

**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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14317

研究課題名(和文)力学特性計測によるニューロン核移動機構の解明

研究課題名(英文) Exploring the mechanical force driving nuclear migration in developing neurons

研究代表者

見学 美根子 (KENGAKU, Mineko)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：10303801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新生ニューロンの移動は脳皮質形成に必須の過程であるが、数多く同定されている細胞骨格制御因子が生む力と運動の関係は明らかでない。in vitro再構築系を用いた高速・高解像生細胞イメージング系により、ニューロンの微細形態の時間変化を細胞骨格ダイナミクスと同時に非侵襲で観察した結果、移動ニューロンの核が頻繁に変形と回転運動することを見出した。変形と回転は微小管モーターダイニンとキネシンが核膜分子LINC複合体と結合し、局所で牽引力を発生することにより誘導されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Neuronal migration is a critical step for cortical formation in the mammalian brain, yet the precise mechanism of cytoskeletal force transmission is not fully understood. Using high resolution confocal imaging, we visualized dynamic deformation and rotation of the nucleus in migrating neurons. We demonstrated that microtubules dynamically bind to small points on the nuclear envelope via the plus- and minus-end oriented motors, kinesin and dynein, and induce sharpening, rotation and translocation of the nucleus via LINC complex.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 発生・分化 細胞・組織 ライブイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の脳発生過程で、新生ニューロンは分裂層から細胞移動して皮質や神経核の特定の層に到達して整然と配置し、精緻な神経回路を形成する。ニューロン移動の破綻は脳奇形のほか統合失調症などの精神神経疾患の病因となるため、機構解明に向け多くの研究が行われてきた。先行研究により、ニューロン移動では核が微小管モーターのダイニン活性およびアクチン収縮の両方に依存して運搬されることが明らかになっており、移動に関与する細胞骨格制御分子が数多く同定されている。しかし、骨格分子が生む力と運動の関係は明らかでなかった。代表者は哺乳類小脳皮質の形成過程で起こる顆粒細胞の移動ダイナミクスと細胞・分子機構の解析を行う過程で、核が動きと連動してダイナミックに変形する様子を観察した。この観察から、核移動は細胞質マイクロ流路における粘弾性体としての核の動力学として捉えることができ、動的形態ゆらぎと位置変化の定量的解析と力学的性質の測定により、ニューロン移動にかかる力を予測・証明すると着想した。

### 2. 研究の目的

小脳皮質構築時に大規模に移動する小脳顆粒細胞をモデルとして、未解決であったニューロン核移動の力学基盤を明らかにすることを目的とする。in vitro 再構築系を用いた高速・高解像生細胞イメージング系により、ニューロンの微細形態の時間変化を細胞骨格ダイナミクスと同時に非侵襲で観察し、その画像解析データから移動するニューロン核の粘弾性体としての性質を明らかにし、力ベクトルを算出する。さらに力の実体(分子)を細胞生物学的実験により特定するという両方向性のアプローチを用いることで、ニューロン核移動が牽引力、押圧力のいずれで駆動されるか、その分子・力学基盤を明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

分散培養してガラス基板上を移動する小脳顆粒細胞の核の微細構造を蛍光タンパク質により生体標識し、スピニングディスク共焦点顕微鏡を用いて、核の歪み、変形、重心を軸とした回転等のダイナミクスを観察する。得られた高解像タイムラプス画像から輪郭の曲率変化や回転軸・角速度等の特徴量を画像解析により抽出し、核の移動ベクトルとの相関を調べた。また、力の実体を特定すべく、動力源である細胞骨格の寄与を薬剤、分子操作で攪乱した時にダイナミクスに現れる影響を解析した。生体内での分子機構の解析には、新生児小脳への生体電気穿孔法で変異分子を強制発現し、小脳皮質がほぼ完成する2週目に顆粒細胞移動を定量した。

### 4. 研究成果

分散培養下の顆粒細胞のタイムラプス観察から、移動中の顆粒細胞核は並進しながら進行方向端が鋭角に尖るような変形を繰り返しつつ、頻繁に回転運動することが明らかになった(図1)。回転は移動を終えたニューロンには見られず、ゴルジ体や中心体には起こらないことから、核移動を駆動する力に依存する運動と考えられた。そこで HP1 $\beta$  を標識してヘテロクロマチンを可視化し、スポット追跡で回転軸を計算したところ、移動方向と同一方向に回っていることが分かり、核の並進運動を駆動する力が回転を起こすこ

