

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：23903
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22500312
 研究課題名（和文） 小脳プルキンエ細胞が複雑かつ秩序立った形態の樹状突起を形成する分子機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanisms of formation of complex and organized dendrites by cerebellar Purkinje cells
 研究代表者
 田中 正彦（TANAKA MASAHIKO）
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授
 研究者番号：60267953

研究成果の概要（和文）：小脳プルキンエ細胞が複雑かつ秩序立った形態の樹状突起を形成する分子機構を明らかにするために、培養プルキンエ細胞に対して様々な遺伝子の siRNA を単一細胞エレクトロポレーションを用いて導入し、樹状突起形成への影響を調べた。リアノジン受容体、CaM kinase、myosin Va が、それぞれ独自の働き方で樹状突起形成に関与することを発見した。また、単一細胞エレクトロポレーションを用いた遺伝子強制発現系や、小脳切片と分散プルキンエ細胞との共培養実験系を確立した。

研究成果の概要（英文）：To investigate molecular mechanisms of formation of complex and organized dendrites by cerebellar Purkinje cells, we introduced siRNAs of various genes into cultured Purkinje cells using single-cell electroporation. We found that ryanodine receptor, CaM kinases and myosin Va are involved in dendrite formation of Purkinje cells in their own manners. In addition, we established the forced gene expression system using single-cell electroporation and the coculture system of a cerebellar slice and dissociated Purkinje cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子神経生物学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：プルキンエ細胞、樹状突起、小脳、siRNA、単一細胞エレクトロポレーション、細胞培養、切片培養、形態形成

1. 研究開始当初の背景

小脳のプルキンエ細胞は、脳内で最も複雑な形態の樹状突起を形成する。その形態は、単に複雑であるだけでなく、非常に秩序立った構造に形成される。すなわち、一次樹状突起を特定の方向に伸ばし、それが著しく分岐し、そのような樹状突起が特定の平面に広が

るという形態をとる。また、最終的にこのような形態の樹状突起が形成される過程では、一時的に過剰に形成された樹状突起のうちで、一部の樹状突起の退縮が起こることも知られている（e.g., Tanaka et al., J. Neurosci., 2003; Neuroscience, 2006）。

プルキンエ細胞樹状突起の形成メカニズム

ムについては、これまでに様々な研究が行われてきている。特に、顆粒細胞との細胞間相互作用が重要であり、顆粒細胞から分泌されるグルタミン酸などの因子によって、複雑な形態の樹状突起が形成されることが明らかにされている。グルタミン酸以外にも、神経栄養因子、ホルモン、蛋白質リン酸化酵素、オーファン受容体、転写調節因子、微小管重合調節因子などの様々な分子が、プルキンエ細胞の樹状突起形成を促進または抑制することが示されている (Tanaka, Neurochem. Res., 2009)。

しかし、プルキンエ細胞の樹状突起形成の特徴である、複雑かつ秩序立った形態形成については、これまでの研究成果だけでは十分に説明することができない。その大きな原因は、関与する分子が多数あり、それらの機能に重複があるため、単一の分子を解析するだけでは不十分であるためと考えられる。そうしたことも一因となって、ノックアウトマウスにおいては、補償機構が働いて遺伝子欠損の効果が現れにくいという問題が生じてしまうことが多い。また、培養系を用いた *in vitro* の実験では、多くの場合に *in vivo* のプルキンエ細胞樹状突起の形態的特徴を十分に解析することができないという問題もあった。そのため、このような障壁を克服して、プルキンエ細胞樹状突起の複雑かつ秩序立った形態形成のメカニズムを十分に解明することが求められていた。

2. 研究の目的

上記のようなこれまでの研究の障壁を克服して、プルキンエ細胞樹状突起の複雑かつ秩序立った形態形成の分子機構の理解を進めるために、小脳培養系における単一細胞エレクトロポレーションを用いた siRNA 導入 (Tanaka et al., J. Neurosci. Meth., 2009 ; 田中, バイオイメーキング, 2010 ; Tanaka, Neuromethods, 2012) という手法を中心にした研究を行うことを計画した。この手法を用いれば、複数の siRNA を同一の狙った細胞に導入するという実験を、簡便かつ低価格で実現することができる。プルキンエ細胞の発達過程で標的遺伝子の発現を急に抑制するため、ノックアウトマウスの場合のように個体発生の長い時間の中で補償機構が働いてしまうということも起こりにくい。この手法で導入した siRNA の効果が十分に長時間 (少なくとも 2 週間) 持続することも確認している (Tanaka et al., Neurochem. Res., 2011)。また、遺伝子や siRNA が非常に導入されづらいプルキンエ細胞に対して簡単に siRNA を導入できることも大きな長所である。この手法を用いてプルキンエ細胞に対して様々な遺伝子の siRNA を導入し、樹状突

