

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：33915

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20234

研究課題名(和文) 蝸牛神経の回路形成における神経接着因子の役割

研究課題名(英文) The role of neural adhesion molecules during inner ear development.

研究代表者

近藤 貴子 (Kondo, Takako)

名古屋女子大学・家政学部・講師

研究者番号：60737203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経接着因子として知られている免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)は神経細胞の軸索ガイダンスや特異的シナプス形成において重要な役割を果たしている。本研究では、IgSFに属するDSCAMやSDKがどのように胎児期の内耳および蝸牛神経において発現しているかを遺伝子およびタンパク質レベルで解析した。SDKは蝸牛神経のみに発現していたが、DSCAMは有毛細胞にもMyosin VIIaと共発現していた。また、DSCAMは軸索誘導因子であるNetrin1とも共発現し、これらのタンパク質は直接的な相互作用をしていた。したがって、DSCAMが蝸牛神経の軸索ガイダンスに参与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The Immunoglobulin superfamily (IgSF) adhesion molecules, down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM) and Sidekick (SDK) proteins, have recently emerged as novel axon-guidance proteins that play pivotal roles in neurite biosynthesis, axon growth and formation of neural networks during embryonic development. This study, we examined expression patterns of the IgSF genes and proteins in the mouse inner ear during embryonic development. DSCAM and SDK were found to be expressed in SGNs and sensory hair cells at embryonic day 18. DSCAM protein is co-localized in the inner ear with hair cell marker Myosin VIIa. Immunoprecipitation assays also revealed that DSCAM interacts with Myosin VIIa and Netrin1 in the organ of Corti, though the nature of these interactions are not well understood at this time, however it might be involved in the axon guidance of SGNs to the target hair cells as a receptor for Netrin1.

研究分野：分子生物学

キーワード：蝸牛神経 神経接着因子 内耳

1. 研究開始当初の背景

蝸牛神経は末梢性突起と中枢性突起を有する双極細胞である。末梢性突起はコルチ器内の有毛細胞と中枢性突起は脳幹の蝸牛神経核とシナプスを形成する。聴神経の発達において神経栄養因子 (Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) と Neurotrophin-3 (NT3)) や軸索誘導因子 Netrins などのいくつかの必須な分子およびその受容体が同定されている。これらの遺伝子を欠損した変異マウスでは、前庭神経細胞 (BDNF) やラセン神経節細胞 (NT3) の減少と聴神経回路 (Netrin1) の異常がみられる。しかし、コルチ器 (有毛細胞) および蝸牛神経核からの軸索ガイダンスキュー (軸索誘引因子や軸索反誘因子など) やシナプス形成の分子機構はいまだ明確になっていない。胎児期の蝸牛神経回路の形成に関する軸索ガイダンスキューを解明することは、聴覚の発達過程を明らかにするだけでなく、老年期における聴神経退化の仕組みの解明や聴神経の再生にも役立つものと考えられる。軸索ガイダンス機構には神経接着因子である免疫グロブリンスーパーファミリー (Immunoglobulin superfamily: IgSF) 分子群が軸索ガイダンスキューとして関与している。IgSF に属する Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (DSCAM) や Sidekick (SDK) は視神経回路において重要な役割を果たしている ()。そこで、IgSF が聴神経の神経回路形成にどのように影響しているのかを検討する。

2. 研究の目的

本研究は聴覚を司る内耳、とくに蝸牛神経の発達に焦点をあて、神経回路形成において神経接着因子 IgSF 分子群 (DSCAM, DSCAML1, SDK1 および SDK2) がどのように発現しているかを遺伝子およびタンパク質レベルで解析し、その分子機構を明らかにすることを目的とする。

(1) 胎児期の内耳における DSCAM, DSCAML1, SDK1 および SDK2 の発現を Quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) を用いて検討する。

(2) 蝸牛神経の成長円錐を精製し、IgSF 分子群の局在を明らかにする。また免疫組織化学染色や共免疫沈降法を用いて内耳発達期における IgSF 分子群と内耳発現タンパク質の発現パターンおよびタンパク質の相互作用を明確にする。

3. 研究の方法

内耳の発生は外胚葉から耳胞が形成され、前庭や半規管、蝸牛管などに分化する。マウスの胎児 12 日目 (E12) には蝸牛と前庭を分離することが可能なことより、E12, E14, E16 および生後 1 日目 (P1) のマウスの蝸牛と脳幹