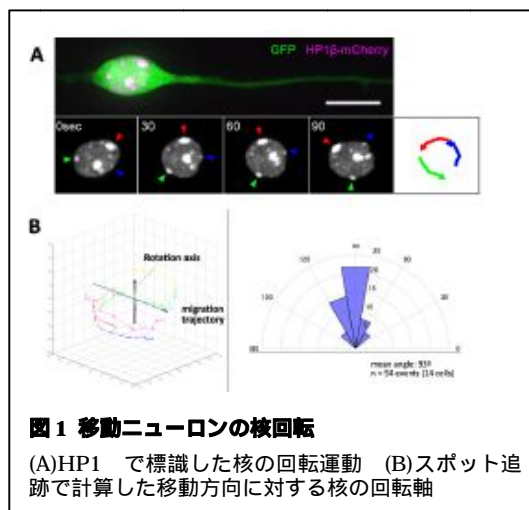


図1 移動ニューロンの核回転

(A)HP1 で標識した核の回転運動 (B)スポット追跡で計算した移動方向に対する核の回転軸

とが示唆された(図1)。

回転が細胞骨格の生む力によるものかを検証するため、核と細胞骨格を連結するLINC複合体のドミナントネガティブ変異(KASH1)の強制発現の影響を解析したところ、核回転、並進とも顕著に抑制された。そこで動力源がアクチン、微小管いずれかを特定すべく、阻害剤投与の影響を観察したところ、アクチン重合阻害やミオシン阻害では核の並進は抑制されるものの回転には殆ど影響がなかった。一方微小管阻害は回転、並進とも有意に抑制することから、回転は微小管依存的な力に駆動されることが示唆された。

微小管はモーター分子ダイニンおよびキネシンを介してLINC複合体に結合する。そこでダイニンおよびキネシン阻害の影響を解析した。本実験系はRNA干渉法の適用が難しかったため、ダイニン結合分子Lis1およびDynactinの阻害を行なったところ、いずれも回転、並進を有意に阻害した(図2)。キ

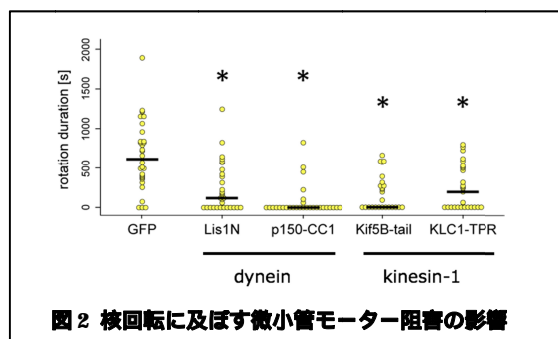
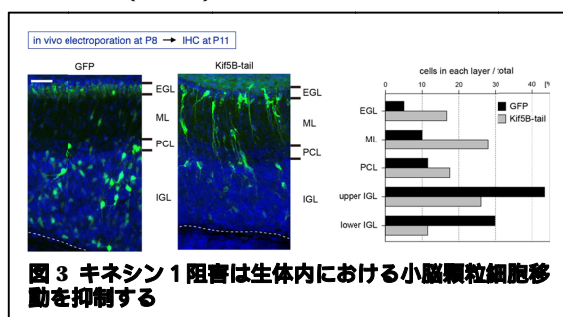


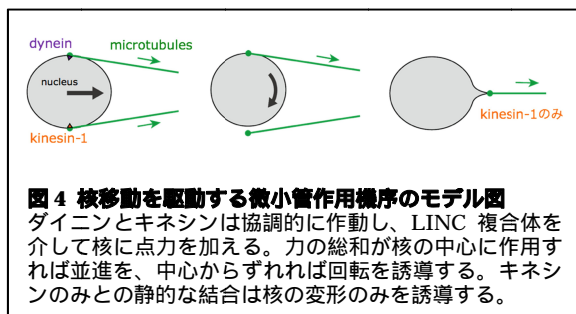
図2 核回転に及ぼす微小管モーター阻害の影響

ネシンは顆粒細胞に発現が強いキネシン 1 の構成分子である KIF5 および KLC(1-4)の阻害を行なったところ、回転と並進が有意に抑制されることが明らかになった(図2)。これらの結果から、核回転は微小管の両方向性モーターが必要であることが示唆された。

先行研究により、移動期のニューロンでは核周辺の微小管は移動方向の先端突起にマイナス端を向けて極性配向しており、核移動はダイニンのマイナス方向モーター活性に依存していると考えられてきた。本研究でキネシンの関与が示唆されたので、微小管の配向を EB3 標識して確認したところ、およそ 2 割の微小管が逆向きに配向していることが明らかになった。また、核膜にキネシン分子が局在することも確認された。キネシンの機能が核回転に十分かを検証するため、キネシン結合部位のみをもつ KASH タンパク質変異体を強制発現したところ、核回転は起こらなかったが、進行方向端が鋭角に尖ったままになり前方から力の負荷があることが示唆された。生体内でキネシンの機能がニューロン移動に必要なかを検証するため、KIF5 阻害変異体を強制発現したところ、有意に移動が阻害された(図3)。



