

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22700337

研究課題名(和文) 発生期における神経細胞の核移動を支配する分子基盤の解析

研究課題名(英文) analysis of molecular mechanisms underlying nuclear translocation in migrating neurons

研究代表者

梅嶋 宏樹 (Umeshima, Hiroki)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号：40525375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：適切な神経回路網の形成には神経細胞の細胞核が特定の部位に正しく移動する必要があるが、その分子機序はいまだ明らかではない。本研究では、細胞核移動に重要とされる細胞骨格の動態および細胞骨格と細胞核の相互作用に注目し、移動中の神経細胞において細胞骨格と細胞核の動態を高い時間・空間分解能で同時にタイムラプス観察することに成功した。また、細胞核移動に関与する分子として複数の細胞骨格関連分子および細胞核局在分子について解析を行なった。そのうちのひとつであるCDK5が神経細胞移動に及ぼす影響について論文誌上において報告した。本研究の成果は神経細胞移動の異常を伴う神経疾患の発症機構解明につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Nuclear translocation of migrating neurons is prerequisite for the formation of functional brain circuits, but its molecular mechanism has remained unclear. In this study, I focused on dynamics of the cytoskeleton, which is closely related to nuclear dynamics, and successfully obtained high-resolution time-lapse images of nuclear and cytoskeletal dynamics during nuclear translocation, simultaneously. In addition, we investigated the roles of several cytoskeletal and nuclear proteins for neuronal migration (and nuclear translocation) and I reported that CDK5, a kinase regulating many cytoskeletal proteins, differentially regulates two types of migration of cerebellar granule neurons. This study is expected to help our understanding of neuronal disorders associated with neuronal migration defects.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：脳・神経 発生・分化 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

成体の中枢神経系は特定の神経細胞が整然と配置された層構造や核構造を有することで機能的な神経回路網の構築を実現している。神経細胞内の情報処理系において、情報の入力部である樹状突起と出力部である軸索は各々細胞体から伸長し、樹状突起から入力された多数の情報は細胞体で統合された後、軸索より出力される。以上の点から細胞体の位置は神経回路網の情報処理において重大な意味を持つ。細胞体の位置は発生期に個々の神経細胞が神経幹細胞から分裂した後、自らの機能部位へと組織内を適切に移動することで決定される。神経細胞移動の異常は神経回路網形成の破綻を引き起こし、脳奇形や重篤な精神神経疾患の原因となる。中枢神経系を構成する神経細胞は多種多様でありその移動経路も各々異なるが、移動様式には一定の共通点が見られる。神経細胞は移動の際、まず先導突起と呼ばれる神経突起を進行方向へと伸ばし、その後細胞核を先導突起の内部へと移動させる。細胞核の位置は成熟した神経細胞における細胞体の位置を規定する。近年、神経細胞の細胞核移動に関与する分子メカニズムの探索から多くの分子が微小管やアクチンのダイナミクスに影響を及ぼすことが明らかになった。しかし、細胞核移動の過程でこれらの分子が細胞骨格ダイナミクスをどのように制御するのかについてはいまだ不明な点が多い。

現在、核の移動には微小管とアクチンおよび各々のモータータンパク質であるダイニンとミオシンが重要であることが分かっているが、それらが核を駆動するメカニズムについては複数の仮説が提唱されているのが現状である。最も初めに提唱されたモデルでは、核の前方に局在する微小管形成中心(MTOC)が微小管を介して先導突起と核を連結しており、先導突起がMTOCを牽引するとそれと連動してMTOCが微小管モータータンパク質ダイニンによって核を牽引するというものだった。しかし、申請者の研究から、核とMTOCの移動は連動しておらず独立であることが示され、申請者らは核がMTOCとは独立に微小管によって牽引されるモデルを提唱している。また、アクチン骨格に関しては、細胞核の後部に活性型ミオシンが局在し核を前方へと押し出すモデルと、核の前方に局在して核を牽引するというモデルが別々のグループから提唱されており決着はついていない。

2. 研究の目的

本研究では、脳の発生過程における神経細胞の細胞核移動の分子機序を解明することを目指し、細胞骨格の動態および細胞骨格と細胞核の相互作用に注目した解析を行なう。移動中の神経細胞における細胞骨格動態は他の細胞に比べていまだ不明な点が多い。その原因の一つとして、神経細胞の細胞体が非

