

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 6月 5日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20500315

研究課題名（和文） 神経細胞の形態形成における微小管アンカーの役割

研究課題名（英文） Roles of the microtubule anchor on neuronal morphogenesis

研究代表者

林 謙介 (HAYASHI KENSUKE)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：50218567

研究成果の概要（和文）：神経細胞の形態を支えるのは細胞内の微小管である。神経細胞が特徴的な形をしているのは微小管の配列が特徴的だからである。本研究では、微小管を作り出す働きを持つ中心体が、神経細胞では他の細胞とは異なる分子構成と働きを持つことを明らかにした。すなわち、神経細胞の中心体では微小管をアンカーするニナインという分子が欠失しており、また、中心体からの微小管の遊離が神経突起の形成に重要であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Morphology of neurons is supported by microtubules. The unique arrangement of microtubules is responsible to the unique shape of neurons. In this study, we found that the centrosome, which generates microtubules has distinct molecular components and function in neurons. Neuronal centrosomes lacked ninein, which is a microtubule anchor protein, and microtubule release from the centrosome was important for process elongation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経発生学

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経発生、分化、異常

1. 研究開始当初の背景

細胞の形は細胞の種類によってさまざまだが、神経細胞は特に特徴的な形態を持っている。それは、非常に長い神経軸索と、複雑に枝分かれした樹状突起である。樹状突起は神経細胞のアンテナであり、その形態は神経の機能に大きな影響を与える。ある種の神経疾患や老化に伴って樹状突起は退縮し、脳の機能を低下させる。樹状突起がその形態を維持

することは、脳の働きを保持し、老化を防ぐために大事である。

樹状突起の形態は細胞内の骨格、微小管によって支えられている。樹状突起内の微小管は、他の細胞には見られない特徴的な配列を持っている。すなわち、他の細胞種ではプラス端を細胞の周囲に向けた微小管がほとんどであるのに対し、樹状突起は微小管の向きがバラバラである。このような微小管がどのように形成され、維持されているのかはよく

分かっている。

樹状突起と同じように、逆向きの微小管を持つ上皮細胞では、通常は中心体で微小管をアンカーするタンパクが中心体以外の場所に局在していることが報告されている。しかし、本研究を開始する時点で、神経細胞における微小管アンカータンパクを研究した報告はなかった。

2. 研究の目的

我々は、神経細胞では通常の細胞とは異なり、中心体が微小管をアンカーしないことが神経細胞の特徴的な微小管形成に重要なのではないかと考え、まず、中心体における微小管アンカータンパクであるニナインの、神経細胞における局在を調べた。また、神経突起を伸長させる細胞 Neuro2A において、中心体からの微小管遊離に必要なタンパク、スパスチンの役割を調べた。

3. 研究の方法

①抗体の作製

ニナインのN末端を大腸菌に発現させ、ウサギに免疫することによってニナイン特異抗体を作製した。

②siRNA

スパスチンの発現をRNA干渉法によって抑制するため、マウススパスチンの塩基配列を基に SiDirect によって予測した siRNA を2種類合成した。

その他の方法は通常の方法による。

4. 研究成果

①神経細胞におけるニナインの発現

まず、RT-PCR により、ニナイン mRNA の発現量を調べると、ニナインは神経細胞が樹状突起を発達させ始める胎生18日目以降に発現量が上昇することが分かった。ニナインの抗体を作成し、ラット胎児の脳におけるニナインの局在を免疫抗体法により調べた。胎生18日大脳皮質において、ニナインは樹状突起をよく発達させた皮板の細胞に良く発現していた (図1左)。拡大して観察すると、神経細胞の中心体ではなく、細胞体と樹状突起において顆粒状の局在が見られた (図1右)。同様に、小脳皮質のプルキニエ細胞においても、樹状突起においてニナインの強い発現が見られ、中心体には見られなかった。

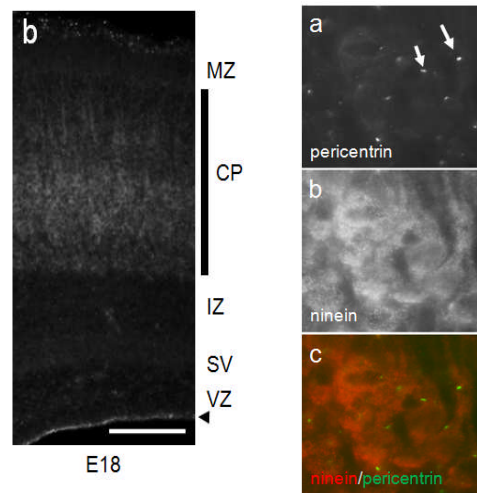


図1. 胎生18日目ラットの大脳皮質におけるニナインの発現。CP:皮板

更に若い胎児 (E15) の脳室付近を調べてみると、脳室帯で増殖する神経上皮幹細胞においてはニナインは中心体に強く局在していたが、幹細胞の分裂中にはニナインは星状体から失われ、中間帯に移動する神経前駆細胞においてもニナインは中心体に観察されなかった (図2)。