以上の結果から、核回転は LINC 複合体と微小管モーターの結合により核局所に負荷される牽引力により起こることが明らかになった。本研究によりニューロン移動においてキネシンの関与が初めて明らかになり、核の運動に両方向性モーターの協調的作用が必要であることが証明された。微小管モーターの力の総和が中心に作用すれば並進を、片側にずれば回転を誘導すると考えられる



(図4)。

回転の生理的意義はまだ不明だが、生体内の移動ニューロンが狭い組織内を移動する際に著しく変形することが観察され、核に強

い応力がかかることが示唆される。回転は、力が核移動を駆動できない時に至適なポジションを探索するのに有効であるかもしれないし、強い負荷により核にダメージを与えられないよう過剰な力を解放する可能性もあると考えている。

本研究による主要な結果は論文投稿後改定中である。

## 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3件)

- Oomoto, I., Suzuki-Hirano, A., Umeshima, H., Han, YW., Yanagisawa, H., Carlton, P., Harada, Y., Kengaku, M., Okamoto, A., Shimogori, T. and Wang, DO. ECHO-liveFISH: in vivo RNA labeling reveals dynamic regulation of nuclear RNA foci in living tissues. *Nucleic Acids Research*. 43(19):e126 査読有 doi: 10.1093/nar/gkv614.
- Nakashima, K., Umeshima, H. and Kengaku, M. Cerebellar granule cells are predominantly generated by terminal symmetric divisions of granule cell precursors. *Developmental Dynamics*. 244(6):748-758 査読有 doi: 10.1002/dvdy.24276.
- Bando, Y., Irie, K., Shimomura, T., Umeshima, H., Kushida, Y., Kengaku, M., Fujiyoshi, Y., Hirano, T. and Tagawa, Y. Control of spontaneous  $Ca^{2+}$  transients is critical for neuronal maturation in the developing neocortex. *Cerebral Cortex*. 2014 Aug 11. pii: bhu180. 2016 Jan;26(1):106-117. 査読有 doi:10.1093/cercor/bhu180.

[学会発表](計8件)

- Mineko Kengaku, You Kure Wu and Hiroki Umeshima, Molecular basis of the mechanical force driving neuronal migration in the developing brain. Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists (招待講演) 2017.03.15-18 Kiel(Germany)
- 呉攸、梅島宏樹、見学美根子 神経細胞移動時における核運動の制御. 第10回神

経発生討論会 2017.03.10-11 秋保リゾートホテルクレセント(宮城県仙台市)

3. 見学美根子、呉攸、梅嶋宏樹 移動ニューロンの核ダイナミクスを制御する細胞骨格. Cytoskeletal control of dynamic motility of the nucleus during neuronal migration. 第 39 回日本神経科学大会 (招待講演) 2016.07.20-22 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
4. 呉攸、梅嶋宏樹、見学美根子 神経細胞移動において細胞核が示す回転運動の分子基盤. Molecular basis of dynamic nuclear rotation in migrating neurons isolated from the developing brain. 第 39 回日本神経科学大会 2016.07.20-22 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
5. Mineko Kengaku, The molecular nature of the force driving nuclear transport during neuronal migration. Swiss-Kyoto Joint Symposium on Life Science (招待講演) 2016.06.13 京都大学医学部芝蘭会館稲盛ホール(京都府京都市)
6. Mineko Kengaku, Mechanics underlying cell architecture formation in the developing brain. Center for Functional Connectomics Seminar, Korea Institute of Science and Technology (招待講演) 2016.04.06 Seoul (Korea)
7. Mineko Kengaku, Nuclear dynamics during neuronal migration in the developing brain. I.M.A. workshop on neural imaging in neuroscience 2016 (招待講演) 2016.03.21-22 Cambridge (United Kingdom)
8. Hiroki Umeshima, You Kure Wu and Mineko Kengaku, Measurement of the Force Driving Nuclear Transport during Neuronal Migration in the Developing Brain. iCeMS International Symposium 'Hierarchical Dynamics in Soft Materials and Biological Matter' (招待講演) 2015.09.23-26 京都大学北部総合教育研究棟益川ホール(京都府京都市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

見学美根子 (KENGAKU, Mineko)  
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授  
研究者番号： 10303801

### (2) 連携研究者

金子真 (KANEKO, Makoto)  
大阪大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号： 70224607