

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K07827

研究課題名(和文) 神経細胞特異的なロコモーション移動におけるSrcファミリーキナーゼの役割

研究課題名(英文) Role of Src family kinases in neuron-specific locomotion migration

研究代表者

西村 嘉晃 (Nishimura, Yoshiaki)

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：50508603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Srcファミリーキナーゼはその重要性が広く認識されて多くの研究がなされているにも関わらず、それらは様々な種類の細胞や時期によるものであるため、ロコモーション様式の移動におけるFynやSrcの上流・下流経路は不明であり、解明が待たれていた。そこで大脳皮質のスライス培養法や細胞内小器官の動態解析などを用いて、これまで謎に包まれていたSrcファミリーキナーゼがロコモーション様式の移動をどのように制御しているかを解析し、脳形成における役割を明らかにすることを目的として、Srcファミリーキナーゼの上流経路の解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Srcファミリーキナーゼは、がん研究などの分野においては解析が進んでいるが、実際に生体内を移動する神経細胞においてその制御機構を詳細に解析した例はなく、また、これまでの神経細胞移動の研究は遺伝学的もしくは解剖学的な解析に偏りがちであったが、本研究ではイメージング技術と分子細胞生物学的な解析を中心的に行ったため、これらの解析を通して大脳皮質形成における「個々の神経細胞の動態」、およびその異常によって起こる胎生期、周産期に起こる脳疾患を分子レベルで解析した点において意義がある。

研究成果の概要(英文)：Although the importance of Src family kinases has been widely recognized and much research has been conducted, the upstream and downstream pathways of Fyn and Src in locomotion mode of migration are unknown and waiting to be elucidated because these experiments were conducted on various types of cells and stages. Therefore, using the slice culture method of the cerebral cortex and the dynamic analysis of intracellular organelles, we analyzed how Src family kinases control locomotion mode of migration and proceeded to analyze the upstream pathway of Src family kinases with the aim of clarifying their role in cortical formation.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経細胞移動 ロコモーション 形態変化

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質形成過程において、脳室帯を出た神経細胞はまず多極性細胞になり、その後極性を獲得して一本の先導突起を持つロコモーション細胞となって脳表層までの長い距離を移動し、整然とした層構造を形成する(図1)。層構造形成の異常により滑脳症などの精神遅滞を伴う脳疾患が引き起こされることが知られていることから、この神経細胞移動は脳が高次機能を発揮するための必須段階であると考えられる。

多極性細胞の形態形成や先導突起形成などを含む初期段階の移動(図1)を制御する分子経路は遺伝子改変動物やマウス胎仔脳に外来遺伝子を導入できる子宮内エレクトロポレーション法を用いるなどして比較的容易に解析できるため多数の報告がある。しかし、移動の最も長い距離を占めており正常に機能する脳の形成に重要なロコモーション様式の移動(図1)に関しては、多極性などの初期段階の移動を経た後に行われるため、従来の実験手法では二次的な影響を排して直接特定の分子の機能を抑制する実験が困難であった。

そこで、研究代表者は大脳皮質のスライス培養法とタイムラプス観察法を組み合わせた阻害剤スクリーニングの実験系を確立(図2)し、SrcファミリーキナーゼやCdk5などの重要性を明らかにした(1)。また、Cdk5については移動神経細胞に特異的な構造体であるdilation(先導突起根元の膨らみ)の形成と核の形態変化に関わることを報告した(2)。さらに、Srcファミリーキナーゼのうち脳で発現が高いFynのノックダウンにより、ロコモーション移動が阻害されることが分かった。一方、貝淵らにより、同じSrcファミリーキナーゼのLynが神経極性の形成に関与することが報告され、同じSrcファミリーキナーゼでも機能的な差異があることが示唆された。また、プロトオンコジンのSrcやFynは、非神経細胞においてはインテグリンの裏打ちタンパク質をリン酸化することにより細胞移動や細胞骨格の再編成に関与することが知られているが、インテグリンのノックダウンは移動の最終段階のみが異常となり、Fynのノックダウンとは表現型が異なる。