の蝸牛神経核部からそれぞれ RNA を抽出し、目的とする神経接着因子の IgSF 遺伝子の発現を Q-PCR により定量解析した。また Q-PCR と同様の各ステージの内耳および脳幹の組織切片を作製し、免疫組織化学染色法を行った。E18 の内耳および脳幹よりタンパク質を抽出し、共免疫沈降に用いた。

(1) totalRNA はマウスの内耳 (蝸牛と前庭部位) より抽出し、RNeasy Mini-kit (QIAGEN) を用い精製した。精製した totalRNA より Omniscript reverse transcriptase (QIAGEN) を用いて cDNA を合成し、SYBR Green を用いて DSCAM, DSCAML1, SDK1 および SDK の遺伝子発現を LightCycler 480 (Roche) により定量解析した。

(2) マウスの蝸牛および脳幹より、タンパク質を抽出した。SDS/PAGE でタンパク質を分離し、PVDF (Polyvinylidene difluoride) 膜に転写した。ブロッキングした後、DSCAM, DSCAML1 および SDK1 の一次抗体を反応させ、HRP (horseradish peroxidase) で標識された二次抗体を用い目的タンパク質を検出した。共免疫沈降は、プロテイン A または G アガロースビーズを用いて DSCAM に相互作用するタンパク質を確認するため、Western Blotting 法で検出した。

(3) クライオスタットを用いて内耳の組織切片をスライドガラスに張り付け標本を作成した。組織染色は E18 の蝸牛を取り出し、骨部分を除いて染色を行った。切片または組織は 4% paraformaldehyde で固定し、ブロッキング溶液で非特異反応を抑制した。その後、1 次抗体 (モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体) を単独または複数用いて反応させ、Alexa 488、568 または 647-conjugated 2 次抗体で検出した。共焦点レーザー顕微鏡 A1R (NIKON) によりタンパク質の発現および形態を観察した。

4. 研究成果

(1) DSCAM, DSCAML1, SDK1 および SDK2 の In Situ プローブを作成し、AP 標識抗 DIG 抗体および BM purple でシグナルを検出した。DSCAM, DSCAML1, SDK1 および SDK2 の発現は E18 の内耳において蝸牛神経節に強く確認された。さらに有毛細胞

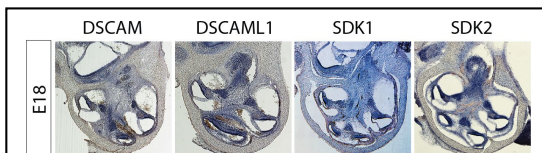


図 1 .E18 内耳における IgSFmRNA 発現
マウス E18 の内耳の切片を用い、In Situ で IgSF の発現を確認した。青色の部分が mRNA の発現を表す。

を含めたコルチ器の細胞集団にも発現が確認された(図1)。

Q-PCRにより胎児のマウスの内耳におけるDSCAM, DSCAML1, SDK1およびSDK2の発現を解析した(図2)。E10(耳胞)においてはどの遺伝子もかすかに発現していたが、E18にかけてすべての遺伝子の発現上昇が確認された。E18の内耳においては前庭部位と蝸牛部位に隔離してRNAを回収した。その結果、E18においてDSCAM, およびDSCAML1の発現は前庭部位よりも蝸牛部位で多く発現していたのに対し、SDK1およびSDK2は蝸牛部位よりも前庭部位で多く発現していることが確認された。これらの発現結果より、IgSFの遺伝子が前庭と蝸牛に聴神経を誘導する因子である可能性が示唆された。

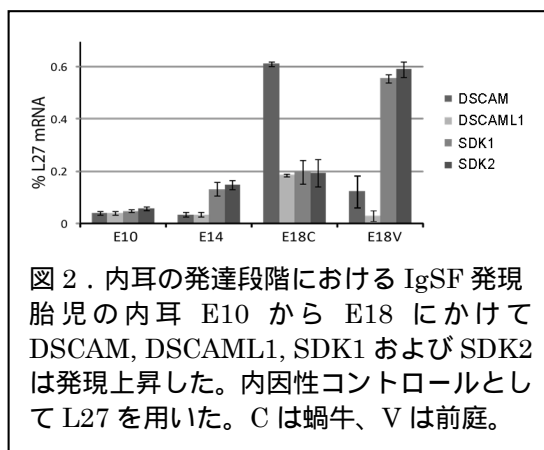


図2. 内耳の発達段階におけるIgSF発現。胎児の内耳E10からE18にかけてDSCAM, DSCAML1, SDK1およびSDK2は発現上昇した。内因性コントロールとしてL27を用いた。Cは蝸牛、Vは前庭。

