

令和元年6月21日現在

機関番号：84503

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26290015

研究課題名(和文) 大脳皮質形成におけるエンドサイトーシス経路の「使い分け」の生理的意義と制御機構

研究課題名(英文) Differential roles of endocytic pathways in cortical development

研究代表者

川内 健史 (Kawauchi, Takeshi)

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・研究員(上席・主任研究員クラス)

研究者番号：60397544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の大脳皮質形成において、神経細胞は多段階の移動を行うが、その制御機構の全体像は未解明な点が多い。近年我々は、神経細胞移動におけるエンドサイトーシス経路の重要性を報告したが(Neuron 2010)、エンドサイトーシスは、形態的に複数に分類されるため、その生理的役割は未解明な点が多い。本研究では、多段階の神経細胞移動において、クラスリン非依存性エンドサイトーシスによる細胞接着分子の制御、低分子量Gタンパク質Rab5を介したエンドサイトーシス経路などが、それぞれ異なる移動段階を制御することを見出し、多段階の神経細胞移動におけるエンドサイトーシス経路の使い分け機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質形成における多段階の神経細胞移動は、哺乳類に特徴的な6層構造の形成に必須な発生段階である。さらに近年、神経細胞は移動中に成熟することも明らかになっており、その制御機構の解明は脳形成の基礎的な理解に重要である。また、神経細胞移動は、滑脳症などの脳奇形、失読症や自閉症などの高次脳機能疾患にも関与する可能性が示唆されていることから、本研究は医学的にも重要性が高い。このような神経科学・発生生物学的な重要性に加えて、本研究は生理的な役割が疑問視されていたクラスリン非依存性エンドサイトーシスの機能を個体レベルで明らかにしており、分子細胞生物学分野にも大きく貢献したと考える。

研究成果の概要(英文)：During cerebral cortical development, immature neurons show multi-step mode of migration. It was reported that the neuronal migration is associated with several neurological disorders, such as lissencephaly and dyslexia. While we and others have revealed that cytoskeletal regulation plays important roles in the neuronal migration, our recent study has indicated that endocytic pathways are also important. In this study, we have analyzed the "role-allocation" of various types of endocytosis in the neuronal migration. We show here that clathrin-independent endocytosis promotes the N-cadherin internalization, which regulates the immature neurite pruning, an essential step of the multipolar-to-bipolar transition of migrating neurons. The bipolar-shaped neurons undergo the long-distance migration, which is shown to be controlled by Dynamin- and Rab5-dependent endocytic pathways. Thus, our findings show that different endocytic machineries regulate the multi-step neuronal migration.

研究分野：分子神経科学

キーワード：エンドサイトーシス 脳・神経 カドヘリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質形成において、神経細胞は多段階の移動を行うが、その制御機構の全体像は未解明な点が多い。これまでに我々は、神経細胞移動における細胞骨格制御の重要性を明らかにしてきたが (EMBO J 2003; BBRC 2005; J Neurosci 2005; Nature Cell Biol 2006; Dev Neurosci 2008) 細胞骨格の再編成だけでは細胞の複雑な形態変化や接着性の変化を十分に説明できない。近年我々は、エンドサイトーシス経路の1つが神経細胞移動の特定の段階のみに関与することを報告し、脳形成における細胞内輸送の重要性が示唆された (Neuron 2010)。しかし、エンドサイトーシスは複数に分類される複雑な過程であり、それらの生理的役割についてはほとんど分かっていないのが現状である。そこで本研究では、ほ乳類の大脳皮質形成、特に多段階の神経細胞移動において、様々なエンドサイトーシスおよびエンドサイトーシス経路がどのように使い分けられているのかを個体レベルで解析することにより、多段階の神経細胞移動の制御メカニズムの全体像を理解すること、さらに、多岐にわたるエンドサイトーシスおよびエンドサイトーシス経路が個体の中でどのように使い分けられているのか、その生理的な意義を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

大脳皮質形成における多段階の神経細胞移動のうち、多極性細胞の形成、多極性から双極性への変換、放射状突起に沿ったロコモーション移動、に着目し、これらの移動や形態変化に関わるエンドサイトーシス経路を同定し、それらの分子的な使い分けを明らかにすることを目的とした。具体的な目的を以下に示す。

(1) 多段階の神経細胞移動のうち、移動距離の大半を占める「ロコモーション移動」に関わるエンドサイトーシス経路を同定することを目的として解析を行った。

(2) 多極性細胞から双極性細胞への変換 (multipolar-to-bipolar transition) は移動のみならず神経成熟においても重要な段階であり、この異常は多くの脳疾患と関連することが知られている。この変換には、複数の未成熟突起の退縮と1本の先導突起の形成という2つの大きな形態変化が必要である。これまでに我々は、先導突起の形成に関わる分子を報告してきたが (EMBO J 2003; Nature Cell Biol 2006) 未成熟突起の退縮機構は未解明であった。突起の退縮には、膜の取り込みが必要であることから、この過程に関わるエンドサイトーシス経路の同定を試みた。

