

令和 4 年 5 月 3 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22476

研究課題名(和文)成熟神経細胞における核の位置制御の意義とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the importance and mechanisms of the nuclear positioning in mature neurons

研究代表者

桑子 賢一郎 (Kuwako, Ken-ichiro)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：30468475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：核膜LINC複合体は核の位置制御を担う重要な分子群として知られている。本研究では、LINC複合体の未知なる機能を明らかにするために培養神経細胞や生体マウス脳で機能阻害実験を中心に解析を行なった。そして、LINC複合体は、発生期および成熟神経細胞において、活動電位の生成の場である「軸索起始部」の形成と維持に必須であることが明らかになった。したがって、本研究により、核を起点とした新たな神経活動制御システムの存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで核を起点とした神経突起や神経活動の制御システムはほとんど知られておらず、またLINC複合体はほぼ全ての神経細胞で発現していることから、本研究は多様な脳神経機能の基盤をなす重要かつ普遍的な機構の存在を明らかにしたと考えられる。今後、本研究で発見した機構が脳の発生や疾患、老化などの幅広い現象に関与する可能性を明らかにしていくことで脳機能の基本作動原理の理解が深まると期待される。

研究成果の概要(英文)：The nuclear membrane LINC complex is known as important molecules regulating nuclear positioning. To clarify the unknown functions of the LINC complex, in this study, we performed functional inhibition experiments in cultured neurons and mouse brains. We found that the LINC complex was essential for the formation and maintenance of the axon initial segment, that is the site of action potential generation, in developing and mature neurons. This study suggests the existence of a new regulatory system of neuronal activity via the nucleus.

研究分野：神経科学

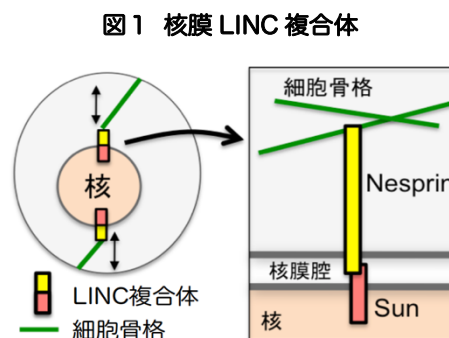
キーワード：神経突起 核

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの成熟神経細胞では核は細胞体のほぼ中央に局在し、発生期とは違ってほとんど動くことはない。これまで神経細胞における核の位置決定の意義はほとんど明らかにされておらず、神経細胞に特徴的な突起構造や神経活動との関連もわかっていなかった。

一方、非神経系細胞での研究から、核を含む細胞内小器官の位置制御を担う分子群として核膜 LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) 複合体が知られていた。核膜を貫通する LINC 複合体は、内膜の Sun と外膜の Nesprin からなる複合体で、細胞質側の Nesprin が細胞骨格と結合することで細胞骨格ネットワークの起点として機能し (図 1)、核の位置制御の他に細胞移動でも重要なはたらきをしていることが明らかにされてきた。しかし、LINC 複合体の神経細胞での知見は非常に限定的で、核を起点とした神経細胞の構造・機能の制御システムについてはほとんど理解が進んでいなかった。



2. 研究の目的

本研究では、核の位置制御を担う核膜 LINC 複合体の神経細胞での新たな機能を発見し、神経細胞の構造や機能における核の重要性を明らかにすることを目的とした。特に、神経細胞の構造的特徴である軸索や樹状突起の形成と維持、そしてそれらの機能発現に核を起点としたシステムが関与する可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) LINC 複合体の発現解析

発生期および成体マウス脳における LINC 複合体分子群 (Sun1, Sun2, Nesprin1, Nesprin2) の発現をそれぞれの特異抗体を用いた免疫組織化学的手法により解析した。特に、発生期では神経突起形成のさまざまなステージで詳細な解析を行なった。また、大脳皮質、海馬、小脳プルキンエ細胞などの初代培養神経細胞においても同様の発現解析を行った。