起形成への影響を調べた。

さらに発展させた手法として、*in vivo* の小脳の構造が維持された切片培養系における siRNA 導入や、単一細胞エレクトロポレーションを用いた外来遺伝子の強制発現を実現させることを目指した。また、プルキンエ細胞樹状突起の伸長方向や選択・淘汰に関わる分子機構を解析するために、小脳切片と分散プルキンエ細胞との共培養実験系を確立して応用することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 小脳細胞培養系または切片培養系における単一細胞エレクトロポレーションを用いた siRNA 導入

小脳細胞培養系 (Tanaka et al., Neuroscience, 2006) または切片培養系 (Tanaka et al., Brain Res., 1994 ; 田中, 神経化学, 2001) 中のプルキンエ細胞に対して、樹状突起形成に関与すると予想される遺伝子の siRNA を単一細胞エレクトロポレーション (Tanaka et al., J. Neurosci. Meth., 2009 ; 田中, バイオイメーキング, 2010 ; Tanaka, Neuromethods, 2012) を用いて導入した。siRNA と蛍光色素を入れたガラス微小電極を、パッチクランプの要領で狙った細胞に当てて加電し、siRNA と蛍光色素を細胞内に導入する。単一遺伝子の発現抑制だけでなく、関連して働くことが予想される複数の遺伝子を同時に発現抑制する実験も行った。数日から 10 日間程度培養した後に、固定、染色し、プルキンエ細胞樹状突起の形態を調べた。

(2) 小脳細胞培養系における単一細胞エレクトロポレーションを用いた発現プラスミド導入

小脳細胞培養系中のプルキンエ細胞に対して、単一細胞エレクトロポレーションを用いて GFP 遺伝子の発現プラスミドを導入し、GFP の発現を調べた。電極作成に用いるガラス管の内径、プラスミドの濃度や形状、印加電圧を変化させて、遺伝子強制発現に最適な実験条件を検討した。

(3) 小脳切片と分散プルキンエ細胞との共培養実験系

野生型マウス由来の小脳切片の上から、GAD67-GFP マウス (Tamamaki et al., J. Comp. Neurol., 2003) 由来の分散プルキンエ細胞をかけて培養し、GFP 陽性プルキンエ細胞の生着や樹状突起について調べた。分散プルキンエ細胞の濃度や、培養に用いる培地について検討し、最適な方法を確立した。

4. 研究成果

(1) 小脳細胞培養系中のプルキンエ細胞に対して、樹状突起形成に関与すると予想される様々な遺伝子（細胞内カルシウム放出チャンネル、シグナル伝達分子のアダプター蛋白質、蛋白質リン酸化酵素、蛋白質脱リン酸化酵素調節因子、輸送蛋白質、開口放出調節因子、細胞骨格蛋白質）の siRNA を単一細胞エレクトロポレーションを用いて導入し、樹状突起形成への影響を調べた。その結果、以下のような遺伝子が樹状突起形成に関与することが明らかになった。

① 細胞骨格蛋白質である β -actin の発現抑制によって樹状突起の伸長や分枝が抑制されることを確認した。

② 細胞内カルシウム放出チャンネルであるリアノジン受容体 1 型の発現抑制によって樹状突起の分枝が抑制された。

③ 蛋白質リン酸化酵素である CaM kinase II α , II β , IV について、それぞれ単一遺伝子の発現抑制では影響が見られなかったが、3 遺伝子の同時発現抑制によって樹状突起の分枝が抑制された。これら 3 種類の CaM kinase が樹状突起形成において共通の役割を果たしていることが示唆された。

④ 輸送蛋白質 myosin Va の発現抑制によって、樹状突起の形態には影響が見られなかったが、IP₃ 受容体がスパインに分布しなくなるといった異常が見られた (Miyata et al., J. Neurosci., 2011)。

(2) 小脳においてリアノジン受容体は、プルキンエ細胞で主として 1 型が、顆粒細胞で 2 型が発現している。小脳細胞培養系において顆粒細胞に発現するリアノジン受容体 2 型を発現抑制することによっても、プルキンエ細胞樹状突起の分枝が抑制された。これによって、プルキンエ細胞だけでなく顆粒細胞で発現しているリアノジン受容体にも樹状突起形成を促進する効果があることが明らかになった。顆粒細胞においてリアノジン受容体 2 型依存的に放出されてプルキンエ細胞の樹状突起形成を促進する分子として、BDNF を同定した。

(3) 小脳切片培養系中のプルキンエ細胞に対する単一細胞エレクトロポレーションを用いた siRNA 導入を試みたが、導入成功例が非常に少なく、遺伝子発現抑制効果を確認するには至らなかった。

(4) 小脳細胞培養系中のプルキンエ細胞に対する単一細胞エレクトロポレーションを用いた発現プラスミド導入条件の最適化を行い、この方法による外来遺伝子 (GFP) の強制発現に成功した。今後、この実験系も樹状突起形成の分子機構解析に利用できるこ

