

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700412

研究課題名(和文)新規神経軸索誘導分子FLRTファミリー蛋白質の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of FLRT family proteins as novel axon guidance molecules

研究代表者

山岸 覚(YAMAGISHI, Satoru)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：40372362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質は神経細胞が脳室帯・脳室下帯(SVZ)にて誕生し、皮質板へと放射状移動することにより美しい6層構造が形成される。細胞移動の遅い群は脳室下帯にて接線方向に突起を伸張し、数日間マルチポーラーと呼ばれる形態をとる。これらの細胞は、ネトリン受容体であるUnc5Dを発現しているが、具体的なリガンドはこれまで不明であった。申請者は、FLRT2が、Unc5D受容体に対してリガンドとして作用し、マルチポーラー細胞をSVZに留まらせていることを見出した(Yamagishi et al., EMBO J., 2011)。

研究成果の概要(英文)：The mammalian Unc5 family of repulsive Netrin receptors comprises four orthologues (Unc5A-D) whose functions are not well understood. In the developing neocortex, a subpopulation of neurons in the subventricular zone (SVZ) characterized by the expression of Unc5D, displays delayed migration to the cortical plate (CP). However, the underlying mechanism of this behavior is unknown. Unc5D was shown to bind Fibronectin and leucine-rich transmembrane protein-3 (FLRT3), the relevance of which is unclear. We show that FLRT2, which is expressed in the CP, is a new ligand for Unc5D. In FLRT2 or Unc5D mutants, a subpopulation of SVZ neurons shows premature migration towards the CP, whereas Unc5D overexpression has opposite effects. These findings suggest that FLRT2 represents a repulsive guidance cue that causes Unc5D+ neurons to reside in the SVZ for a prolonged period before initiating migration.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経軸索ガイダンス分子 ネットリン Unc5 FLRT

1. 研究開始当初の背景

マウス大脳皮質は神経細胞が脳室帯 (VZ) および脳室下帯 (SVZ) において産生され、皮質板へと移動することにより美しい6層構造が形成される。この細胞移動は発生過程において TPO を守り、秩序よく形成されて行く。上層へ移動する神経細胞は子宮内電気穿孔法の開発により、移動の早い群と遅い群の存在が知られている。移動の遅い群は脳室下帯、特に多極性細胞蓄積帯 (MAZ) にて接線方向に突起を伸張し、数日間マルチポーラーと呼ばれる形態をとることが知られている。これらの細胞は、ネトリン受容体である **Unc5D** を発現しているが、具体的なリガンドはこれまで不明であった。申請者は、**FLRT (Fibronectin Leucine-Rich Transmembrane Protein)** ファミリー蛋白質が、**Unc5** 受容体に対してリガンドとして作用することを見出していた。

2. 研究の目的

本研究課題において、**FLRT2** による反発因子としての詳細な機能解析、及び発生期の大脳皮質において **FLRT2** が **Unc5D** 陽性細胞の移動を制御しているのかを解析することを研究目的とした。さらには **FLRT2** が視床皮質路形成に関与しているのかを解析を行った。**FLRT2** は膜貫通型蛋白質であることから、**Unc5D** をリガンドとしたリバースシグナリングが存在する可能性が考えられ、これを検討した。

3. 研究の方法

- (1) **FLRT2** 精製蛋白質を用いてストライプアッセイを行い、**FLRT2** が反発因子として作用するかを検討した。
- (2) **FLRT2** ノックアウトマウスを用いて大脳皮質の神経細胞移動について解析を行った。
- (3) **FLRT2** ノックアウトマウスにおける視床大脳皮質経路について **DiI** を視床にインジェクションして可視化し、解析を行った。
- (4) **FLRT2** は膜貫通型蛋白質なので、**Unc5D** がリガンドとなるリバースシグナリングについて **Unc5D** 精製蛋白質を用いてストライプアッセイ解析を行った。

