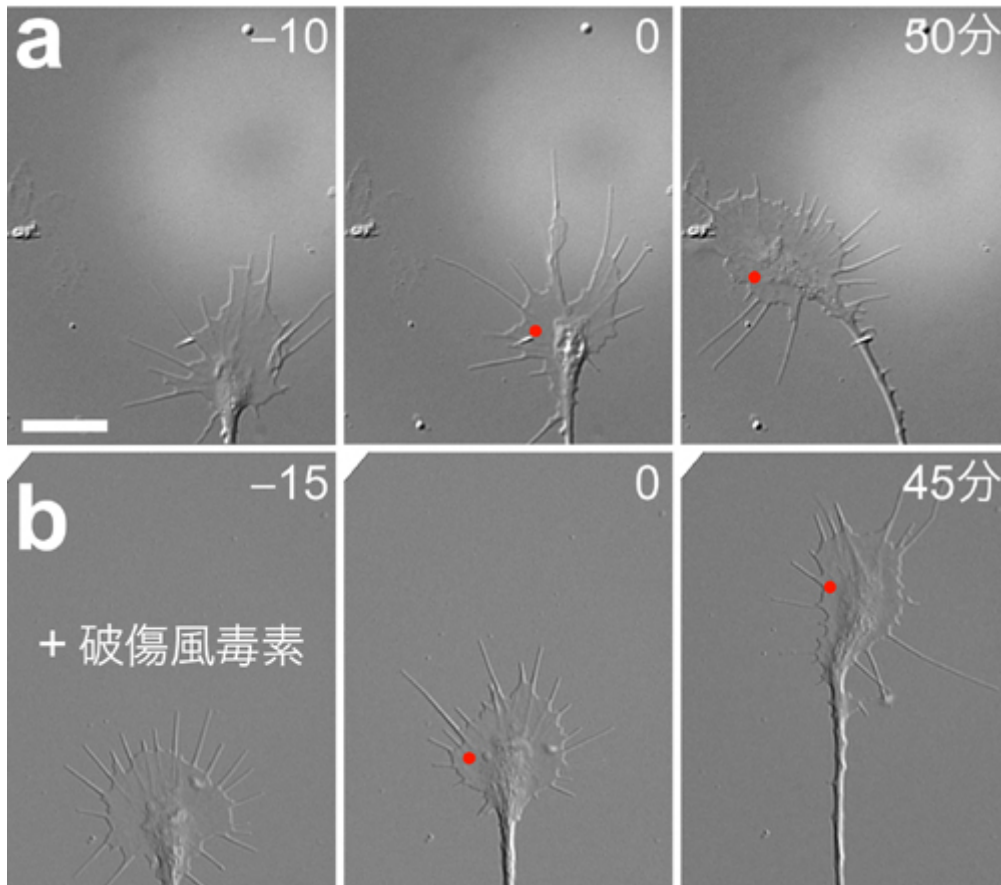


図6 VAMP2 依存性エキソサイトーシスは神経突起の誘引性ガイダンスに必要

ゼロ分の時点から、成長円錐片側（赤点付近）に誘引性 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを誘発した。

(a) 神経突起はシグナル側に旋回した。

(b) 破傷風毒素で前処理した神経突起は $\text{Ca}^{2+}$ シグナルに反応せずに直進した。

スケールバーは  $10\ \mu\text{m}$  に相当。

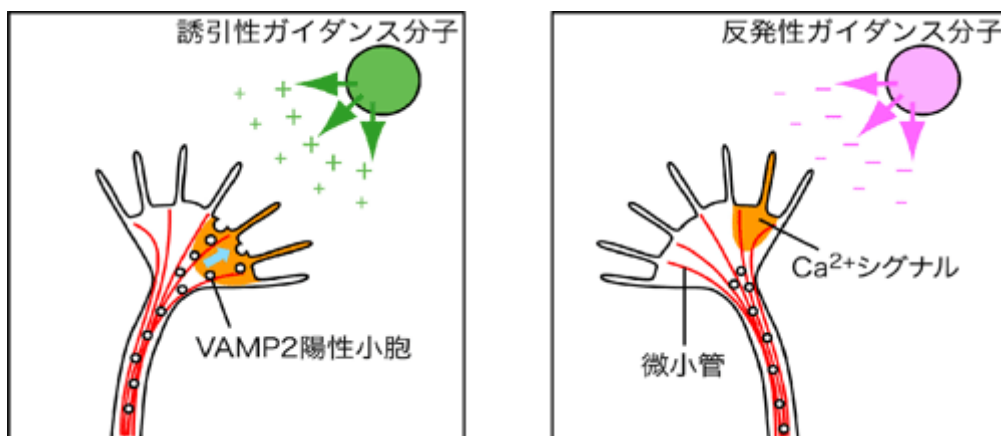


図7 神経突起ガイダンスの仕組み

誘引性ガイダンス分子の濃度勾配に遭遇した成長円錐は、片側で誘引性 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル

(橙色)を発生し、非対称的な膜小胞輸送とエキソサイトーシスにより伸長方向を転換する。膜小胞輸送は微小管(赤線)にガイドされる。一方、反発性ガイダンスには、同様の非対称性膜動態は関与せず、旋回の駆動機構は不明である。