

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23700385

研究課題名（和文） 新生ニューロンの移動メカニズムと細胞間接着構造

研究課題名（英文） Cell adhesion mechanism of migrating new neurons

研究代表者

匹田 貴夫（HIKITA TAKAO）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00437005

研究成果の概要（和文）：成体脳内で移動する新生ニューロンは鎖状移動と呼ばれる特異な移動様式を示す。研究開始当初において、鎖状移動の分子基盤は不明であった。申請者はプロテオミクス的手法により、新生ニューロンの細胞膜に発現している接着分子の網羅的解析を行い、免疫染色により新生ニューロンの細胞間に濃縮する接着分子を同定した。また、本接着分子を制御するシグナル伝達経路に着目し、新生ニューロンの細胞間接着を亢進する薬剤を複数同定した。さらに、細胞間接着構造の制御に関与する Rho ファミリー低分子量 GTPase に着目し、新生ニューロンにおいて Rho および Rac の活性をライブイメージングによりモニターする系を確立した。以上の研究により、申請者らは成体脳内を移動する新生ニューロンの細胞間接着を担う分子、およびその制御シグナル経路の一部を明らかにした。本研究を発展させる事により、成体脳内において効率よく神経細胞を移動させる手法を確立し、脳卒中などの脳傷害時において傷害部へ新生ニューロンを効率よく供給する手法の確立に繋げたい。

研究成果の概要（英文）：New neurons migrating in the rostral migratory stream of postnatal brain shows specific fashion of collective cell migration, 'chain migration'. To clarify a molecular mechanism that control chain migration, we searched for cell-cell adhesion molecules that is expressed in new neurons, and identified two adhesion molecules. By using inhibitors, we identified signaling pathway that regulates localization of the adhesion molecules in new neurons. Furthermore, by using FRET-based biosensors, we observed an activation of Rho family small GTPases in the cell-cell contact site of new neurons. Further studies will be performed to establish a method to control migration and direction of new neurons in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：統合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：発生・発達・再生神経

1. 研究開始当初の背景
長らくの間、発生を終えた成体の脳内においては新しい神経細胞は作られないとされて

いた。しかしながら近年の研究により、成体脳内においても一部の領域には神経幹細胞が存在し、恒常的に新たなニューロン(新生ニ

ニューロン)を産生している事が明らかにされた。申請者らは脳室下帯において新生するニューロンに着目し研究を進めている。脳室下帯由来の新生ニューロンは高い移動性を持ち、産生された場所から遠く離れた嗅球へと100 $\mu\text{m}/\text{h}$ という非常に速い速度で移動した後、神経細胞へと成熟する。また、脳内を移動する際に、“chain(鎖)”と呼ばれる鎖状の細胞塊を形成し、“chain migration(鎖状移動)”と呼ばれる特異な様式により移動する事が知られている。研究開始当初において、新生ニューロンがどのような分子機構により鎖状移動を行なっているかは不明であった。

2. 研究の目的

申請者は、新生ニューロンは鎖状移動を可能にする分子メカニズムの解明を目的として研究を遂行した。具体的には (1)新生ニューロン間の接着を担う分子の同定。(2)接着分子の活性/局在を制御するシグナル伝達経路の同定。(3)同定した接着分子およびシグナル伝達分子の発現・活性をコントロールする事による鎖状移動の制御。を目的とした。これらの研究を遂行する事により鎖状移動の形成・解離のコントロールを可能にしたい。本研究により、脳梗塞などの脳障害時において効率的に新生ニューロンを供給する再生医療の発展に繋がると考える。

3. 研究の方法

申請者らは、まずプロテオミクス的手法により新生ニューロンの膜に濃縮するタンパク質の網羅的解析を実施した。具体的には、新生ニューロンを豊富に含む領域(rostral migratory stream, RMS)をマウス脳より切り出し、生化学的手法により膜タンパク質を抽出した後、質量分析装置により網羅的解析を実施し新生ニューロンの膜タンパク質デ

ータベースを構築した。

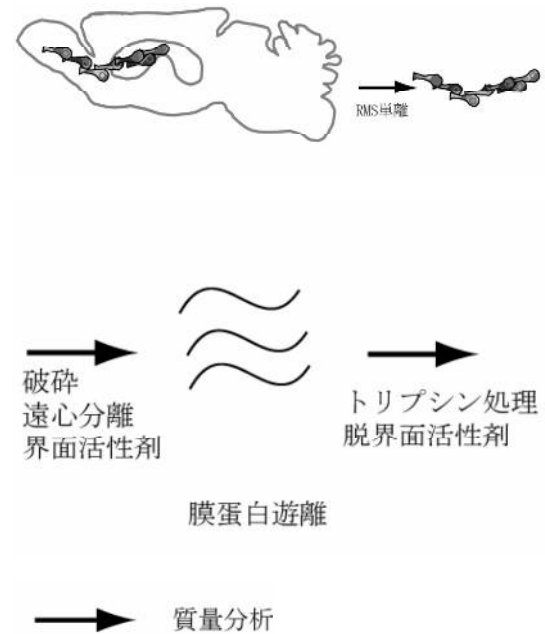


図1. 新生ニューロン膜タンパク質の網羅的解析

次に、得られたデータベースより細胞間接着に関与する可能性のある分子を抽出、免疫染色により新生ニューロン間への局在を確認した(図1)。さらに、同定した細胞間接着分子を制御するシグナル伝達経路に着目し、特異的阻害剤およびRNAiによる発現阻害実験により細胞間接着分子の鎖状塊形成への影響を検討した。

