

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04670

研究課題名(和文) 神経細胞移動を制御するカルシウム依存的分子細胞機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of calcium-dependent molecular and cellular mechanisms underlying the regulation of neuronal migration

研究代表者

竹本 さやか(木村さやか)(Takemoto-Kimura, Sayaka)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：70372365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳室周囲にて誕生・運命決定された神経細胞は適切な脳局所へと移動し神経回路を形成する。細胞移動の異常が精神神経疾患の素地となることが提唱され、分子機構の解明が待望されている。本研究では、大脳皮質神経細胞の形づくりの一端(軸索・樹状突起発達)を担う、Ca<sup>2+</sup>依存性蛋白質リン酸化酵素に焦点を当てた研究を推進した。また、活性化に必要なCa<sup>2+</sup>流入にかかわるチャネル候補を見出し、細胞移動制御への寄与を検討した。その結果、これまでの独自知見を発展させ、いつどのようにして、シナプス形成前の神経回路形成が、Ca<sup>2+</sup>依存的経路によって制御されるのか、その一端を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経回路形成の異常が、精神疾患の素地となり得ることが報告され、神経回路形成そのものがどのようにして制御されているのか、その分子メカニズムの解明が待望される。本研究では、初期の神経回路形成過程である、神経細胞移動に着目して、あらたな分子機構の解明を進めた。特に、代表者が専門とする、カルシウム依存的な神経細胞移動制御機構について研究を進め、これまでの研究成果を発展させる新たな知見を見出した。

研究成果の概要(英文)：A newly generated neuronal-committed cell, whose fate is to become a neuron, is located around the ventricle, and it relocates to suitable brain regions for the creation of functional neural circuits. It has been suggested that abnormal cell migration has a relationship with the etiology or is the basis of the neuropsychiatric disorders. To overcome these disorders, the understanding of the molecular mechanism of neuronal migration has been anticipated. In this study, we have focused on Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases, among which the involvement of the axon and dendritic extension of cultured cerebral neurons was disclosed, and have shown their role in neuronal migration regulation. We also have identified its upstream Ca<sup>2+</sup> source channel candidate during neuronal migration. Our findings in this study have extended our prior findings that can explain how and when Ca<sup>2+</sup> signaling regulate brain development before the formation of the synapse.

研究分野：分子神経科学

キーワード：細胞移動 カルシウム カルシウム依存的経路 CaMK

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経回路形成は、様々な細胞内伝達経路により緻密に制御されている。研究代表者は、これまで機能が不明であった、CaMKI ファミリーに属する CaMKI $\alpha$  と CaMKI $\gamma$  が、発生期興奮性 GABA や神経栄養因子 BDNF といった Ca<sup>2+</sup>誘導を起こす細胞外因子に応答した神経細胞形態変化において重要な役割を果たすこと、またその結果神経回路形成を支えることを、大脳皮質初代培養系ならびに生きたマウス脳内での検討により解き明かしてきた( )。本経路は、樹状突起や軸索伸展に加え、スパイン形成においても機能を有することが他グループにより報告されており( )。神経細胞の発生・発達過程における様々な局面で、活動依存的回路修飾に寄与する重要な Ca<sup>2+</sup>エフェクター候補として注目されている。そこで、本研究では、CaMKI に焦点を当てて特に細胞移動との関係を明らかとすることを旨として研究を推進した。

### 2. 研究の目的

脳室周囲にて誕生・運命決定された神経細胞は適切な脳局所へと移動し神経回路を形成する。近年、細胞移動の異常が精神神経疾患の素地となることが提唱され、細胞移動を制御する分子機構の解明が待望されている。研究代表者は、大脳皮質神経細胞の形づくりの一端(軸索・樹状突起発達)を、Ca<sup>2+</sup>依存性蛋白質リン酸化酵素、CaMKI が担うことを発見し、本経路の *in vivo* 回路形成における役割について検討を進めている。そこで、本研究では、これらの「シナプス形成・回路形成に先立つ脳発生期の Ca<sup>2+</sup>シグナリングを担う主要エフェクター分子が CaMKI である。」という独自知見を発展させ、移動中神経細胞における役割に焦点を当て、Ca<sup>2+</sup>-CaMKI 経路を介した神経細胞移動制御機構を解明することを旨とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、シナプス形成・回路形成に先立つ脳発生期の Ca<sup>2+</sup>シグナリングにおいて、主要なエフェクター分子として機能する可能性を有する CaMKI 経路に着目した。また、CaMKI の活性化には Ca<sup>2+</sup>の上昇が必要不可欠であり、移動中の幼弱神経細胞における Ca<sup>2+</sup>変動の分子機構についても研究を推進した。具体的には、移動中神経細胞を対象としたスライスイメージング、ノックダウンによる Ca<sup>2+</sup>-CaMKI 経路を介した神経回路形成プロセスの同定、遺伝子改変動物を用いた検討など、様々な方法を用いることで、カルシウム依存的神経細胞移動制御の新規分子機構の解明を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 移動中幼弱神経細胞におけるカルシウム変動の計測と分子基盤