4. 研究成果

- (1) **FLRT2** による反発作用
Unc5 ファミリー分子は **Netrin-1** 受容体として反発性ガイダンス因子としての機能がよく知られている。**FLRT** ファミリーにも **Unc5** を介した反発因子として活性があるかを調べる為、ストライプアッセイを行った (図 1)。蛍光ラベルした **FLRT2** を基質としてストライプ状にコートし海馬神経細胞を培養したところ、24 時間内に 8 割以上の神経細胞が **FLRT2** 領域を避けるように移動した (図 1 B)。すなわち、**FLRT2** の反発性ガイ

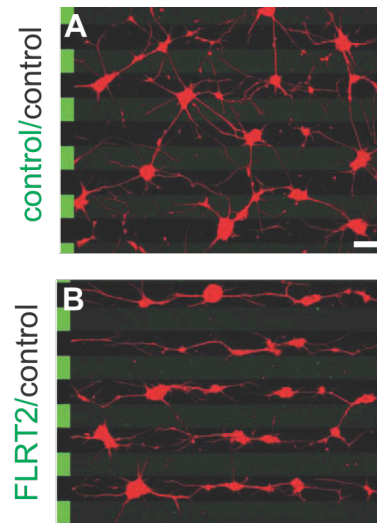


図 1 : ストライプアッセイによる **FLRT2** の神経細胞に対する反発活性

ダンス因子としての活性が見出された。また、軸索だけでなく、細胞体自体も反発することが、タイムラプスによる観察から明らかとなった。

(2) **FLRT2**・**Unc5D** ノックアウトマウスにおける大脳皮質神経細胞移動の解析

Unc5D がマルチポーラー細胞に発現していることに注目し、この細胞の皮質板への放射状移動との関わりを解析した。先にも述べたが **Unc5D** 陽性細胞は数日間 **SVZ (MAZ)** に滞在してから移動を開始する **UL2** 細胞群である。

FLRT2 はこれらの細胞が主に誕生する胎生 15 日齢において、皮質板に強く発現しており、やがて **V-VI** 層細胞となる。一方 **Unc5D** の mRNA の発現は胎生 15 日齢では **SVZ** にて発現しているが、やがて移動し、出生時には皮質板上層に発現が見られる。しかしながら、上層へ移動中の細胞には発現が殆ど見られない。一方、**unc5d** の mRNA 前駆体イントロンを認識する **svet1** プロンプによる **in situ hybridization** では、移動中の細胞も可視化することができた。すなわち、**SVZ** にて **Unc5D** 陽性だった細胞は、一度 **Unc5D** の発現を停止し、mRNA 前駆体として **unc5d (svet1)** 発現を核内に保持しながら移動し、上層到達後に再度スプライシングを行うことが明らかとなった。これは、ちょうど **FLRT2** の領域を通り抜けている間に **Unc5D** 発現をシャットダウンしていることを意味している。これらの現象から、我々は皮質板に発現している **FLRT2** がマルチポーラー細胞の移動を反発的に抑制しているのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証する為に胎生 15 日齢 **FLRT2^{-/-}** における **UL2** 細胞を **svet1** プロンプによって可視化し、細胞の分布を解析した (図 2)。

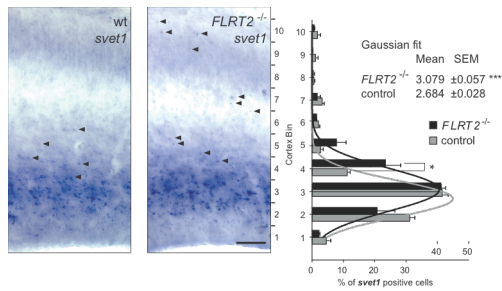


図 2: FLRT2^{-/-}における Unc5D 陽性細胞の早期移動

その結果、FLRT2^{-/-}において、UL2 細胞の分布は野生型に比して上側にシフトしており、上層への移動を早く開始していることが明らかとなった。実際、胎生 14 日に分裂中の細胞を BrdU ラベルし、2 日後に細胞の分布を観察すると、FLRT2^{-/-}では皮質板への到達が早くなっていることが明らかとなった (図 3)。

