

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830012

研究課題名(和文) 神経細胞移動の基盤となる細胞骨格および核ダイナミクスの解析

研究課題名(英文) Analysis of nuclear and cytoskeletal dynamics underlying neuronal migration

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳の発生過程における神経細胞移動を制御する分子機構を明らかにすることを目的として、移動中神経細胞の細胞核を高速共焦点顕微鏡を用いてタイムラプス観察した。その結果、細胞核が移動とともに変形や回転をおこなうことを見出した。さらに分子生物学的手法を用いて、細胞核の回転が核移動と共役する力によること、この力の発生に微小管モータータンパク質が関与することを示唆する結果を得た(論文投稿中)。また、細胞核イメージングと牽引力顕微鏡法を併用することで、核移動と同期するアクチン-ミオシン依存性の牽引力の存在を見出した(投稿準備中)。

研究成果の概要(英文)：I performed time-lapse imaging of nuclear translocation during neuronal migration with a high-speed confocal microscope, in order to understand molecular mechanisms of neuronal migration. As a result, I found that the nucleus is deformed and rotated during neuronal migration. Moreover, molecular biological approaches suggested that force generated by microtubule-based motor proteins drives both nuclear translocation and rotation of migrating neurons (submitting a manuscript for publication). On the other hand, I also performed traction force microscope analysis for migrating neurons and found traction force accompanied by nuclear translocation, which is generated by actomyosin contractile activity (preparing a manuscript).

研究分野：神経発生生物学

キーワード：神経発生 細胞移動

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の成体において、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形成することで機能的な神経回路網を構築している。神経細胞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自律的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と考えられている。

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、それに伴って細胞核を先導突起の内部へと移動させる。現在、核の移動には微小管とアクチン細胞骨格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。しかし、実際にそれらが核を駆動するメカニズムについては、(1)微小管もしくはアクチン細胞骨格が核の前方において核を牽引するモデルや、(2)アクチンおよびミオシンモータータンパク質が収縮力によって核の後方から核を押し出すモデルなど、複数の仮説が提唱されており、いまだ決着がつかない。複数のモデルが乱立している原因の一つとして、移動中の神経細胞における細胞骨格ダイナミクスに関する知見がいまだ不足している点が挙げられる。神経細胞の細胞体は一般的な線維芽細胞などに比べて小さくその内部に細胞核や細胞骨格が密に存在しているため、生細胞イメージングにより細胞骨格のダイナミクスを詳細に観察することが難しい。また、アクチンや微小管骨格は細胞内に豊富に存在しており核移動以外にも様々な細胞内現象に関与しているため、従来の研究では核に直接作用する力の発生源を特定することが困難だった。

私はこれまでにスピニングディスク型共焦点レーザー顕微鏡を用いて、移動中の神経細胞における細胞核および微小管やアクチン骨格のダイナミクスを高い時間・空間分解能で観察することに成功しており、そこから、移動中の神経細胞の核周辺では微小管およびアクチン細胞骨格の構造が非常にダイナミックに変化していること、また細胞核自身も移動に伴ってダイナミックな変形を起こすことを見出している。

2. 研究の目的

本研究では、移動中の神経細胞において細胞核の移動を駆動する力の発生メカニズムを明らかにすること、またそのメカニズムにおける細胞骨格系およびモータータンパク質の役割を明らかにすることを目的として研究を行なう。

これまでに私は、高速共焦点顕微鏡を用いたタイムラプス観察から、神経細胞の核が移動に伴って回転運動や変形を行なうことを見出している。これらの核ダイナミクスは核移動の際に核に作用する細胞骨格およびモータータンパク質による外力を反映していると考えられる。そこで本研究では、細胞核の変形および回転ダイナミクスを定量的に解析し、その結果から核に作用する力について推定を行なう。さらに、核ダイナミクスと細胞骨格ダイナミクスの同時観察および薬理学的および分子生物学的手法によって核の移動・変形・回転ダイナミクスに関する細胞骨格およびモータータンパク質について検討を行なう。