子宮内電気穿孔法により、イメージング用のプローブを移動中神経細胞に導入し、胎生マウスより脳スライスを作製し、脳スライスを用いた蛍光イメージングを実施し、カルシウム変動、細胞体、核を同時にイメージングする手法の確立を進めた。大脳皮質 2/3 層の錐体細胞は、脳室帯から中間体を移動し、皮質板へと移動するが、一連の過程におけるスライスイメージングが可能な方法を確立した。この方法を用い、長時間のライブイメージングを実施し、カルシウム変動と細胞形態変化との関連性を検討したところ、両者の関連を見出した。また、大脳皮質 2/3 層錐体細胞においては、移動中のカルシウム変動が、中間体においても認められることを見出し、このカルシウム変動において寄与するカルシウムチャンネルの検討を進め、電位依存性カルシウムチャンネルの寄与を明らかとした (Horigane et al.改訂中)。

## (2) Ca<sup>2+</sup> CaMKI 経路を介した神経回路形成プロセスの同定

子宮内電気穿孔法により大脳皮質 2/3 層錐体細胞においてノックダウンを実施したところ、CaMKI ファミリーのいくつかの遺伝子のノックダウンで、神経細胞移動が遅延することを見出した。また、この際にライブイメージングを実施し、ノックダウンにより大脳皮質版における細胞移動速度の減少を見出した。更に組織学的な検討により、移動障害を示す細胞の形態変化について定量を行い、特徴的な変化を見出した。また、胎生期大脳皮質に CaMKI が発現することを免疫染色により明らかとした。

## (3) 遺伝子改変動物を用いた検討

独自に作製したコンディショナルノックアウト系統に、子宮内電気穿孔法により cre リコンビナーゼ発現プラスミドを導入し、将来大脳皮質 2/3 層錐体細胞となる、幼弱な神経細胞において目的の遺伝子を欠失させた際の細胞移動変化と形態変化を検討した。その結果、Ca<sup>2+</sup> CaMKI 経路を構成する複数の遺伝子群で細胞移動の遅延が認められ、これらの遺伝子の必要性を明らかとした。(1)-(3)の結果より、Ca<sup>2+</sup> CaMKI 経路を介した新たな細胞移動制御機構の解明を行い、学会などで発表するとともに、現在投稿準備を進めている (Horigane et al. 準備中)

## (4) CaMKI の上流に位置する Ca<sup>2+</sup>チャネルの探索

CaMKI の上流に位置する Ca<sup>2+</sup>チャネルの探索を進め、電位依存性カルシウムチャネルが寄与する可能性を見出した。培養神経細胞においても、培養初期から自発的な Ca<sup>2+</sup>上昇が存在し、L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルを介して発生することを明らかとした。更に、本チャネルの点変異で発症する Timothy 症候群患者におけるチャネル機能獲得型点変異により、自発的な Ca<sup>2+</sup>上昇に異常が発生し、神経突起短縮や神経細胞の放射状移動に異常が発生することを見出した (Kamijo et al. 2018)。

## <引用文献>

Takemoto-Kimura S et al. Regulation of dendritogenesis via a lipid-raft-associated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKIgamma. *Neuron*. 2007;54(5):755-770.

Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S et al. Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J Neurosci*. 2009;29(43):13720-13729.