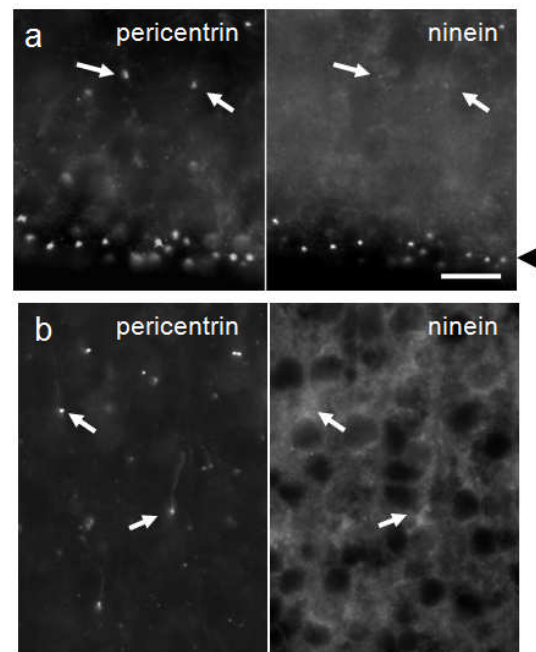


図2. 胎生15日目ラットの脳室帯付近の細胞におけるニナインの局在。

次に、培養した大脳皮質におけるニナインの局在を調べた。ニナインは軸索には検出されず、樹状突起において顆粒状に観察された(図3)。ニナインの顆粒は、ガンマチユプリンの顆粒とは一致しなかった。

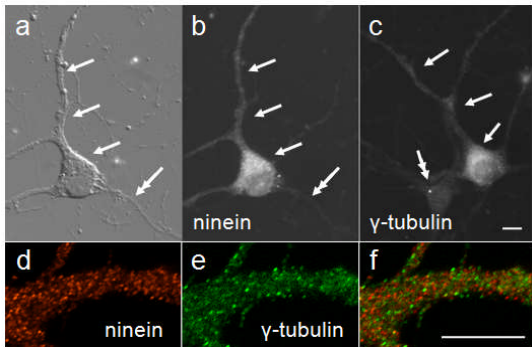


図3. 培養された大脳皮質神経細胞におけるニナインとガンマチユプリンの局在。

神経細胞内に見られるニナイン顆粒と微小管との位置関係を調べるため、培養した神経細胞の神経突起の先端を界面活性剤処理し、詳細に観察した。ニナイン顆粒のほとんどは、微小管に結合していることが分かった(図4)

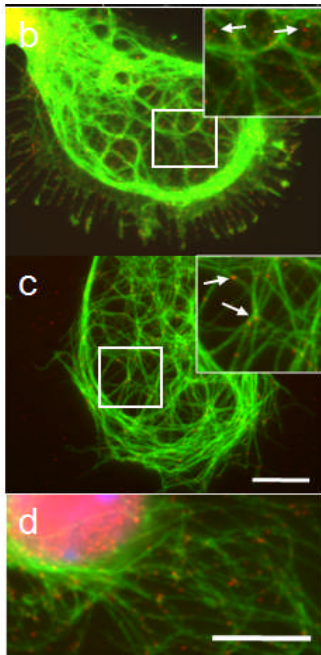


図4. 界面活性剤処理することによって微小管を観察しやすくした神経突起におけるニナインの局在。

以上のことから、ニナインは神経細胞が分化すると中心体から失われ、樹状突起に散在的に顆粒状となり、微小管に結合していることが分かった。

②神経系株細胞 Neuro2A における微小管切断タンパク質の役割

Neuro2A 細胞は脳原発性のガンより樹立された細胞株であり、培養条件を変えることにより分化し、突起を伸長させる。これまで、神経突起伸長のモデルとして多用されてきたが、ほとんどの研究では細胞が移動できない条件で研究されてきた。本研究では、細胞をより生体内に近い条件で培養するため、十分にラミネンコートされた基質上に Neuro2A を培養し、その移動と突起伸長について、中心体の役割を調べた。