(3) 未成熟突起の伸長には、細胞周期関連分子 p27 を介したアクチン細胞骨格の再編成が重要であることを以前に報告しているが (Nature Cell Biol 2006) p27 は細胞内にドット状の局在も示すことから、何らかの膜輸送系にも関わる可能性が示唆されたため、この点について検討した。

3. 研究の方法

(1) ロコモーション移動は、移動の大半を占める最も主要な移動段階であるが、ロコモーション移動が始まる前に多くの形態変化が起きるため、その影響を排してロコモーション移動を解析することは困難であった。我々は、*In vivo* エレクトロポレーション法、組織スライス培養法、タイムラプス観察、薬剤スクリーニングを組み合わせることで、ロコモーション移動を直接解析できる実験系として *Ex vivo* 薬剤スクリーニング法を確立したことから (J Biol Chem 2010) この *Ex vivo* 薬剤スクリーニング法を応用して、ロコモーション移動に関わる分子を探索した。

(2) 多極性細胞から双極性細胞への変換は、分散培養した神経細胞ではほとんど観察されないことから、*In vivo* エレクトロポレーション法を用いて胎生 14 日目に遺伝子導入した胚を用いて、個体レベルの解析を行った。

(3) 未成熟突起の形成は初代培養神経細胞でも観察できることから、胎生 15 日目の発生期大脳皮質から作成した初代培養神経細胞を用いて p27 と膜小胞/オルガネラとの関連を解析した。

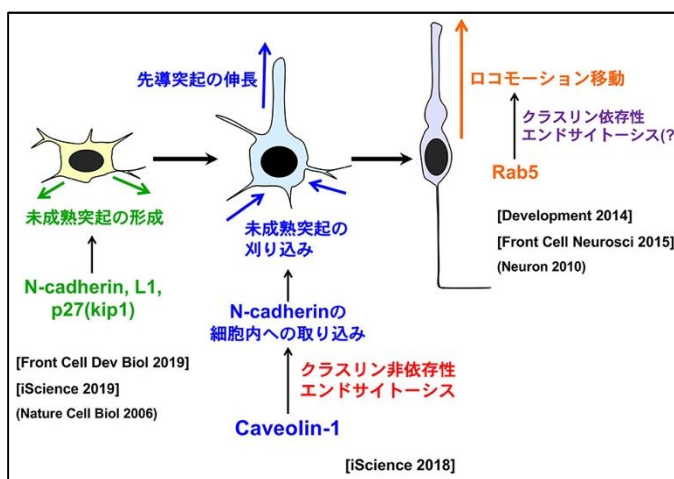
4. 研究成果

(1) Dynamin は多くのタイプのエンドサイトーシスに関与することが知られている。しかし、*In vivo* エレクトロポレーション法を用いて Dynamin の機能阻害を行うと、遺伝子導入の3日後には細胞死が誘導されたことから (Neuron 2010) ロコモーション移動における役割を解析することができなかった。そこで本研究では、*ex vivo* 薬剤スクリーニング法を用いて解析を行った。胎生 14 日目に GFP 発現ベクターを導入したマウス脳を、胎生 16 日目に組織スライスにして、タイムラプス観察を行った。インターナルコントロールとしてロコモーション移動を行う神経細胞を経時的に観察した後、Dynamin の阻害剤 Dynasore を倍地中に添加し、引き続きタイムラプス観察を行った。その結果、Dynasore 添加後にロコモーション移動細胞の核移動速度が低下した。また、ロコモーション移動に重要であることが示唆されている「先導突起の根元に形成される特殊な膨らみ」も消失した。このことから、神経細胞のロコモーション型長距離移動には、Dynamin 依存性エンドサイトーシスが必要であることが分かった。

Dynamin と異なり、低分子量 G タンパク質 Rab5 の機能を抑制しても、神経細胞死は引き起こされない。そこで、組織スライスのタイムラプス観察実験により、Rab5 をロックダウンした神経細胞の移動速度や形態変化を解析した。その結果、Rab5 の発現抑制によりロコモーション移動の速度が抑制され、先端突起の根元の特徴的な膨らみの形成も抑制されることが分かった。以上の結果より、神経細胞移動の大半を占めるロコモーション移動には、Dynamin および Rab5 依存性のエンドサイトーシス経路が重要であることが示された (Development 2014 [発表論文 7], Front Cell Neurosci 2015 [発表論文 6], Brain Sci 2017 [発表論文 5])。