Saneyoshi T et al. Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/betaPIX signaling complex. *Neuron*. 2008;57(1):94-107.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Inoue M, Takeuchi A, Manita S, Horigane SI, Sakamoto M, Kawakami R, Yamaguchi K, Otomo K, Yokoyama H, Kim R, Yokoyama T, Takemoto-Kimura S, Abe M, Okamura M, Kondo Y, Quirin S, Ramakrishnan C, Imamura T, Sakimura K, Nemoto T, Kano M, Fujii H, Deisseroth K, Kitamura K, Bito H	4. 巻 177
2. 論文標題 Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for In Vivo Imaging of Complex Brain Circuit Dynamics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1346 ~ 1360.e24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2019.04.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horigane SI, Ozawa Y, Yamada H, Takemoto-Kimura S	4. 巻 165
2. 論文標題 Calcium signalling: a key regulator of neuronal migration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 401 ~ 409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kamijo S, Ishii Y, Horigane S, Suzuki K, Ohkura M, Nakai J, Fujii H, Takemoto-Kimura S, Bito H	4. 巻 38
2. 論文標題 A Critical Neurodevelopmental Role for L-Type Voltage-Gated Calcium Channels in Neurite Extension and Radial Migration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 5551 ~ 5566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2357-17.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishiguchi KM, Fujita K, Tokashiki N, Komamura H, Takemoto-Kimura S, Okuno H, Bito H, Nakazawa T	4. 巻 26
2. 論文標題 Retained Plasticity and Substantial Recovery of Rod-Mediated Visual Acuity at the Visual Cortex in Blind Adult Mice with Retinal Dystrophy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 2397 ~ 2406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2018.07.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Horigane S, Kamijo S, Inoue M, Sakamoto M, Fujii H, Bito H	4. 巻 141
2. 論文標題 Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Neurochem	6. 最初と最後の頁 808 ~ 818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takemoto-Kimura S and Horigane S	4. 巻 37
2. 論文標題 Exploring the function of calcium-dependent phosphorylation in neuronal morphogenesis and circuit formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Jpn. J. Neuropsychopharmacol	6. 最初と最後の頁 163 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計27件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Horigane S, Takemoto-Kimura S, Kamijo S, Adachi-Morishima A, Fujii H, Bito H
2. 発表標題 Calcium transients control a morphogenetic cycle underlying neuronal migratory movement
3. 学会等名 SFN 2019(USA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Horigane S, Takemoto-Kimura S, Kamijo S, Adachi-Morishima A, Fujii H, Bito H
2. 発表標題 Deciphering a calcium-regulated pathway that controls radial migration of cortical neurons via the excitation-coupled morphological change
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会(新潟)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takemoto-Kimura S
2. 発表標題 Exploring molecular pathways involved in central amygdala-dependent control of emotional behaviors
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congressシンポジウム(兵庫)(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takemoto-Kimura S, Ueda S, Bito H
2. 発表標題 Calcium-dependent phosphorylation signaling in emotional and social amygdala circuits
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会シンポジウム(兵庫)(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Horigane S, Takemoto-Kimura S, Adachi-Morishima A, Kamijo S, Fujii H, Bito H
2. 発表標題 Deciphering a calcium-regulated pathway that controls radial migration of immature cortical neurons
3. 学会等名 第61回日本神経化学会大会シンポジウム(兵庫)(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Horigane S, Takemoto-Kimura S, Kamijo S, Adachi-Morishima A, Fujii H, Bito H
2. 発表標題 Deciphering a calcium-regulated pathway that controls radial migration via excitation-morphogenesis coupling
3. 学会等名 SFN 2018(USA)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Horigane S, Takemoto-Kimura S, Adachi-Morishima A, Kamijo S, Fujii H, Bito H
2. 発表標題 Deciphering Ca <sup>2+</sup> signaling during radial migration of immature cortical neurons
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会(兵庫)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹本さやか
2. 発表標題 カルシウム依存性リン酸化経路を介した神経回路形成機構の探索
3. 学会等名 第63回脳の医学・生物学研究会(名古屋)(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Horigane S, Takemoto-Kimura S, Adachi-Morishima A, Kamijyo S, Fujii H, Bito H
2. 発表標題 Deciphering Ca <sup>2+</sup> signaling during radial migration of immature cortical neurons
3. 学会等名 The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society(千葉)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹本さやか, 堀金慎一郎, 鈴木敢三, 上條諭志, 藤井哉, 尾藤晴彦
2. 発表標題 大脳皮質回路形成におけるカルシウム依存的制御機構の探索
3. 学会等名 第64回中部日本生理学会(山梨)(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹本 さやか, 堀金, 慎一郎, 鈴木 敢三, 上條 諭志, 藤井 哉, 尾藤 晴彦
2. 発表標題 カルシウム依存性蛋白質リン酸化経路を介した神経回路形成機構の探索
3. 学会等名 ConBio2017シンポジウム(神戸) (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----