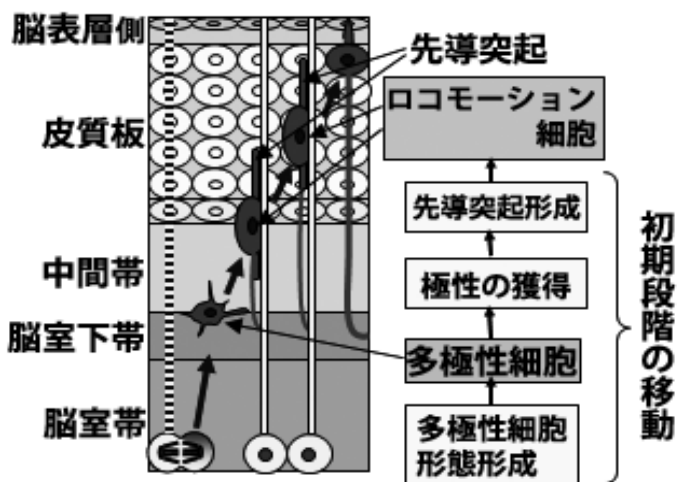


図1 大脳皮質形成の概略

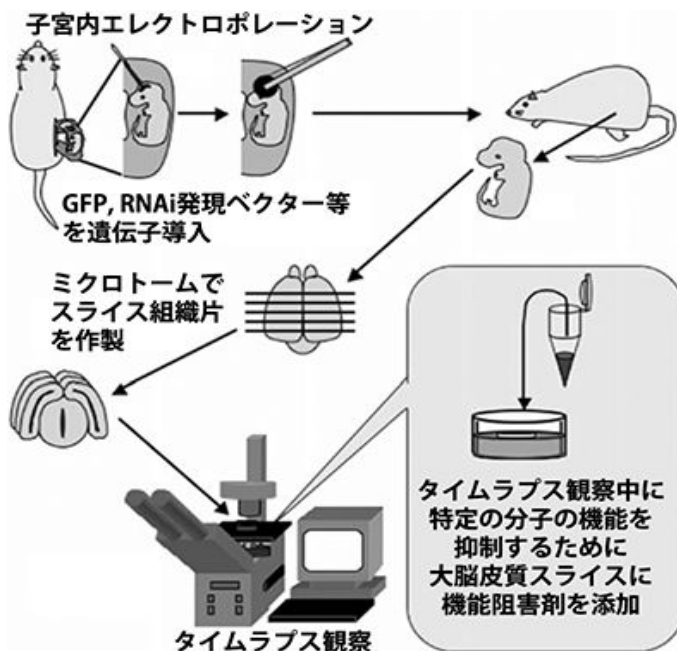


図2 大脳皮質スライス培養法を用いた機能解析

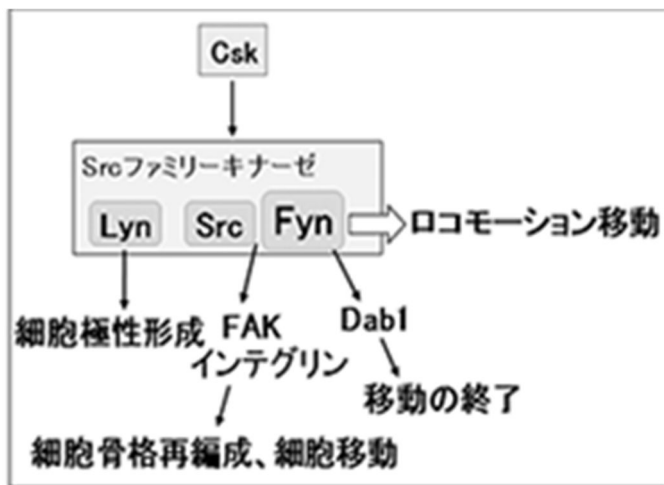


図3 Srcファミリーキナーゼ周辺の現状

また、Fyn は神経細胞移動で重要な役割を担っている Reelin シグナルの Dab1 をリン酸化することが知られているが、Dab1 のノックダウンも移動の最終段階のみが異常となり、神経細胞移動の大部分は正常である (図 3)。

このように、Src ファミリーキナーゼはその重要性が広く認識されて多くの研究がなされているにも関わらず、それらは様々な種類の細胞や時期によるものであるため、ロコモーション様式の移動における Fyn や Src の上流・下流経路は不明であり、解明が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究では大脳皮質のスライス培養法や細胞内小器官の動態解析、生化学的手法などを用いて、これまで謎に包まれていた Src ファミリーキナーゼがロコモーション様式の移動をどのように制御しているかを、その上流・下流の経路まで解析して、脳形成における役割を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) ロコモーション細胞の可視化: マウス胎仔脳に簡便に外来遺伝子を導入することができる「子宮内エレクトロポレーション法」(図 2)を用いて、移動神経細胞の細胞形態を EGFP や核移行シグナル付 DsRed で可視化すると同時に、RNAi を共導入することにより、Src ファミリーやその周辺の分子の働きを解析した。