とが期待される。

(5) プルキンエ細胞樹状突起の伸長方向や選択・淘汰の分子機構解析のための小脳切片と分散プルキンエ細胞との共培養実験系を確立した。この実験系を用いて、プルキンエ細胞の一次樹状突起が小脳皮質の層構造に対して垂直方向に伸長する傾向があることを見出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 西村陽子、田所哲、田中正彦、平嶋尚英、Detection of asymmetric distribution of phospholipids by fluorescence resonance energy transfer, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有、420 巻、2012、926-930
- ② 田中正彦、朝岡みなみ、柳川右千夫、平嶋尚英、Long-term gene-silencing effects of siRNA introduced by single-cell electroporation into postmitotic CNS neurons, Neurochemical Research, 査読有、36 巻、2011、1482-1489
- ③ 宮田麻理子、岸本泰司、田中正彦、橋本浩一、平嶋尚英、村田善晴、狩野正伸、高岸芳子、A role for myosin Va in cerebellar plasticity and motor learning: a possible mechanism underlying neurological disorder in myosin Va disease, Journal of Neuroscience, 査読有、31 巻、2011、6067-6078
- ④ 田中正彦、培養神経細胞における GFP イメージングを用いた単一細胞レベルでの RNA 干渉効果の解析、バイオイメージング、査読無、19 巻、2010、9-13

[学会発表] (計 16 件)

- ① 田中正彦、単一細胞エレクトロポレーションを用いた初代培養神経細胞における遺伝子強制発現系の開発、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、横浜
- ② 平嶋尚英、マスト細胞のエクソサイトーシスにおける微小管依存性の分泌顆粒輸送機構、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、横浜
- ③ 田中正彦、小脳プルキンエ細胞の樹状突起形成への Ca²⁺/カルモジュリン依存性蛋白質リン酸化酵素の関与、MBSJ2012 (第 35 回日本分子生物学会年会)、2012 年 12 月 12 日、福岡
- ④ 亀川沙知、メラノサイトからケラチノサイトへのメラニン移行における SNARE 蛋白質の関与、MBSJ2012 (第 35 回日本分子生物学会年会)、2012 年 12 月 12 日、

- 福岡
- ⑤ 田中正彦、Dendrite formation of cerebellar Purkinje cells is promoted by ryanodine receptors expressed by Purkinje and granule cells、Neuroscience 2012 (42nd Annual Meeting of Society for Neuroscience)、2012年10月14日、New Orleans, LA, USA
- ⑥ 田中正彦、小脳プルキンエ細胞の樹状突起形成はプルキンエ細胞だけでなく顆粒細胞が発現するリアノジン受容体によっても促進される、Neuroscience2012 (第35回日本神経科学大会)、2012年9月21日、名古屋
- ⑦ 堀江侑季、小脳プルキンエ細胞の樹状突起形成に関するカルシウムシグナリング分子の探索、Neuroscience2012 (第35回日本神経科学大会)、2012年9月21日、名古屋
- ⑧ 田中正彦、小脳プルキンエ細胞の樹状突起形成におけるリアノジン受容体の機能解析、日本薬学会第132年会、2012年3月29日、札幌
- ⑨ 田中正彦、Roles of ryanodine receptor 1 and 2 in dendrite formation of cerebellar Purkinje cells、MBSJ2011 (第34回日本分子生物学会年会)、2011年12月13日、横浜
- ⑩ 大橋令、小脳プルキンエ細胞樹状突起形成におけるリアノジン受容体の役割、日本病院薬剤師会東海ブロック 日本薬学会東海支部 合同学術大会 2011、2011年11月23日、名古屋
- ⑪ 大橋令、The role of ryanodine receptors in dendrite formation of cerebellar Purkinje cells、Neuroscience2011 (第34回日本神経科学大会)、2011年9月16日、横浜
- ⑫ 田中正彦、Effects of myosin Va knockdown by single-cell electroporation of siRNA in cerebellar Purkinje cells、Neuroscience2011 (第34回日本神経科学大会)、2011年9月15日、横浜
- ⑬ 田中正彦、Single-cell electroporation technique applied to cultured cerebellar neurons、単一細胞エレクトロポレーションによる siRNA 導入を用いた小脳プルキンエ細胞における myosin Va 発現抑制効果の解析、日本薬学会第131年会、2011年3月30日、静岡
- ⑭ 田中正彦、Long-term gene-silencing effects of small interfering RNA transferred by single-cell electroporation in cerebellar Purkinje neurons in vitro、BMB2010 (第33回日

本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会)、2010年12月7日、神戸

- ⑮ 田中正彦、Long-term monitoring of effects of small interfering RNA introduced by single-cell electroporation in cultured cerebellar neurons、Neuroscience 2010 (40th Annual Meeting of Society for Neuroscience)、2010年11月16日、San Diego, CA, USA
- ⑯ 田中正彦、Single-cell electroporation technique applied to cultured cerebellar neurons、Neuro2010 (第33回日本神経科学大会 第53回日本神経化学会大会 第20回日本神経回路学会大会 合同大会)、2010年9月2日、神戸

[図書] (計1件)

- ① 田中正彦、Springer (New York)、Single-cell electroporation of siRNA in primary neuronal cultures、In: Neuromethods Vol. 65 Controlled Genetic Manipulations、2012、pp. 129-139

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/research_course/res_course05.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 正彦 (TANAKA MASAHIKO)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：60267953

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし