

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500392

研究課題名(和文) テレンセファリン依存的な神経細胞による死細胞のクリアランス機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of telencephalin-dependent neuronal clearance for apoptotic cells

研究代表者

古谷 裕 (Yutaka, Furutani)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：80392108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞死を起こした細胞を神経細胞がクリアランスすると考え、この機構を検証した。神経細胞にアポトーシスを誘導するとビトロネクチンが結合する。この死細胞断片を培養海馬神経細胞に加えるとテレンセファリンの発現に依存して結合し、テレンセファリンの集積を誘導することを示した。また、死細胞を模倣したビトロネクチンコート磁性ビーズを加え細胞膜突起構造を形成させ、これをビーズと共に精製した。このビーズ結合画分を網羅的に解析した結果、ファゴサイトーシス関連因子が含まれていた。このことから、死細胞表面のビトロネクチンが神経細胞に発現するテレンセファリンにより認識され、クリアランスを調整していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：I hypothesize that dead cells could be phagocytosed by neurons as a clearance mechanism in the brain. After induction of apoptosis, vitronectin bound to plasma membrane of cultured hippocampal neurons. Fragments of apoptotic cells interacted with neurons in a telencephalin-dependent manner and induced telencephalin accumulation. Vitronectin-coated magnetic beads used as an imitation of dead cells enhanced formation of phagocytic membrane protrusions on cultured hippocampal neurons and were collected with the membrane using a magnet apparatus. The beads-binding proteins were comprehensively analyzed by a mass spectroscopy. In this fraction, several proteins worked in phagocytosis were present. Thus, vitronectin bound to a surface of dead cells appears to be recognized by telencephalin and regulate a clearance of dead cells.

研究分野：神経生化学

キーワード：細胞接着分子 細胞外マトリックス 細胞死 ファゴサイトーシス テレンセファリン

1. 研究開始当初の背景

テレンセファリンは終脳神経細胞に特異的に発現する細胞接着分子で、1987年に森憲作によりモノクローナル抗体 271A6 が抗原として認識する分子として発見され (PNAS 84: 3921, 1987)、1994年に吉原良浩がこの抗体により認識される分子を精製・クローニングすることによりテレンセファリンの構造が同定された (Neuron 12: 541, 1994)。この発表より国内外の研究チームがテレンセファリンに興味をもち研究を進めてきている。2006年に松野仁美らによりテレンセファリンはスパインの前駆体である樹状突起フィロポディアの形成を制御していることを明らかにした (J. Neurosci. 26: 1776, 2006)。そして、私たちはテレンセファリンが細胞内で Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) 蛋白質と相互作用することにより樹状突起フィロポディアの形成を促進していることを明らかにした (J. Neurosci. 27: 8866, 2007)。さらに、テレンセファリンは細胞外マトリックス蛋白質ビトロネクチンと強く結合することを示した。ビトロネクチンコートしたビーズを培養海馬神経細胞に撒くと樹状突起に結合しテレンセファリン激しい集積が起こることを見出した。このビトロネクチンにより誘導されたテレンセファリンの集積には ERM 蛋白質、PI(4,5)P₂、F-アクチンなど樹状突起フィロポディアの形成に関与する分子も集積していることが分かった (J. Biol. Chem. 287: 3904, 2012)。このことから、樹状突起フィロポディア形成とファゴサイトーシス様の細胞膜突出構造の形成に働く分子には相同性があることが明らかとなった。

2. 研究の目的

これまで一般的に脳内でアポトーシスした細胞をミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞がファゴサイトーシスして脳内を正常な状態に保っているものと考えられていた。しかし、アポトーシスした新生神経細胞のクリアランスにおいてはミクログリアの活性化は観察されていなかった。Luら

はダブルコレクチン陽性神経前駆細胞がアポトーシスした新生神経細胞をファゴサイトーシスすることを報告している (Nature Cell Biol. 13: 1076, 2011)。新生神経細胞は脳室下帯と顆粒細胞層下部で作られており、嗅球と海馬歯状回で神経回路に組み込まれるかアポトーシスをして排除されていく。そして、テレンセファリンは嗅球や海馬歯状回で強く発現しており、テレンセファリンと結合するビトロネクチンはアポトーシスした細胞の表面マーカーであるホスファチジルセリンに結合することが知られている。このことからビトロネクチンは死細胞に結合しテレンセファリンに認識されファゴサイトーシスを誘導すると考えられた。この研究課題ではテレンセファリン依存的な神経細胞による死細胞のファゴサイトーシスの分子機構を明らかにし、さらにこのファゴサイトーシスの終脳における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

テレンセファリン依存的な死細胞のクリアランス機構が存在するのか調べるために以下の実験を行った。

(1) アポトーシスを誘導した神経細胞へのビトロネクチン結合実験

後期アポトーシスを誘導した細胞ではビトロネクチンが細胞膜のホスファチジルセリンに結合することが報告されていた。そこで、培養海馬神経細胞でも UV 照射によりアポトーシスを誘導するとビトロネクチンが結合するか、抗体染色により示した。

(2) テレンセファリン依存的死細胞のファゴサイトーシス機構の解析

培養海馬神経細胞に UV を照射し、アポトーシスを誘導した。この細胞断片を蛍光ラベルし、培養海馬神経細胞に撒き、ビトロネクチンの死細胞断片への結合を確認し、ビトロネクチンコートビーズと同様に死細胞断片もテレンセファリンの集積を誘導し、ファゴサイトーシスされるか解析した。また、死細胞

断片の神経細胞への相互作用に関してテレンセファリン依存性をテレンセファリン欠損培養海馬神経細胞を用いて確認した。

(3) タイムラプス解析による死細胞断片の培養海馬神経細胞への結合可視化

ビトロネクチンコートビーズを培養海馬神経細胞に加えると樹状突起フィロポディアに結合しテレンセファリンの集積を伴いながらシャフトへと移動し、ファゴサイトーシス様の細胞膜突出構造を作る (図1)。この

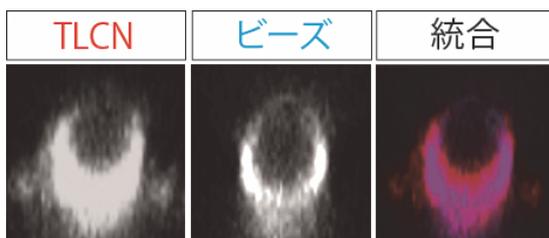


図1、ビトロネクチンコートビーズによるファゴサイトーシス様の膜突出構造の形成。テレンセファリン(TLCN)はビーズの周りに突起構造の形成と共に集積する。

構造にはフィロポディアに局在する活性化型ERM蛋白質やF-アクチンやPI(4,5)P₂を含んでいた。このことからファゴサイトーシス様の細胞膜突出構造の形成とフィロポディア形成には相同性があると考えられた。本研究課題で私はいくつものフィロポディア様の突起が神経細胞より伸び死細胞をファゴサイトーシスすると考えた。これを示すために、テレンセファリン細胞内領域にGFPを融合した組換え蛋白質を発現させた培養海馬神経細胞に、蛍光標識した死細胞断片を加え3次元タイムラプス解析を行った。

(4) 死細胞を模倣したビトロネクチンコートビーズを用いたファゴサイトーシス分子機構の同定

死細胞の神経細胞によるファゴサイトーシスの分子機構を解明するために、死細胞を模倣したビトロネクチンコートされた磁性ビーズを培養海馬神経細胞に撒き、テレンセファリンの集積を含むファゴサイトーシス様細胞膜突出構造の形成を誘導した。この細胞を低濃度の界面活性剤入りの溶液で処理す

ることにより、磁性ビーズの周りに形成されている細胞膜突出構造を磁石により回収した。このビーズ結合画分を SDS-PAGE 電気泳動により分離し (図2)、質量分析により網羅的に結合画分に含まれている蛋白質を同定した。

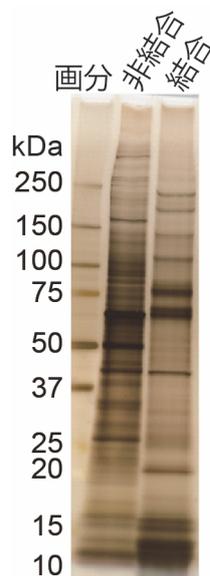


図2、ファゴサイトーシス様の膜突出構造の網羅的解析。ビトロネクチンによりコートされたビーズを培養海馬神経細胞に撒き、ビーズ非結合画分と結合画分を分離し電気泳動により比較した。

(5) 神経細胞を疎らに蛍光ラベルしたテレンセファリン欠損マウスと野生型マウスの作製

In vivo でテレンセファリン依存的な死細胞のファゴサイトーシスが起るのか明らかにするために、Thy-1 プロモーター下で GFP を発現するトランスジェニックマウスとテレンセファリン欠損マウスを掛け合わせ、テレンセファリン欠損/Thy-1 GFP マウスを作製した。このマウス脳切片を抗 GFP 抗体で抗体染色し、神経細胞の可視化を行った。

4. 研究成果

(1) アポトーシスを誘導した神経細胞へのビトロネクチン結合解析

培養海馬神経細胞に UV 照射シアポトーシスを誘導した。この細胞をビトロネクチン特異的な抗体で染色を行うとビトロネクチン陽性細胞または細胞断片が増加することが明らかとなった。

(2) テレンセファリン依存的死細胞のファゴサイトーシス機構の解析

アポトーシスを誘導した神経細胞の断片を蛍光ラベルし、培養海馬神経細胞に撒くと主に樹状突起に結合しテレンセファリンの集積を誘導することを示した (図 3)。また、テ

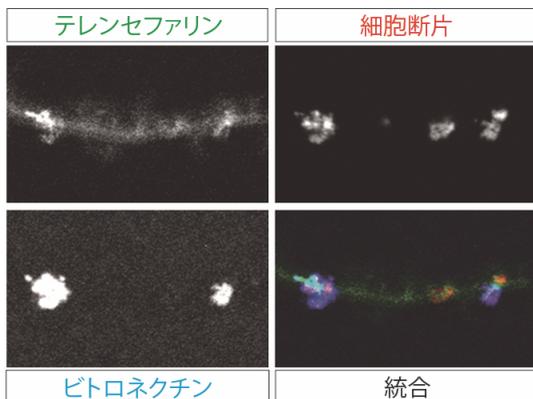


図 3、死細胞断片へのテレンセファリンの集積。蛍光ラベルした死細胞断片を培養海馬神経細胞に撒くと、樹状突起に結合しビトロネクチン陽性の断片にテレンセファリンが集積する。

レンセファリン欠損培養海馬神経細胞にアポトーシスした細胞の断片を撒いても特異的な結合は観られず、死細胞断片はテレンセファリンの発現に依存して培養海馬神経細胞に結合することが分かった (図 4)。

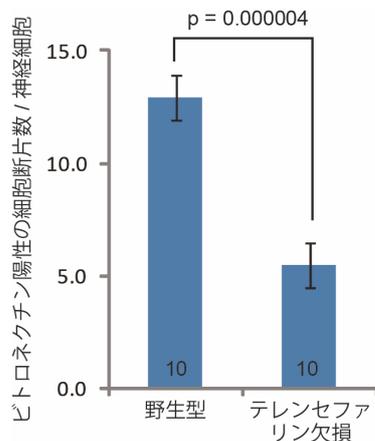


図 4、テレンセファリン依存的な細胞断片の結合。ビトロネクチン陽性細胞断片はテレンセファリン依存的に培養海馬神経細胞に結合する。

(3) タイムラプス解析による死細胞断片の培養海馬神経細胞への結合可視化

どのように神経細胞が死細胞断片を取り込むのか明らかにするために、死細胞断片を蛍光ラベルし、GFP 融合テレンセファリンを発

現する培養海馬神経細胞に加えタイムラプス解析を行った。その結果、死細胞断片と神経細胞の樹状突起との接着面にテレンセファリンは集積してきたが、死細胞断片を取り囲むファゴサイトーシス様の突起形成は観察できなかった。

(4) 死細胞を模倣したビトロネクチンコートビーズを用いたファゴサイトーシス分子機構の同定

神経細胞によるファゴサイトーシスの分子機構を明らかにするために、ビトロネクチンによりコートされたマイクロビーズを用いて培養海馬神経細胞上にファゴサイトーシス様のカップ構造を形成させ、このビーズに結合する蛋白質を質量分析により網羅的に解析した。テレンセファリンの発現に依存してビーズに結合する蛋白質を同定し、その中にファゴサイトーシスに関連する分子として G-蛋白質、ホスファチジルイノシトールのリン酸化制御分子、アクチン骨格形成制御分子が含まれていた (図 5)。このことからビトロネクチンが結合したビーズはテレンセファリンや 7 回膜貫通型受容体により認識され、ホスファチジルイノシトールのリン酸化を調節することによりアクチンの重合を促進しファゴサイトーシス様の細胞膜突起構造を形成していることが示唆された。