(2) マウスE18の内耳におけるDSCAM, DSCAML1およびSDK1のタンパク質発現を免疫染色によって確認したところ、DSCAMとDSCAML1は蝸牛の有毛細胞と蝸牛神経節に発現していた。これらの発現パターンとしては、すべての細胞ではなく、ランダムに発現していることが確認された。期待していたような有毛細胞と蝸牛神経の接続部にも局限した発現は確認できず、また神経の伸展部位や成長円錐での局限した発現も観察されなかった。DSCAMとDSCAML1は、共発現している細胞もあり、軸索誘導およびシナプス形成の制御には、DSCAMとDSCAML1を介した単独タンパク質での同種親和型(同種のタンパク質同士が結合する性質)が関与していない可能性が高い結果となった。ただし、DSCAMとDSCAML1の発現の大きな違いは、前庭の有毛細胞での発現であり、DSCAMのみ発現が確認された。この結果は、Q-PCRで得られた前庭部位においてDSCAMはDSCAML1より発現が多いという結果と一致していた。DSCAMは、有毛細胞においてMyosin7a(MyoVIIa)と共発現していることが確認された(図3)。SDK1は、蝸牛および前庭の有毛細胞に発現しておらず、蝸牛神経節のみに斑点状に発現していた。また支持細胞の周辺(ラ

セン板縁や鼓室唇部)にも斑点状の発現が確認された。しかし、この部位にある神経の軸索に局限していることは確認できなかった。

(3) E18の蝸牛を抽出し、DSCAM, DSCAML1およびSDK1抗体で組織の3重染色を行った。また、有毛細胞は、MyoVIIaおよびPhalloidin(Pha)を使用し、蝸牛神経はNeuronal Class III β -Tubulin(TUJ1)およびSynaptophysin(Syn)の陽性マーカーで染色した(図3)。SDK1は内有毛細胞の内側に斑点状の発現が確認された。ただし、TUJ1との共発現は確認されなかった。切片での染色と同様の結果が得られた。DSCAMとDSCAML1は、組織染色において蝸牛の有毛細胞に共発現していた。ただし、どちらもランダムに発現しており、DSCAMのみ、またはDSCAML1のみの単独で発現している細胞も確認された。DSCAMとDSCAML1は蝸牛神経節には発現が強く確認されたが、期待していたような軸索の成長円錐や軸索の先端には極限した発現がみられなかった。また、蝸牛神経においても、DSCAML1のほうが比較的強く広範囲での発現であったが、DSCAMとDSCAML1が共発現する蝸牛神経も確認された。視細胞で確認されたようなモザイク状の一定間隔での発現パターンは有毛細胞では確認できず、同種親和型による蝸牛神経の軸索誘導に関与している可能性は低いと考えられる。

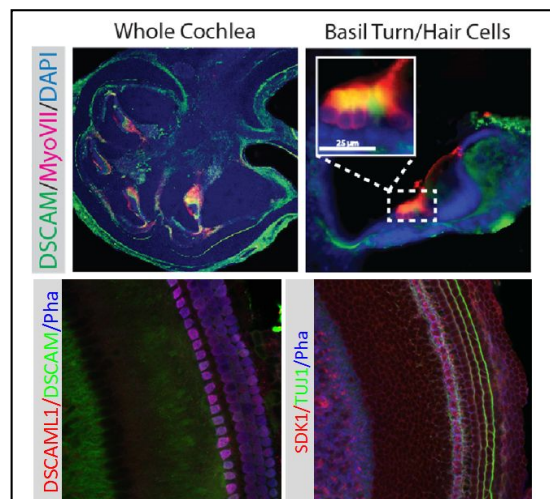


図3. 内耳に発現するIgSFタンパク質。E18の内耳には、有毛細胞においてDSCAM(緑)とMyoVIIa(赤)と共発現していた。核染色にはDAPI(青)を用いた。また、組織染色では、DSCAM(緑)とDSCAML1(赤)は有毛細胞に共発現していた。SDK1(赤)はTUJ1(緑)と共発現していなかった。また、SDK1はDSCAMとDSCAML1とは別の位置で発現していた。