(2) ロコモーション細胞の経時的観察: 大脳皮質のスライスをタイムラプス顕微鏡下で培養し、その培養液中に様々な分子に対する機能阻害剤を添加することにより特定の分子の機能を抑制する実験を行った (図 2)。さらに一つ一つのロコモーション細胞をより詳細な時間間隔で観察することにより、ロコモーション細胞の時間依存的な形態変化を制御する分子機構を解析した。

(3) Csk が神経前駆細胞の分裂や神経分化に影響を与えるかどうかを調べるために、子宮内エレクトロポレーション法により Csk をノックダウンした大脳皮質の固定切片を分裂および神経分化のマーカーで免疫染色した。

4. 研究成果

(1) 一般的な Src の上流分子として知られる Csk の RNAi ベクターを EGFP と共に導入した大脳皮質の固定切片をつくり検討したところ、EGFP 陽性細胞の分布に異常がみられた。そこで、大脳皮質のスライスをタイムラプス観察し、個々の移動神経細胞の形態変化の様子を詳細に解析したところ、Csk のノックダウンにより移動神経細胞の先端突起の根元に特徴的に観られる dilation という膨らみに異常は生じなかったが、ロコモーション細胞の核の形態に異常が見られ、移動速度もコントロールよりわずかに低下していることが分かった。また、Csk のノックダウンによる神経前駆細胞の分裂や神経分化には影響を与えないことが分かった。

(2) 大脳皮質のスライスをタイムラプス顕微鏡下で培養し、その培養液中に Src ファミリーキナーゼに対する機能阻害剤を添加したところ、(1)における Csk のノックダウンの時に観られたのと同様に、ロコモーション細胞の核の形態や移動速度に異常が生じた。

(3) Src ファミリー Fyn の恒常活性型を EGFP と共に導入した大脳皮質の固定切片をつくったところ、EGFP 陽性細胞の分布に異常がみられた。そこで、大脳皮質のスライスをタイムラプス観察し、個々の移動神経細胞の形態変化の様子を詳細に解析したところ、Fyn の恒常活性型により、ロコモーション細胞の移動速度のみならず、dilation という膨らみにも異常がみられた。

< 引用文献 >

(1) Yoshiaki V. Nishimura, Katsutoshi Sekine, Kaori Chihama, Kazunori Nakajima, Mikio Hoshino, Yo-ichi Nabeshima, and Takeshi Kawauchi. Dissecting the Factors Involved in the Locomotion Mode of Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex. *J Biol Chem.* 285(8), pp.5878-87, 2010

(2) Yoshiaki V. Nishimura, Mima Shikanai, Mikio Hoshino, Toshio Ohshima, Yo-ichi Nabeshima, Ken-ichi Mizutani, Koh-ichi Nagata, Kazunori Nakajima, Takeshi Kawauchi. Cdk5 and its substrates, DCX and p27kip1, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons. *Development.* 141(18), pp.3540-50, 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Andhika Rhaditya Putu Adi, Oishi Koji, Nishimura Yoshiaki V., Motoyama Jun	4. 巻 489
2. 論文標題 [Ca2+] fluctuation mediated by T-type Ca2+ channel is required for the differentiation of cortical neural progenitor cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 84 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2022.05.021	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 Shikanai Mima, Ito Shiho, Nishimura Yoshiaki V, Akagawa Remi, Fukuda Mitsunori, Yuzaki Michisuke, Nabeshima Yo ichi, Kawauchi Takeshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Rab21 regulates caveolin 1 mediated endocytic trafficking to promote immature neurite pruning	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e54701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202254701	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 西村嘉晃、川内健史	4. 巻 153
2. 論文標題 薬理的アプローチによる大脳皮質形成における神経細胞移動の分子機構の解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 167-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.153.167	査読の有無 有
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0件

〔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
研究分担者	川内 健史 (Kawauchi Takeshi) (60397544)	公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・研究員 (上席・主任研究員クラス) (84503)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------