常に小さく細胞骨格動態の詳細な観察が難しいことが挙げられる。また、微小管やアクチン等の細胞骨格系と核の相互作用が想定されているが、移動中の神経細胞においてこれらの細胞骨格と核の相互作用を仲介する分子は同定されていない。本研究では、神経細胞における細胞骨格イメージング技術の開発・改良により核移動時における細胞骨格の動態を明らかにすることを目指すとともに、神経細胞の核移動に重要な役割を果たす細胞核アンカータンパク質を同定し、それらと細胞骨格の相互作用を検証することで核移動における細胞骨格の役割を明らかにすることを目指す。

本研究の成果は、細胞核移動の異常を伴う神経疾患の発症機構の解明や治療法の確立につながることを期待される。

3. 研究の方法

(1) 移動中の神経細胞における細胞骨格イメージング手法の確立

移動中の神経細胞におけるライブイメージングに適した細胞骨格標識法を探索し、細胞骨格イメージングの系を確立する。アクチンおよび微小管細胞骨格の標識法として細胞骨格標識用の化合物および細胞骨格結合分子と蛍光タンパク質(EGFP等)の融合遺伝子の使用を検討する。また、イメージング手法として従来の共焦点レーザー走査型顕微鏡以外の顕微鏡の使用も検討する。確立された系を用いて細胞骨格および関連分子の阻害が細胞核移動および細胞骨格動態に与える影響を調べることで神経細胞移動を制御する分子機構について検証を行なう。

(2) 細胞核と細胞骨格の相互作用を仲介する分子の探索およびその分子機構の解析

小脳 *in vivo* 電気穿孔法による遺伝子導入手法と RNAi ベクターによる遺伝子発現抑制法を組み合わせ、注目する遺伝子を生体マウス小脳内の神経細胞において発現抑制し神経細胞移動への影響を検討する。さらに効果が見られた遺伝子について、生細胞イメージングにより核移動の動態を詳細に観察する。候補遺伝子として Nesprin-1~4、SUN1~2、Emerin 等の核膜に局在する分子を想定する。Nesprin ファミリー分子は無脊椎動物から哺乳類まで高度に保存された KASH domain と呼ばれる配列を持つ。線虫(*C. elegans*)において同じく KASH domain を持つ分子である UNC-83 や zyg-12 は胚発生期における核移動に重要であることが知られており、Nesprin においても同様の機能が期待される。

4. 研究成果

(1) 移動中の神経細胞における微小管およびアクチン細胞骨格の生細胞イメージング

培養皿上を移動する小脳神経細胞に微小管結合タンパク質およびアクチン結合タンパク質と緑色蛍光タンパク質 (EGFP) との融合遺伝子を導入し各々の細胞骨格を明瞭に可視化することに成功した。さらに核局在型赤色蛍光タンパク質 (RFP) 遺伝子を併せて導入することで細胞骨格と細胞核形態を同時に標識しスピニングディスク型高速共焦点顕微鏡を用いて生細胞イメージングすることで、移動中の神経細胞における細胞骨格および細胞核の3次元像を15秒間隔というこれまでにない時間分解能でタイムラプス観察することに成功した (図1)。

この手法による観察の結果から、これまで報告されていないいくつかの特徴的な細胞骨格動態を見出している。微小管においては、これまでの微小管による核牽引モデルに基づく想定とは異なり、核周辺に存在している微小管が非常に動的に構造を変化させていることが明らかになった。また、アクチン骨格に関してはこれまでに細胞体の前方もしくは後方に集積することが報告されているが、それらとは異なり細胞体の中央付近において断続的な収縮を行っていることを見出した。さらに阻害剤を用いた実験から、このアクチン骨格の収縮が Rho/ROCK シグナル経路によって制御されていることを示唆する結果も得ている。

また、同時に行なった細胞核の高解像イメージングから細胞核が移動に伴って特徴的な変形や回転といった挙動を示すことを見出した (図2)。これらは核移動の際に核へと作用する力の分布を反映していると考えられる。