(2) 培養条件下では、神経細胞はまず複数の未成熟突起を伸長して多極性になった後、未成熟突起をそのまま樹状突起に変化させるが、発生期の大脳皮質ではこれらの未成熟突起は刈り込まれ、代わりに 1 本の太い先端突起が形成される。さらに、この多極性から双極性への形態変化は、多くの脳疾患と関連が深いことが報告されている重要な段階である。我々は、未成熟突起の退縮に関わる分子を探索し、カベオラの構成因子である Caveolin-1 が重要な役割を果たすことを明らかにした。神経細胞にはカベオラが存在しないと考えられているが、Caveolin-1 は多極性から双極性への形態変化が起きる領域で強く発現していることを見出した。さらに、未成熟突起の形成/維持には、細胞接着分子 N-カドヘリンおよび L1 が必要であり、Caveolin-1 を介したクラスリン非依存性エンドサイトーシスにより N-カドヘリンと L1 を細胞表面から取り除かれることが、未成熟突起の退縮に必要であることを明らかにした (iScience 2018 [発表論文 2], Histol Histopathol 2018 [発表論文 3])。

これまでの培養細胞を用いた研究から、クラスリン非依存性エンドサイトーシスは人為的なものではないかという議論が続いていたが、本研究により、基底状態の培養細胞とは異なり、個体ではエンドサイトーシスのタイプは時空間的に厳密に制御されていることが示唆され、個体における神経成熟過程では、クラスリン依存性 (Neuron 2010, Development 2014 [発表論文 7])、クラスリン非依存性 (iScience 2018 [発表論文 2]) の両方を巧みに使い分けることにより、*in vivo* 特異的な神経形態を創り出していることが分かった。



(3) これまでに我々は、未成熟突起の伸長には、細胞周期関連分子 p27 を介したアクチン細胞骨格の再編成が重要であることを報告しているが、p27 は細胞内にドット状の局在を示すことから、膜輸送との関連も示唆される。そこで本研究では、p27 と様々なエンドソーム/オルガネラとの関連を解析した。他の研究グループにより、p27 が後期エンドソームに局在するという結果が報告されていたが、少なくとも神経細胞では、p27 と後期エンドソームのマーカーである Rab7 や LAMTOR1 との共局在率は非常に低いことが分かった。そこで、他のエンドソームマーカーとの共局在を解析したが、p27 は初期エンドソーム、リサイクリングエンドソームなどにもあまり局在しなかった。しかし、p27 は部分的にゴルジ体のマーカーおよび微小管と共局在することを見出した。今後、p27 とゴルジ体を介した分泌経路との関連について解析を続けていく予定である (Front Cell Dev Biol 2019 [発表論文 1])。

5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 7 件)

1: Kawauchi T, Nabeshima YI. Growth Arrest Triggers Extra-Cell Cycle Regulatory Function in Neurons: Possible Involvement of p27(kip1) in Membrane Trafficking as Well as Cytoskeletal Regulation. Front Cell Dev Biol. 2019 Apr 26;7:64.
doi:10.3389/fcell.2019.00064.

2: Shikanai M, Nishimura YV, Sakurai M, Nabeshima YI, Yuzaki M, Kawauchi T. Caveolin-1 Promotes Early Neuronal Maturation via Caveolae-Independent Trafficking of N-Cadherin and L1. iScience. 2018 Sep 28;7:53-67.
doi:10.1016/j.isci.2018.08.014.

- 3: Shikanai M, Yuzaki M, Kawauchi T. Rab family small GTPases-mediated regulation of intracellular logistics in neural development. *Histol Histopathol*. 2018 Aug;33(8):765-771.
doi: 10.14670/HH-11-956.
- 4: Kawauchi T. Tubulin isotype specificity in neuronal migration: Tuba8 can't fill in for Tuba1a. *J Cell Biol*. 2017 Aug 7;216(8):2247-2249.
doi:10.1083/jcb.201705172.
- 5: Nishimura YV, Nabeshima YI, Kawauchi T. Morphological and Molecular Basis of Cytoplasmic Dilation and Swelling in Cortical Migrating Neurons. *Brain Sci*. 2017 Jul 19;7(7). pii: E87.
doi: 10.3390/brainsci7070087.
- 6: Kawauchi T. Cellular insights into cerebral cortical development: focusing on the locomotion mode of neuronal migration. *Front Cell Neurosci*. 2015 Oct 7;9:394.
doi: 10.3389/fncel.2015.00394.
- 7: Nishimura YV, Shikanai M, Hoshino M, Ohshima T, Nabeshima Y, Mizutani K, Nagata K, Nakajima K, Kawauchi T. Cdk5 and its substrates, Dcx and p27kip1, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons. *Development*. 2014 Sep;141(18):3540-50.
doi: 10.1242/dev.111294.