まず、ラミネン上に細胞を培養すると、細胞は移動すると同時に突起を伸長させたが、タイムラプス観察すると突起は細胞移動の後方に形成されていることが分かった。すなわち、これらの突起は通常の突起伸長の時のように突起先端の成長円錐が移動することによって伸長するのはなく、細胞体の方が移動することによって伸長することが分かった。実際、これらの突起は微小管伸長の場である成長円錐を持っていなかった。

そこで、微小管形成中心である中心体の位置を調べた。通常、移動する細胞において中心体は移動の前方に位置するが、ラミネン上に培養された Neuro2A では、移動の後方、つまり伸長中の突起の基部に常に位置していた(図5)。このことは、中心体が突起の伸長に重要な役割を果たしていることを示唆している。

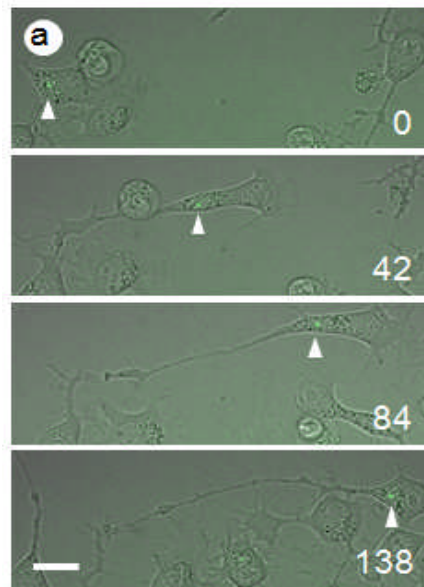


図5. ラミネン基質上を移動しながら突起を伸長させる Neuro2A 細胞と、その中心体。中心体は GFP によって蛍光標識されている。

次に、突起を伸長させている細胞における微小管の分布を調べた。3T3 細胞のような通常の細胞では、微小管は中心体を中心とする放射状に観察されるが (図 6 d)、分化誘導前の Neuro2A 細胞ではそのような微小管配列は見られなかった。分化を誘導すると、微小管は細胞の周囲にみられ、特に伸長した突起内に強くみられた (図 6 fg)。それらの細胞の中心体の付近には微小管は見られなかったが、ノコダゾルを用いた微小管再形成実験をおこなうと、これらの細胞の中心体が微小管形成能を持っていることが分かった (図 6 h)。

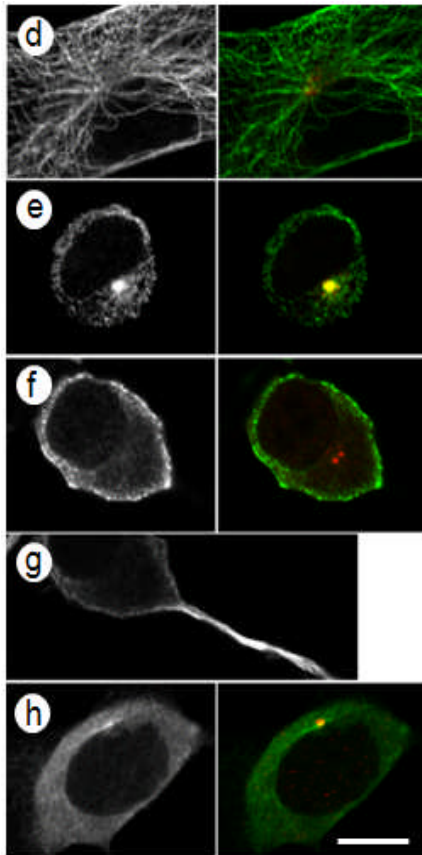


図 6. 種々の細胞の微小管配列。d 3T3 細胞。e 分化させる前の Neuro2A 細胞。f. g 分化させた Neuro2A 細胞。h Neuro2A 細胞の微小管再形成。

これらの結果は、分化させた Neuro2A 細胞の中心体が微小管を形成しており、それを細胞周囲に送り出すことによって突起が伸長していることを示唆している。

そこで、中心体から微小管を切り出す際に働く微小管切断酵素、スパスチンの働きについて調べた。

スパスチンの発現を抑制する目的で 2 種類のスパスチン siRNA を合成し、Neuro2A 細胞にトランスフェクトした。ウエスタンブロッティングによって、スパスチンの発現用句