今後は細胞核ダイナミクスから核へ作用する力の推定およびその際の細胞骨格ダイナミクスとの相関を検討課題とし引き続き研究を行なう。

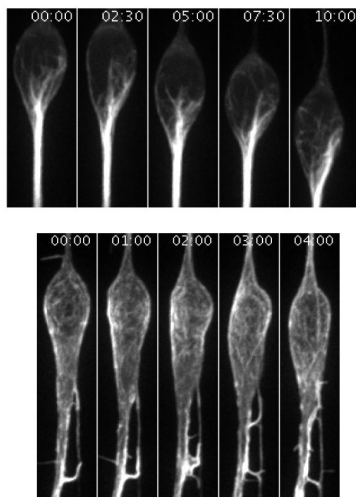


図1 微小管 (上) とアクチン骨格 (下)
上部の数字は経過時間を表す (分:秒)。

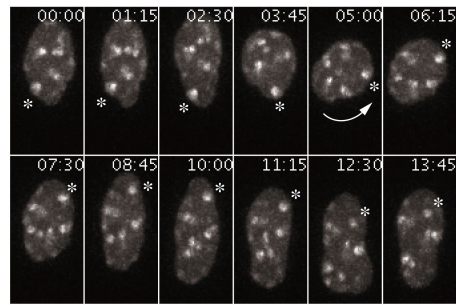


図2 核ダイナミクスのタイムラプス像 (右)

移動に伴う核の形態変化および回転が観察される。

アスタリスクは同一の speckle を表す。右上の数字は経過時間 (分:秒)

(2) 神経細胞移動に關与する核膜局在分子の探索

小脳 *in vivo* 電気穿孔法と RNAi 遺伝子発現抑制手法を用いて候補となる核膜局在分子をマウス生体内において発現抑制し神経細胞移動への影響を検討した。その結果、SUN1/2 の同時発現抑制により小脳を構成する神経細胞である小脳顆粒細胞の移動が顕著に攪乱されることを見出した。また、SUN1/2 と結合することが知られている Nesprin ファミリーの拮抗阻害型遺伝子の強制発現によっても同様に移動が攪乱された。さらにこれらの操作を行なった神経細胞を生体内に近い環境である小脳スライス培養系においてタイムラプス観察し核の移動に異常が見られることを確認した。その一方で、Nesprin ファミリーの構成分子である Nesprin1~4 を個別に発現抑制した場合には明瞭な結果は得られなかった。これは用いたベクターによる発現抑制の効率が不十分だった可能性も考えられるため、今後の検討課題とする。

(3) CDK5 は小脳顆粒細胞の接線移動と法線移動に差次的に作用する

本研究に用いた神経細胞である小脳顆粒細胞は生体内において接線移動と法線移動と呼ばれる異なる方向への移動を連続的に切り替えて目的地へと到達することが知られている。本研究の過程において細胞骨格系を広く制御する分子である CDK5 がこの接線移動と法線移動に差次的に作用することを見出した。

in vivo 小脳電気穿孔法により CDK5 の拮抗阻害型遺伝子を遺伝子導入し、生体内に近い環境を再現できる小脳スライス培養系において小脳顆粒細胞の接線移動および法線移動をタイムラプス観察した。その結果、接線移動においては移動をガイドする先導突起と呼ばれる神経突起の形態には影響はなく、細胞核移動の速度が若干低下するのみだった。それに対して、法線移動では先導突起の形態が著しく攪乱され核移動も顕著に阻害された。さらに CDK5 の阻害は法線移動において細胞核の前方移動のみならず微小管形成中心の前方移動をも阻害していることを見出

した。これまでに小脳顆粒細胞の接線移動と法線移動では先導突起の性質が異なることや足場となる基質が異なることが明らかになっており、本研究の成果は CDK5 がこのような移動様式特異的な分子機構に与与する可能性を示唆するものである。

本内容に関して Molecular and Cellular Neuroscience 誌において発表を行なった。

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1件)

Hiroki Umeshima and Mineko Kengaku, Differential roles of cyclin-dependent kinase 5 in tangential and radial migration of cerebellar granule cells, Molecular and Cellular Neuroscience, 52, 2013, pp. 62-72, 査読有, doi: 10.1016/j.mcn.2012.08.005

[学会発表](計3件)

梅嶋 宏樹、見学 美根子、Molecular mechanisms underlying nuclear movements in migrating cerebellar granule cells、第8回 iCeMS 国際シンポジウム "Meso-Control of Functional Architectures"、2010年11月、京都大学 芝蘭会館稲森ホール

梅嶋 宏樹、神経細胞移動における中心体と微小管骨格の役割、第3回中心体研究会 2011、2011年12月、東京理科大学 森戸記念会館

梅嶋 宏樹、吉川 修平、佐久間 臣耶、金子 真、見学 美根子、力学的視点から見た神経細胞の移動メカニズム、第7回神経発生討論会、2014年3月、大阪大学 銀杏会館

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅嶋 宏樹 (UMESHIMA, Hiroki)

研究者番号: 40525375