(2) 初代培養神経細胞における LINC 複合体の機能解析

LINC 複合体分子 Nesprin 1 の機能阻害型変異体 (LINC-DN(dominant-negative) : 細胞骨格との結合を強力に阻害する) を大脳皮質、海馬、小脳由来の初代培養神経細胞に遺伝子導入することで LINC 複合体の機能を阻害し、共発現させた GFP シグナルの観察や抗体染色により神経突起構造などの解析を行なった。軸索や樹状突起の全体構造の解析では、長さや分岐、面積についての定量を行なった。また、後述する培養神経細胞における神経活動操作では KCl 添加 (対照群は NaCl 添加) による脱分極誘導を行った。

(3) 生体脳における LINC 複合体の機能解析

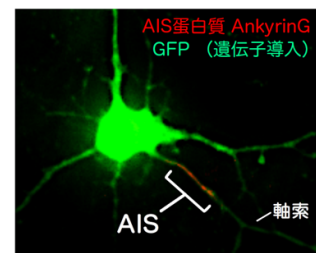
上記 (2) の LINC 複合体機能阻害型変異体 (LINC-DN) を子宮内エレクトロポレーション法によって遺伝子導入して LINC 複合体の機能を阻害し、共発現させた GFP シグナルの観察や抗体染色により神経突起構造などの解析を行なった。また遺伝子導入の際は、DNA 量を減らして導入効率を下げることで、蛍光標識された神経細胞の神経突起構造の全容が観察できるようにした。

4. 研究成果

最初に、上記「研究の方法（1）」により LINC 複合体の発現解析を行ったところ、成体脳神経細胞では、大脳皮質、海馬、小脳などの調べたすべての領域で Sun1, Sun2, Nesprin1, Nesprin2 の発現が認められた。興味深いことに、小脳プルキンエ細胞では核の位置が大きく変動する生後 1 週間の間に LINC 複合体構成分子の発現・局在パターンも劇的に変化することが明らかになった。同様の所見は、初代培養大脳皮質神経細胞の神経突起形成初期でも観察され、Nesprin1 や Nesprin2 が核膜以外で高発現していることがわかった。しかし、これらの発現パターンの変動と神経構造・機能との関連については解明できていない。

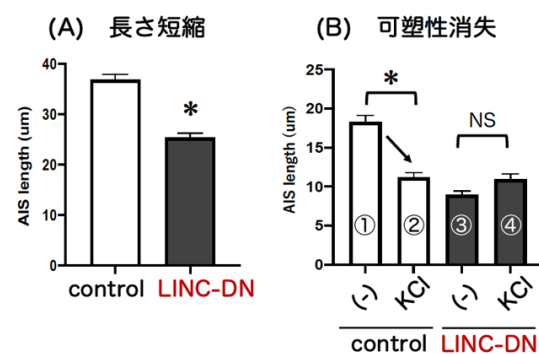
次に、上記「研究の方法（2）」により、初代培養神経細胞において LINC 複合体の機能阻害実験を行なった。その結果、まず LINC-DN を発現させた大脳皮質神経細胞の樹状突起は長さ、分岐、面積とも対照群と比べて大きな変化は認められなかった。また、軸索の長さについても異常は観察されなかった。これらのことから LINC 複合体は樹状突起や軸索の全体構造の形成においては重要なはたらきをしていないと考えられた。一方、LINC-DN を発現させた神経細胞では軸索

図2 AIS (軸索起始部)



内の特殊な機能ドメインである軸索起始部 (AIS: Axon Initial Segment、図2) が顕著に短くなっていることが明らかになった (図3A)。AIS は特定のイオンチャネルが集積した軸索の根もとの構造体で活動電位の発生に必須であり、刺激に応じた AIS の構造的・機能的変化は神経可塑性を生み出す基盤となる。AIS は刺激に応じて自身の長さや位置をダイナミックに変化させることで、局在する Na⁺、K⁺チャネル群の種類と量を調整して神経細胞の興奮性を制御する。しかし、これまで AIS がどのように形成され、その構造的可塑性がどのように制御されているのかについては理解が進んでいない。そこで、LINC-DN を発現させた大脳皮質神経細胞に脱分極刺激 (KCl 処理) を与えたところ、正常神経細胞で見られる AIS の構造的可塑性が完全に消失していることが明らかになった (図3B)。また、同様の AIS の短縮は、大脳皮質神経細胞だけでなく、LINC-DN を発現させた海馬神経細胞や小脳プルキンエ細胞でも認められた。これらのことから、核を起点とした未知なるシステムが AIS の形成と機能維持に大きく関わっている可能性が示唆された。