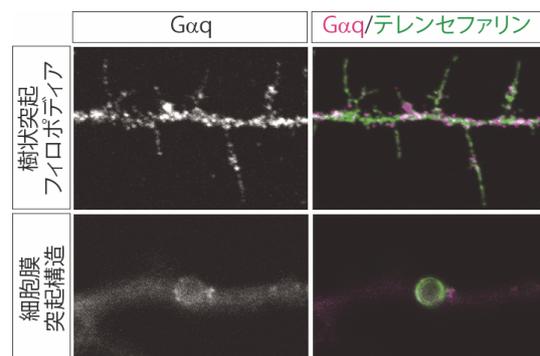


図 5、ビーズ結合画分から同定した蛋白質の局在。ファゴサイトーシス様の膜突起構造から精製したビーズ結合画分に含まれる蛋白質の 1 つである Gαq の樹状突起フィロポディア (上) と細胞膜突起構造 (下) における抗体染色による局在解析。

(5) テレンセファリン欠損マウスにおける神経細胞可視化

海馬や大脳皮質で GFP を疎らに発現する Thy-1 GFP トランスジェニックマウスとテレンセファリン欠損マウスとを掛け合わせて、テレンセファリン欠損マウスの神経細胞を GFP でラベルし形態を可視化した。このように in vivo でテレンセファリン依存的なファゴサイトーシスを識別するためのコントロールとなるマウスを作製した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① H. Tatsukawa, Y. Furutani, K. Hitomi, S. Kojima “Transglutaminase 2 plays opposing roles in the regulation of cellular functions as well as cell growth and death” **Cell Death & Disease** (2016) 7: e2244; DOI:10.1038/cddis.2016.150 査読有

② 古谷 裕 「シナプス可塑性」 **分子精神医学** 14: 41-43 (2014) 先端医学社 査読無

③ 古谷 裕、吉原良浩「細胞接着分子」 **脳科学辞典** (2013) DOI : 10.14931/bsd.2329 編集委員長：田中啓治、御子柴克彦 担当編集委員：大隅典子 査読有

④ 古谷 裕、吉原良浩「免疫グロブリンスーパーファミリー」 **脳科学辞典** (2012) DOI : 10.14931/bsd.3362 担当編集委員：柚崎通介 査読有

⑤ Y. Furutani, M. Kawasaki, H. Matsuno, S. Mitsui, K. Mori, Y. Yoshihara “Vitronectin Induces Phosphorylation of Ezrin/Radixin/Moesin Actin-binding Proteins through Binding to its Novel Neuronal Receptor Telencephalin” **J. Biol. Chem.** 287:39041-39049 (2012) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

① Y. Furutani, Y. Yoshihara “Proteomic Analysis of Dendritic Filopodia” **EMBO Conference, Brain Development and Disorders**, September 6, 2014, La Ciota, France

② 古谷 裕、吉原良浩
「樹状突起フィロポディアのプロテオミクス解析」 **第6回神経発生討論会** 2013年3月14日 理化学研究所(埼玉県・和光市)

③ Y. Furutani, Y. Yoshihara “Comprehensive Proteomic Analysis of Dendritic Filopodia” **The 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience**, October 16, 2012, New Orleans, USA

④ Y. Mori, T. Matsui, Y. Furutani, Y. Yoshihara, M. Fukuda “Small GTPase Rab17 regulates the dendritic morphogenesis and postsynaptic development of hippocampal neurons.” **Joint Meeting of BSCB / BSDB / JSDB Spring Conference**, April 17, 2012, Coventry, UK

[図書] (計 1 件)

① Y. Furutani, S. Kojima “Control of TG functions depending on their localization” **Transglutaminases: Multiple functional modifiers and targets for new drug discovery**. Springer Japan, Chapter2, (2016) 391 (43-62) DOI : 10.1007/978-4-431-55825-5_2 (Editors; K. Hitomi S. Kojima, and L. Fesus)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古谷 裕 (FURUTANI, Yutaka)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員
研究者番号：80392108