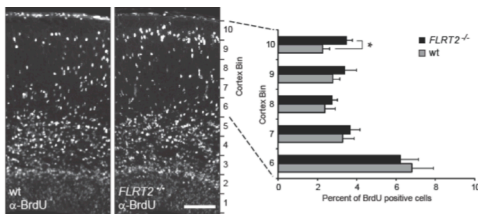


図 3: BrdU ラベリングによる FLRT2^{-/-}における神経細胞移動

以上、申請者は FLRT2、FLRT3 が新規軸索ガイダンス分子であることを見出し、特に FLRT2 は大脳皮質 UL2 細胞の放射状移動を抑制していることを明らかにした (図 4)。

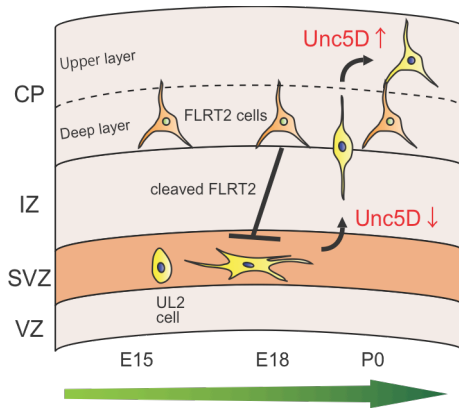


図 4: 本研究課題モデル図

(3) FLRT2 ノックアウトマウスにおける視床大脳皮質経路の解析。

FLRT2 は視床皮質路が通過する近傍の線条体にて強く発現している。したがって、胎生 15 日齢の FLRT2 ノックアウトマウスの視床および大脳皮質に DiI を注入し、視床皮質路および皮質視床路の可視化を行った。そ

の結果、約半数のノックアウトマウス視床皮質路においてミスプロジェクションが観察された。また、皮質視床路においても FLRT2 ノックアウトマウスにおいてミスプロジェクションが観察された。この結果は FLRT2 が視床皮質路をガイダンス分子としてナビゲートする役割があることが明らかとなった。

(4) Unc5D がリガンドとなるリバースシグナリングについての解析

FLRT2 が受容体として機能している可能性を考え、蛍光ラベルした Unc5D 精製蛋白質を基質として、大脳皮質神経細胞の初代培養を用いたストライプアッセイを行った。24 時間後、大脳皮質神経細胞は Unc5D に対して強い反発作用を示した。この結果から Unc5 ファミリー蛋白質がリガンドとして機能していることを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Yamagishi S, Hampel F, Hata K, del Toro D, Schwark M, Kvachnina E, Bastmeyer M, Yamashita T, Tarabykin V, Klein R, Egea J: FLRT2 and FLRT3 act as repulsive guidance cues for Unc5-positive neurons. *EMBO J.*, 2011, 30, 2920-33

② Satoru Yamagishi*, Sumiko Mikawa, Hiromu Furukawa, Takeshi Sasaki, Takeshi Ito, Takatoshi Ueki and Kohji Sato, Spine Homeostasis as a Novel Therapeutic Target for Schizophrenia, *Clinic Pharmacol Biopharmaceut*, S1-001, 2012

[学会発表] (計 10 件)

① 山岸 覚, Falko Hampel, 羽田 克彦, Daniel del Toro, Manuela Schwark, Elena Kvachnina, Martin Bastmeyer, 山下 俊英, Victor Tarabykin, Joaquim Egea, Ruediger Klein. FLRT2 and FLRT3 act as repulsive guidance cues for Unc5-positive neurons. 日本神経科学会, 2011 年 9 月 16 日, 横浜

② 山岸 覚, Falko Hampel, 羽田 克彦, Daniel del Toro, Manuela Schwark, Elena Kvachnina, Martin Bastmeyer, 山下 俊英, Victor Tarabykin, Joaquim Egea, Ruediger Klein. 新規神経軸索誘導因子 FLRT2 と FLRT3 による Unc5 細胞に対する反発作用, 第 54 回日本神経化学会, 2011 年 9 月 26 日, 金沢