図3 LINC 複合体の機能阻害による AIS の異常



(A) LINC 複合体の機能阻害型変異体(LINC-DN)を発現した大脳皮質神経細胞では AIS が短くなった。

(B) 対照神経細胞では脱分極誘導 (KCl 処理) に応答して AIS が短縮したが (① vs ②)、LINC-DN 発現神経細胞ではこの可塑性が消失した (③ vs ④)。

そこで次に、上記「研究の方法（3）」により、培養神経細胞で得られた知見が生体脳においても見られるかどうかを検証した。そして、大脳皮質神経細胞および小脳プルキンエ細胞において LINC 複合体の機能阻害が AIS の短縮を引き起こすことが確認された。したがって、LINC 複合体による AIS の制御システムが実際に脳内に存在していることが示唆された。

そこで次に、上記「研究の方法（3）」により、培養神経細胞で得られた知見が生体脳においても見られるかどうかを検証した。そして、大脳皮質神経細胞および小脳プルキンエ細胞において LINC 複合体の機能阻害が AIS の短縮を引き起こすことが確認された。したがって、LINC 複合体による AIS の制御システムが実際に脳内に存在していることが示唆された。

<今後の課題・展望>

本研究により、核の位置制御を担う LINC 複合体が神経細胞においては軸索構造の制御に関わっ

ていることが明らかになった。今後は、LINC 複合体による核を起点とした AIS 制御が神経活動の調節においてどのようなはたらきをしているのかを明らかにしていく必要がある。また、LINC 複合体はほぼすべての神経細胞で発現していることから、神経系の発生や疾患、老化など幅広い事象において普遍的な役割を担っている可能性も考えられ、それらの解析を進めていくことで神経系の形態形成および機能発現における核の重要性がより深く理解できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasegawa K and Kuwako KI	4. 巻 0
2. 論文標題 Molecular mechanisms regulating the spatial configuration of neurites	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seminars in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcdb.2022.02.015	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 -
1. 著者名 Matsui TK, Tsuru Y, Hasegawa K, Kuwako KI	4. 巻 39
2. 論文標題 Vascularization of human brain organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 1017-1024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.3368	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 -
1. 著者名 Murayama AY, Kuwako KI, Okahara J, Bae BI, Okuno M, Mashiko H, Shimogori T, Walsh CA, Sasaki E, Okano H	4. 巻 10
2. 論文標題 The polymicrogyria-associated GPR56 promoter preferentially drives gene expression in developing GABAergic neurons in common marmosets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-78608-4	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 該当する
1. 著者名 桑子賢一郎	4. 巻 0
2. 論文標題 神経突起自己回避	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脳科学辞典	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14931/bsd.9217	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 -

1. 著者名 Matsui TK, Tsuru Y, Kuwako KI	4. 巻 14
2. 論文標題 Challenges in Modeling Human Neural Circuit Formation via Brain Organoid Technology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 607399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2020.607399	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6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 長谷川孝一、松井健、近藤純平、荘司静香、濱德行、桑子 賢一郎
2. 発表標題 LINC complex regulates the plasticity of axon initial segment
3. 学会等名 第99回日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 雪澤瞳、長谷川孝一、桑子 賢一郎
2. 発表標題 i-GONAD法によるチロシナーゼ遺伝子ヒマラヤ変異マウスの作製
3. 学会等名 西日本医学生学術フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 都留佑一朗、松井健、長谷川孝一、桑子 賢一郎
2. 発表標題 ヒト脊髄オルガノイドの作成
3. 学会等名 西日本医学生学術フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川 孝一、松井健、近藤純平、石原朋郎、桑子 賢一郎
2. 発表標題 神経の極性と可塑性に関連する軸索起始部における核-細胞骨格結合タンパク質Nesprin-1の解析
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱 德行、加藤 将、横田 茂文、長谷川 孝一、桑子 賢一郎
2. 発表標題 胎生期におけるpreBotzinger complexニューロンに対するシナプス接続数変化の解析
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑子賢一郎
2. 発表標題 脳神経回路をつくる発生システム
3. 学会等名 奈良県立医科大学特別セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019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
研究協力者	長谷川 孝一 (Hasegawa Koichi)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	濱 德行 (Hama Noriyuki)		

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