(4) 免疫染色の結果により、DSCAM は内耳で発現するタンパク質と共発現していることが確認された。特に興味深い結果は、有毛細胞のマーカーである MyoVIIa と共発現していた点である。そこで、E18 の内耳および脳幹のタンパク質を抽出し、DSCAM と MyoVIIa を含む内耳に発現するタンパク質との相互作用を免疫沈降解析によって確認した。DSCAM は免疫染色で示されたように、有毛細胞に局限して発現する MyoVIIa と直接的タンパク質 タンパク質の相互作用が確認された(図 4)。ただし、その他に検討した成長円錐のマーカーの Growth Associated Protein 43 (GAP43) シナプスマーカーの Synaptophysin や小胞型グルタミン酸トランスポーターの Vesicular glutamate transporter (VGLUT) などの内耳タンパク質は、DSCAM との直接の相互作用は確認できなかった。

(5) Netrin1 は脊髄の床板から分泌され、脊髄交連神経の軸索を誘引するタンパク質として知られている。Netrin1 は神経軸索を誘導する役割をもつため、Netrin1 を分泌する標的細胞へ軸索を引きつけるが、別の神経軸索に対しては反発物質として Netrin1 が分泌されている細胞から軸索を退ける役割ももつ。Netrin1 の受容体は、DCC と UNC-5 が確認されているが、近年 DSCAM も受容体のひとつとして神経回路の発達時に機能していることが確認されている()。Netrin1 は内耳および蝸牛神経に発現していた。E18 の内耳においては、Netrin1 と DSCAM が共発現していることが免疫染色によって確認された。また、共免疫沈降により、内耳において DSCAM と Netrin1 が直接的なタンパク質 タンパク質の相互作用をしていることが確認された。このことによって、DSCAM の同種親和型による神経誘導については確認できなかったが、DSCAM が Netrin1 の受容体としてはたらき、蝸牛神経の軸索誘導をしている可能性が確認された。

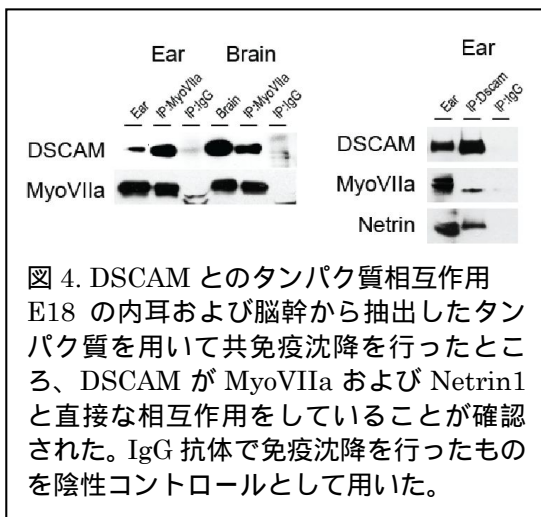


図 4. DSCAM とのタンパク質相互作用
E18 の内耳および脳幹から抽出したタンパク質を用いて共免疫沈降を行ったところ、DSCAM が MyoVIIa および Netrin1 と直接な相互作用をしていることが確認された。IgG 抗体で免疫沈降を行ったものを陰性コントロールとして用いた。

< 引用文献 >

Yamagata M, Sanes JR. Dscam and Sidekick proteins direct lamina-specific synaptic connections in vertebrate retina. Nature. 2008 Jan 24;451(7177):465-9.

Ly A, Nikolaev A, Suresh G, Zheng Y, Tessier-Lavigne M, Stein E. DSCAM is a netrin receptor that collaborates with DCC in mediating turning responses to netrin-1. Cell. 2008 Jun 27;133(7):1241-54

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 貴子 (Kondo, Takako)
名古屋女子大学・家政学部食物栄養学科
・講師
研究者番号：60737203

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

鵜川 眞也 (Ugawa, Shinya)
名古屋市立大学・大学院医学研究科
・教授

研究者番号：20326135

橋野 えり (Hashino, Eri)
インディアナ大学・医学部耳鼻科
・教授