性が確認された (図 7)。

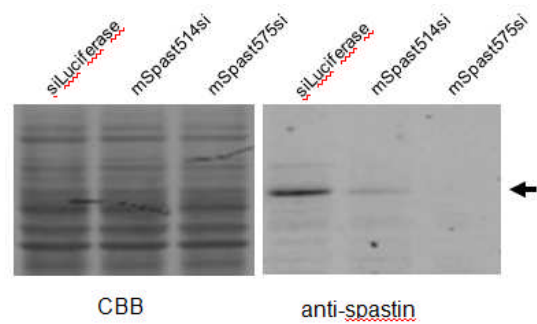
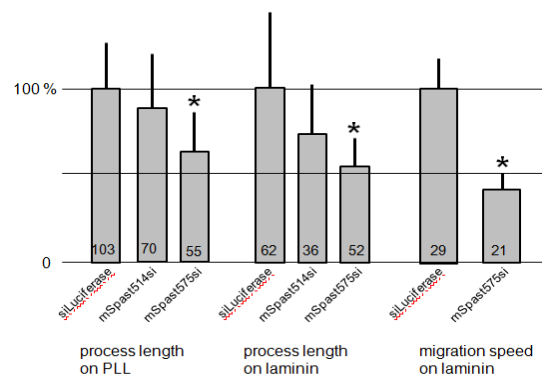


図 7. スパスチン siRNA によるスパスチン発現抑制。

PLL 上、あるいはラミニン上に培養した Neuro2A 細胞にスパスチン siRNA をトランスフェクトし、突起伸長と細胞移動を測定した。どちらの基質上においても、スパスチンを抑制された細胞が伸ばす突起はコントロールに比べて有意に短かった。また、ラミニン上で移動する速度は、スパスチン発現を抑制することによって低下した。



siRNA によるスパスチン抑制の突起伸長及び細胞移動に対する影響。

以上の結果より、神経細胞の中心体はそのほかの細胞の中心体とは構成成分にも、働きにも違いがあることが明らかになった。すなわち、神経細胞では微小管アンカータンパクが中心体から消失し、微小管は中心体から遊離している。中心体から遊離した微小管アンカータンパクは樹状突起に移動し、樹状突起の微小管をアンカーすることによって、樹状突起特有の微小管配列を作りだしていると考えられる。また、中心体から微小管を切り出す微小管切断酵素の働きが神経細胞の移動と突起伸長に大切であることが示された。

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)

① Kawabata W, Yonezawa S, Hayashi K. (2012) Rear-side Localization of the Centrosome in Migrating Neuroblastoma Neuro-2a Cells and Its Roles in Process Elongation. *Develop. Neurosci.* 査読有り in press
DOI:10.1159/000338599

② Fujiwara MT, Yoshioka Y, Hirano T, Kazama Y, Abe T, Hayashi K. Itoh R. (2012) Visualization of plastid movement in the pollen tube of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.* 査読有り 7:34-37.

③ Ohama Y, Hayashi K. (2009) Relocalization of a microtubule-anchoring protein, ninein, from the centrosome to dendrites during differentiation of mouse neurons. *Histochem. Cell Biol.* 査読有り 132:515-524.
DOI 10.1007/s00418-009-0631-z

[学会発表] (計6件)

① 林 謙介、新村友里、網中裕一
移動性ニューロンの先導突起形成と GSK3
第33回日本神経科学大会 2010年9月2日～4日 神戸コンベンションセンター

② 平田一人、大浜勇作、林謙介
ニューロンの樹状突起形成における微小管アンカー蛋白の関与
日本動物学会 第80回静岡大会 2009年9月17～20日

③ 河端 渉、林 謙介
神経系細胞 Neuro2a の細胞移動による突起形成
日本動物学会 第80回静岡大会 2009年9月17～20日

④ 新村友里、林 謙介
高い移動能を有する内側基底核原基ニューロンの極性形成
第79回日本動物学会大会 2008年9月5日 福岡大学

⑤ Hiroshi Shinohara, Kensuke Hayashi, Takai Miyata, Masanori Takahashi, Noriko Osumi
Downregulation of Ninein at the Apical Side of Neuroepithelial Cells of the Pax6

Mutant

第42回日本発生生物学会大会 2008年5月28-31日 新潟、朱鷺メッセ

⑥ Yusaku Ohama, Kazuto Hirata, Kensuke Hayashi

Gamma tubulin and microtubule-anchor protein in the dendrite development
第42回日本発生生物学会大会 2008年5月28-31日 新潟 朱鷺メッセ

[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

<http://pweb.cc.sophia.ac.jp/khayashi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 謙介 (HAYASHI KENSUKE)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：50218567