これまで、ノックアウトマウスやRNAiノックダウン法などの分子生物学的手法によって多くのシグナル分子が微小管およびアクチン細胞骨格系を介して神経細胞移動に関与していることが示されてきた。しかし、その一方で、それらの細胞骨格がどのように作用し核移動を駆動する力を発生させているのかについてはいまだ不明な点が多い。本研究では、これらのシグナル分子の集約点である細胞骨格が細胞核にどのように直接的に作用するかを明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、神経細胞の移動を *in vitro* 培養下で再現できる小脳顆粒細胞の再凝集培養系を神経細胞移動のモデルとして用いる。再凝集培養系下の顆粒細胞に細胞核および細胞骨格等を標識する蛍光タンパク質を遺伝子導入により発現させ、スピニングディスク型高速共焦点レーザー顕微鏡を用いてタイムラプス観察する。これまでにこの系を用いて細胞核および細胞骨格の3次元象を15秒間隔で1~2時間に渡ってタイムラプス撮影することに成功している。得られた画像から、デジタル画像解析手法を用いて細胞核の移動・変形・回転のダイナミクスを定量的に解析し、核に作用する力を推定する。また、核移動に際して細胞が足場となる基質に及ぼす力を同時に観察する目的で牽引力顕微鏡法を行なう。蛍光ビーズを埋め込んだポリアクリルアミドゲル上で顆粒細胞を培養し、核移動に伴って起こる蛍光ビーズの変位を上記の蛍光顕微鏡を用いて観察することで核移動の際に作用する力の基点を明らかにすることができると考えられる。さらに、細胞骨格系の重合阻害剤やモータータンパク質の機能阻害剤の投与、拮抗阻害型分子の強制発現などにより細胞骨格系を攪乱することで上記の結果にどのような影響を及ぼすかを検討する。また、*in vitro* 培養系である小脳再凝集培養系に加えて、より生体内に近い環境において神経細胞移動を観察できる小脳組織スライス培養系においても核ダイナミクスの観察を行なう。これらの2つの系

を併用しそのダイナミクスを比較することで、生体内における現象を踏まえつつ細胞内構造の詳細な解析を行なう

4. 研究成果

本研究では、高速共焦点顕微鏡によるタイムラプス観察によって見出された移動中神経細胞の細胞核の回転および変形に注目して研究を行なった。以下では、回転現象と変形現象に分けてその成果を記載する。

(1) 移動中神経細胞における細胞核の回転現象とその分子機構

細胞核の回転を定量的に評価するために、核内構造の一つであるヘテロクロマチンの特異的に標識する蛍光タンパク質 HP1 -EGFP もしくは HP1 -mCherry を小脳再凝集培養系下の顆粒細胞に遺伝子導入により発現させ、3次元空間上でのヘテロクロマチンスポットの動態をタイムラプス撮影した。得られたデータから、スポットトラッキングアルゴリズムによるデジタル画像解析と主成分分析手法を用いて、回転軸の方向および回転速度を算出した。その結果、移動中神経細胞における細胞核は、これまでに報告されている他の細胞（線維芽細胞、筋芽細胞など）と比べて非常に動的で、およそ10倍程度高速に回転すること、また回転は3次的に起こる一方で回転軸は進行方向に対しておおよそ垂直である（すなわち回転方向と移動方向が一致している）ことが明らかになった。さらに核の回転と核の移動のタイミングを比較したところ、回転と移動が協同的に起こっていることを示唆する結果を得た。また、核ラミナを構成するタンパク質である Lamin B1 の蛍光標識においても同様の核回転現象を確認することができた。核の回転が移動中の神経細胞に特異的な現象であるのかを確かめるため、細胞培養後6日が経過し、すでに移動を終了した顆粒細胞においてヘテロクロマチンスポットの動態を観察した。その結果、ヘテロクロマチンスポットは観察期間中ほとんど動かず、回転現象が移動中の細胞に特異的な現象であることが示された。以上の結果から、細胞核の回転が核移動を駆動するのと同じ力で駆動される可能性が示唆された。また、核の回転現象が培養皿上のような *in vitro* 細胞培養系に特異的な現象である可能性を排除するため、より生理条件下に近い小脳組織スライス培養系において核の回転が観察されるかを調べた。生後8日齢の ICR マウス小脳に EGFP および HP1 -mCherry を *in vivo* 電気穿孔法を用いて遺伝子導入し、その後、摘出したマウス小脳から脳スライス培養を作成して、組織内を移動する顆粒細胞の核ダイナミクスを共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。脳組織内において、顆粒細胞は接線移動と法線移動と呼ばれる2種類の移

動様式を示すが、そのどちらにおいても移動中に細胞核が活発に回転を行なう様子が観察された。このことから、移動中神経細胞における核の回転は脳の発生過程において実際に起こっている現象であることが示唆された。