4. 研究成果

プロテオミクス的手法により新生ニューロンの膜タンパク質を網羅的に解析した結果、複数の受容体および接着分子を同定した。これらの分子について免疫染色を行い新生ニューロンの細胞間に濃縮する分子を探索した。その結果、新生ニューロンの細胞表面および細胞間に局在化する接着分子を同定した(図2)。本接着分子の局在化に関わるシグナル伝達経路の新生ニューロンの鎖状塊の形成における機能を阻害剤実験により検討

した。その結果、阻害剤処理により新生ニューロンの鎖状塊形成が促進する事が明らかになった。また、阻害剤処理により今回同定した接着分子が細胞間に強く濃縮することを見出した(図2, 薬剤A)。

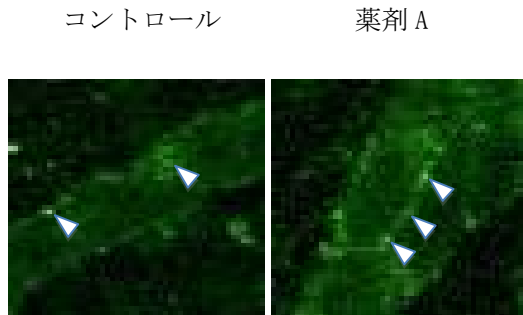


図 2. 新生ニューロン表面に局在化するタンパク質とその制御シグナルの解析

矢頭: 本研究にて同定した膜タンパク質のシグナル

次に、本研究により同定した接着分子とその制御シグナルの関係をより詳細に解析する目的で、細胞の形態、移動、接着を制御する低分子量 GTPase である Rac1 および RhoA の活性を新生ニューロンにおいてライブイメージングによりモニターする系を確立した(図3)。

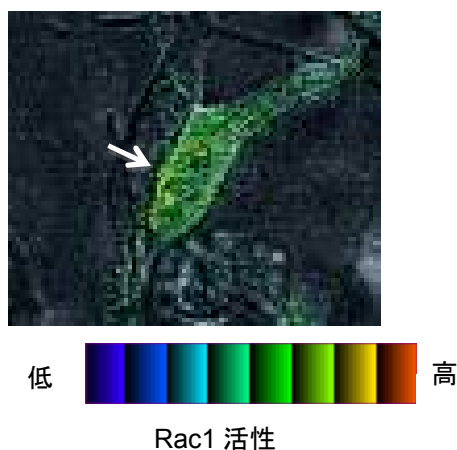


図 3. 新生ニューロンにおける Rac1 活性のライブイメージング

本実験は京都大学の松田道行教授より提供を受けた FRET バイオセンサーを用いた系であり、生きた細胞内での低分子量 GTPase の活性を時空間的に観察する事が可能である。申請者らは、鎖状移動する新生ニューロンの細胞間では Rac1 の活性が生じている事を見出した(図3)。本研究により同定した膜タンパク質と赤色蛍光蛋白質との融合タンパク質と本プローブを同時に発現させた細胞を観察する事により、Rac および RhoA の活性化と膜タンパク質の局在化と鎖状移動の関係を明らかにする予定である。

以上の研究により、成体脳内における新生ニューロンの細胞間接着を担う分子とその制御シグナルの一端が明らかになった。今後は脳内において新生ニューロンが移動する際に足場となる細胞/基質との相互作用と移動への影響を解明する。本研究をさらに発展させる事により、成体脳内において効率よく神経細胞を移動させる手法を確立し、脳卒中などの傷害時において傷害部へ新生ニューロンを効率よく供給する手法の確立に繋げたい。

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)

[学会発表] (計2件)

①成体脳内を移動するニューロンの Rac1 活性: FRET バイオセンサーを用いた時空間的解析

匹田貴夫, 大野彰久, 澤田雅人, 澤本和延
第35回日本分子生物学会年会 (口頭発表)
2012年12月11日-14日, 福岡県福岡市

②Functions and spatiotemporal activation patterns of Rho family GTPases in living

new neurons migrating in the postnatal
mouse brain.

匹田貴夫, 大野彰久, 澤田雅人, 太田晴子,
松田道行, 澤本和延

第45回発生生物学会・第64回細胞生物学会合
同大会 (口頭発表)

2012年5月28日-31日

兵庫県神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

匹田 貴夫 (HIKITA TAKAO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号 : 00437005