〔学会発表〕(計20件)

川内健史 “神経成熟の初期段階におけるカベオラ非依存的な Caveolin-1 の役割” 蛋白研セミナー「高次脳機能の神経回路機構」、大阪大学蛋白質研究所、大阪、2018年11月26-27日

川内健史 “脳領域特異的な神経成熟の制御機構 -膜動態を介した細胞接着の制御-” 第1回 これからの神経回路研究会、大阪大学、大阪、2018年1月26-27日

川内健史 “細胞膜および細胞内の機能ドメインが神経細胞の移動と成熟を制御する機構” 第4回 包括的神経グリア研究会、熊本大学、熊本、2018年1月6-7日

Takeshi Kawauchi, Mima Shikanai, Yoshiaki V. Nishimura, Miwa Sakurai, Mitsunori Fukuda, Yo-ichi Nabeshima, Michisuke Yuzaki. “Clathrin-independent endocytosis regulates neuronal maturation and migration” ISDN 2018, Nara, Japan. May 22-25, 2018.

川内健史 “脳内で神経細胞が正しく配置される仕組み” 福井大学医学部、福井、2017年6月29日

川内健史 “複数のエンドサイトーシス経路による多段階の神経細胞移動および神経成熟の制御機構” シンポジウム“形態形成における細胞および細胞内の再編成 -がん・発生・神経におけるその過程-”、第69回日本細胞生物学会大会、仙台国際センター、宮城県仙台市、2017年6月13-15日

川内健史 “分子細胞レベルからみた脳の作られ方” 神戸薬科大学、神戸、2016年12月6日

川内健史 “大脳皮質形成におけるカベオリンを介した細胞接着分子の動態制御” シンポジウム“膜動態を介した細胞間・細胞外環境との相互作用の制御”、第89回日本生化学会大会、仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス、宮城県仙台市、2016年9月25-27日

鹿内弥磨、鍋島陽一、柚崎通介、川内健史 “クラスリン非依存性エンドサイトーシス経路による神経成熟の制御機構” 第63回 日本生化学会近畿支部例会、神戸薬科大学、神戸、2016年5月21日

川内健史 “ Rab5サブファミリーによる多段階の神経細胞移動の制御機構 ” 第3回 包括的神経グリア研究会、熱海、2016年1月9-11日

Takeshi Kawauchi “ Molecular and cellular mechanisms for cortical neuronal migration ” The 7th Research Conference of Developmental Neurobiologists in South Korea, Chuncheon, Korea. December 18-19, 2015.

川内健史 “ 増殖停止した神経細胞における細胞周期関連分子の新機能 ” 国立精神・神経医療研究センター、小平、東京、2015年9月15日

Takeshi Kawauchi “ Introduction: Creation of brain structure and function ” 第38回日本神経科学大会 (Neuroscience2015)、Symposium “ Creation of brain structure and function -From cellular interaction to social interaction and environmental factors- ”、神戸、2015年7月28-31日

川内健史 “ 発生期の脳皮質におけるカベオリンによる神経細胞の移動と形態変化の制御機構 ” ワークショップ “ メンブレントラフィック分子から個体まで ”、第67回日本細胞生物学会大会、タワーホール船堀、東京、2015年6月30日-7月2日

川内健史 “ 脳皮質形成におけるロコモーション様式の移動の制御メカニズム ” 第6回 Gタンパク質Meeting、九州大学薬学部、福岡、2015年3月14-15日

川内健史 “ 脳皮質形成におけるエンドサイトーシスの生理機能 ” 第2回 包括的神経グリア研究会、オースプラザ、愛知県名古屋市、2015年1月10-11日

川内健史 “ エンドサイトーシスを介した細胞間相互作用の制御が脳皮質形成に果たす役割 ” 平成26年度奈良先端未来開拓コロキウム、奈良先端科学技術大学院大学、2014年12月18-19日

西村嘉晃、鹿内弥磨、星野幹雄、大島登志男、鍋島陽一、水谷健一、永田浩一、仲嶋一範、川内健史 “ Cdk5 は移動神経細胞に特異的な"dilation"の形成と核の形態変化を制御する ” 第36回日本生物的精神医学会・第57回日本神経化学学会大会 合同大会、一般口演「細胞機能制御」、奈良県文化会館・奈良県新公会堂、奈良、2014年9月29日-10月1日

Takeshi Kawauchi “ Cortical neuronal migration and its related diseases ” 第37回日本神経科学大会 (Neuroscience2014)、Symposium “ Between neurodevelopmental disorders and normal brain formation: Focusing on neuronal differentiation and migration as key milestones ”、横浜、2014年9月11-13日

川内健史 “ 脳皮質形成における細胞接着分子の動態制御機構 ” シンポジウム “ 細胞外環境コミュニケーションを介した形態形成とその維持 -神経発生・細胞移動と極性決定へのアプローチ- ”、第66回日本細胞生物学会大会、奈良県新公会堂・東大寺総合文化センター、奈良、2014年6月11-13日

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。