次に、細胞核の回転を駆動する分子メカニズムを明らかにすることを目指して実験を行なった。これまでの結果から、核の回転と核の移動が同じメカニズムで駆動されている可能性が示唆されたため、まず、核移動に関与すると考えられているアクチンおよび微小管細胞骨格系の関与を検討した。小脳再凝集培養系において、アクチンの脱重合剤である Latrunculin A および細胞質ミオシンの阻害剤である Blebbistatin を投与し顆粒細胞の核移動および核回転への影響を検討したところ、これらの薬剤は細胞核の移動を即座に停止させたが、核の回転には有意な影響を与えなかった。その一方で、微小管骨格の脱重合剤である Nocodazole および微小管の重合を過剰に促進する薬剤である Taxol を投与したところ、核の方向性のある移動と核回転がともに阻害された。以上の結果から、核の移動と回転において微小管細胞骨格が直接的に関与する一方で、アクチン細胞骨格およびミオシンモータータンパク質は核移動に間接的に関与するもしくは回転を伴わない微小管骨格系とは別のメカニズムによって核移動を駆動している可能性が示唆された。

近年、さまざまな細胞種において LINC complex (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) と呼ばれる核膜上のタンパク質複合体がアクチン、微小管、中間径フィラメントなどの細胞骨格系と核ラミナの連結を仲介していることが報告されている。そこで、移動中の神経細胞においても LINC complex が微小管と核膜の結合を仲介し、核の回転現象に関与している可能性を検証した。LINC complex のうち核外膜側に存在する分子である Nesprin から細胞骨格系と結合すると考えられる領域を欠失させ核膜側と結合する領域だけを残した遺伝子を拮抗阻害分子として小脳再凝集培養系の顆粒細胞に強制発現させ核移動および核回転に及ぼす影響を調べた。その結果、LINC complex の拮抗阻害が核の移動および回転を有意に阻害することがわかった。さらに *in vivo* 電気穿孔法を用いて拮抗阻害分子をマウス小脳に遺伝子導入したところ、顆粒細胞の移動が激しく阻害された。以上の結果から、LINC complex が神経細胞においても核と微小管骨格系を仲介し、核の回転を駆動していることが示唆された。

これまでに、微小管依存的な神経細胞の核移動モデルでは、マイナス端方向性の微小管モータータンパク質であるダイニンが核を運ぶ力を発生させると考えられている。また、Nesprin にはダイニンに加えてプラス端方向

性の微小管モータータンパク質であるキネシン1が結合することが報告されている。そこで、核回転を駆動する力の発生源の候補としてダイニンとキネシン1の役割を検討した。ダイニンの制御因子であると考えられている LIS1 および Dynactin の拮抗阻害型分子を遺伝子導入し、核移動および回転に及ぼす影響を調べた。結果、これらの拮抗阻害分子は核の移動および回転を有意に阻害した。また、キネシン1においてもキネシン1重鎖の拮抗阻害分子を強制発現させたところ、核の移動と回転が阻害された。キネシン1についてはこれまで神経細胞の核移動に対する役割が報告されていなかったことから、さらに解析を行なった。キネシン1重鎖の拮抗阻害分子を *in vivo* 電気穿孔法を用いてマウス小脳に遺伝子導入したところ、生体内においてもやはり顆粒細胞の移動が阻害された。また、キネシン1軽鎖の Nesprin と結合する部位だけを残して他を欠失させたものを小脳再凝集培養系の顆粒細胞に強制発現させたところやはり回転および移動に対して抑制効果を示した。さらにキネシン1が移動中神経細胞の核膜上に存在することを核分画のウェスタンブロットおよび免疫蛍光染色法により確認した。以上の結果から、ダイニンおよびキネシン1が核膜上において Nesprin と結合し核回転の力を発生させていることが示唆された。

以上の研究結果から、移動中の神経細胞の核が並進するだけでなく回転を伴って移動をしていることが明らかになった。また、微小管細胞骨格および微小管モータータンパク質であるキネシンとダイニンが核移動と回転に直接的に関与していることを示唆された。特にキネシンに関してはこれまで神経細胞の核移動に対する役割は報告されておらず本研究によって初めて明らかになった。各々反対方向へと移動するキネシンとダイニンモーターがどのように協同的に核移動に関与するのはいまだ明らかではないが、微小管プラス端マーカーである EB3-EGFP を用いたイメージングから移動中の神経細胞の核周辺に存在する微小管は配向が定まっていなかったことを見出し、それらの配向が混在した微小管配置とキネシン、ダイニンの協同的な働きが方向性を持った細胞核移動を実現していると考えられる。本研究の成果は現在、国際論文誌に投稿中である。

(2) 移動中の神経細胞における細胞核の変形と牽引力顕微鏡法による細胞が基質に及ぼす力の観察

移動中の神経細胞における細胞核の変形を定量的に評価するため、核局在型蛍光タンパク質である DsRed2-Nuc もしくは H2B-EGFP を小脳再凝集培養系において顆粒細胞に遺伝子導入し、蛍光標識された細胞核を高速共焦