③ 山岸 覚, 新規軸索誘導因子 FLRT ファミリーの Unc5 陽性神経細胞に対する反発作

用、日本解剖学会、2012年3月28日、甲府

- ④山岸覚, Falko Hampel, Daniel del Toro, Joaquim Egea, Ruediger Klein, 佐藤康二。FLRT2とUnc5Dによる大脳皮質形成における細胞移動の制御、第35回日本神経科学大会、2012年9月18日、名古屋
- ⑤山岸覚、佐藤康二、新規軸索誘導因子FLRTファミリーのUnc5陽性神経細胞に対する反発作用、第72回日本解剖学会中部支部学術集会、2012年10月13日、岐阜
- ⑥Yamagishi S and Sato K. “Repulsive guidance molecule FLRT2 regulates development of the thalamocortical projections”神経科学・神経化学合同大会 (Neuro2013)、2013年6月22日、京都。
- ⑦山岸覚、Ruediger Klein、佐藤康二「神経軸索ガイダンス因子FLRT2による視床大脳皮質経路の形成制御」第73回日本解剖学会中部支部学術集会、2013年10月5日、甲府
- ⑧山岸覚、佐藤康二「軸索誘導因子FLRTファミリーのUnc5陽性神経細胞に対する反発作用」第86回日本生化学会大会2013年9月12日、横浜
- ⑨Satoru Yamagishi, Falko Hampel,, Daniel del Toro, Martin Bastmeyer, Victor Tarabykin, Koji Sato, Joaquim Egea, Ruediger Klein. FLRT2 regulates migration of Unc5D-positive cortical upper layer neurons. (poster), Society for Neuroscience, Nov. 10. 2013, San Diego.
- ⑩山岸覚、Ruediger Klein、佐藤康二「神経軸索ガイダンス因子FLRT2による視床大脳皮質経路の形成制御」第119回日本解剖学会学術集会、2014年3月28日、栃木

[図書] (計 2 件)

- ①山岸覚、大脳皮質発生における膜貫通型蛋白質FLRT2の反発性ガイダンス因子としての役割、神経化学, vol 53, p13-22, 2014
- ②山岸覚、「膜貫通型 FLRT 蛋白質による Unc5 陽性神経細胞に対する反発作用」、生化学、in press

[その他]

ホームページ

http://www.hama-med.ac.jp/uni_education_igakubu_igaku_shinkeikaibou.html

プレスリリース

- ・Neuer Wegweiser für wandernde Nervenzellen entdeckt、2011.6.15
ドイツ報道関係各社計 23 社より

研究会での発表 (計 8 件)

- ①山岸覚、新規軸索誘導分子 FLRT ファミリー

一の役割、第 13 回 ORIGIN 神経科学研究会、2011 年 8.21 日、芦屋

- ②山岸覚、新規軸索誘導因子 FLRT ファミリーの Unc5 陽性神経細胞に対する反発作用、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク、2012 年 7 月 26 日、仙台
- ③山岸覚、FLRT2/Unc5D による大脳皮質神経細胞の移動、第 13 回 ORIGIN 神経科学研究会、2012 年 9 月 1 日、金沢
- ④山岸覚、大脳皮質発生における新しいメカニズム—新規ガイダンス因子 FLRT2 の反発作用、第 7 回浜松医科学シンポジウム、2012 年 9 月 14 日、浜松
- ⑤山岸覚、中枢神経系における神経細胞移動制御分子の解析、第 6 回神経発生討論会、2013 年 3 月 15 日、和光
- ⑥山岸覚、膜貫通型蛋白質 FLRT ファミリーによる Unc5 陽性細胞に対する反発作用、熊本シンポジウム 2013、2013 年 6 月 25 日、熊本
- ⑦山岸覚、佐藤康二「FLRT2 による視床大脳皮質神経回路の形成制御」第 15 回 ORIGIN 神経科学研究会、2013 年 8 月 31 日、岐阜
- ⑧山岸覚、神経軸索ガイダンス分子 FLRT2 による神経細胞移動と血管形成における役割、第 230 回 熊本大学発生研セミナー、2014 年 2 月 12 日、熊本

研究会開催

- ・包括的神経グリア研究会 2013、2013.1.12-13、浜松
包括脳ネットワークニュースレターNo.6、p25

6. 研究組織

(1)研究代表者

山岸 覚 (YAMAGISHI, Satoru)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：40372362