点顕微鏡を用いてタイムラプス撮影した。得られたデータから、デジタル画像解析手法を用いて細胞核の輪郭を抽出し、輪郭に沿った周辺曲率の時間変化を定量的に解析した。その結果、細胞核が移動を開始する直前に核の先端の周辺曲率が一時的に上昇する(すなわち先端が突出する)ことを見出した。一方、核の後方においては目立った変化は見られなかった。この結果は、従来提唱されている核移動の前方牽引モデルと後方押しモデルのうち前者を支持する結果である。そこで、前方牽引モデルの妥当性をさらに検証するため、牽引力顕微鏡法を用いて移動中の神経細胞が基質に及ぼす力の観察を行なった。前方牽引モデルが正しければ、核移動の際には核の前方側で移動方向とは逆方向の力が基質に加わると考えられ、一方、後方押しモデルが正しければ核の後側で核移動とは逆方向の力が加わると考えられる。

牽引力顕微鏡法では、多数の蛍光ビーズを包埋した柔軟なポリアクリルアミドゲルの上に細胞を播種し、細胞移動に伴って動くビーズの変位から基質の変形を算出し細胞が基質に及ぼす力(牽引力)を推定する。しかし、神経細胞においては他の細胞よりも著しく牽引力が小さく検出することが難しかった。そこで、非常に柔らかいゲルを作成しさらにゲル表面の蛍光ビーズ密度を高めてやることで移動中の神経細胞における牽引力を検出することに成功した。さらに高速共焦点顕微鏡を用いることで細胞核の変形と蛍光ビーズの変位を同時に観察することにも成功した。その結果、先端突起の先端または中間部分において核の移動と同期し前方牽引モデルを支持する牽引力の存在を見出すことができた。その一方で、核の後方において後方押しモデルを支持する力は見られなかった。牽引力を発生させるメカニズムを検討する目的で細胞骨格およびモータータンパク質の阻害剤を投与した結果、細胞質ミオシンの阻害剤である Blebbistatin の投与下では牽引力がほぼ消失した。さらにアクチン骨格を LifeAct-2xEGFP を用いて標識したところ、牽引力の発生と同期してアクチン骨格の増加が見られた。このことから、牽引力の発生はアクチン-ミオシンの収縮力によるものであると考えられた。また、強い牽引力を伴って起こる核移動がジャンプするような挙動を示すのに対して、目立った牽引力を伴わずにおよそ一定の速度で移動するような例も見られた。これらの結果と上述の微小管依存的な核移動の結果を併せて、神経細胞の核移動においては微小管依存的なメカニズムとアクチン-ミオシン依存的なメカニズムが並行して存在している可能性が示唆された。

以上の成果については、現在、論文投稿を準備中である。

(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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

Hiroki Umeshima, Mechanical approaches to nuclear migration of neurons during brain formation, 文部科学省科学研究費補助金新学術領域「超高速バイオアセンブラ」京都大学 物質-細胞統合システム拠点 合同シンポジウム, 2014年05月16日, 京都大学(京都市)

Hiroki Umeshima, Yuu Kure, Kenichi Nomura, Shuhei Yoshikawa, Shinya Sakuma, Fumihito Arai, Makoto Kaneko, Mineko Kengaku, Quantitative Image Analysis of Nuclear Dynamics in Migrating Neurons, 2014 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, 2014年11月11日, 名古屋大学(名古屋市)

Hiroki Umeshima, You Kure Woo, Kenichi Nomura, Shuhei Yoshikawa, Shinya Sakuma, Fumihito Arai, Makoto Kaneko, Mineko Kengaku, Cell mechanics underlying nuclear translocation of migrating neurons, The 14th International Joint Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology between KU-NTU-UT, 2015年06月13日, 京都大学(京都市)

You Kure Woo, Hiroki Umeshima, Mineko Kengaku, Nuclear rotation during neuronal migration, The 14th International Joint Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology between KU-NTU-UT, 2015年06月13日, 京都大学(京都市)

Hiroki Umeshima, Yuu Kure, Kenichi Nomura, Shuhei Yoshikawa, Shinya Sakuma, Fumihito Arai, Makoto Kaneko, Mineko Kengaku, Cell mechanics underlying nuclear translocation of migrating neurons, iCeMS International Symposium Hierarchical Dynamics in Soft Materials and Biological Matter, 2015年09月23日~2015年09月26日, 京都大学(京都市)

Hiroki Umeshima, You Kure Wu, Kenichi Nomura, Shuhei Yoshikawa, Shinya Sakuma, Fumihito Arai, Makoto Kaneko,

Mineko Kengaku, Cell mechanics underlying nuclear translocation of migrating neurons, Neuroscience2015, 2015年10月17~21日, Chicago (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者 ()