

## 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4月13日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790197

研究課題名（和文） 神経細胞の移動と配置情報受容の同時可視化

研究課題名（英文） Functional relationship between reelin signal and layer formation during development of cerebral cortex

研究代表者

北口 哲也（KITAGUCHI TETSUYA）

早稲田大学・重点領域研究機構・准教授

研究者番号：60432374

研究成果の概要（和文）：

本研究は、新規プローブを開発し、‘いつ’、‘どこで’神経細胞がリーリンシグナルを受容しているのかを明らかにすることが目的です。私は、Dab1 がリン酸化されると SH2 ドメインと結合することを利用して、CFP と YFP を近接させ、紫色（440nm）の光で励起したときに、水色（480nm）の蛍光が黄色（530nm）へ変化するプローブを作製し、7%程度のレシオの変化率を達成しました。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the mechanism of laminar arrangement of neurons in the cerebral cortex, I have tried to generate the indicator of reelin signal, which controls the migration of neuron to form cortical structure in cerebrum. Since reelin signal causes phosphorylation of mouse disabled 1 (mDab1), the genetically encoded indicator is consisting of yellow fluorescent protein, mDab1, SH2 domain of Src, and cyan fluorescent protein. Phosphorylation of mDab1 by sodium orthovanadate causes 7% change in the ratio of yellow to cyan emissions in live cells. Therefore, the indicator is thought to be a promising for visualizing reelin signal.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成23年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：バイオイメーキング、大脳皮質、蛍光タンパク質、リン酸化、可視化、形態形成、顕微鏡技術、FRET

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の大脳皮質は脳表面に並行した6層

からなる層構造を持っています。それぞれの層には共通の形態と線維連絡をもつ神経細胞群が整然と配置されています。各層の神経細胞はほぼ同時期に脳室側で誕生し、髄膜側へと移動します。その際、新しく産まれた神経細胞は、すでに移動を終了した古い神経細胞を追い越して表層近くに配置されることにより6層の構造をとります(図1)。リーラーマウスとよばれる突然変異のマウスはリーリンと呼ばれる分泌タンパク質の異常により、大脳皮質層構造が逆転することが知られており、リーリンシグナルと呼ばれるシグナルが大脳皮質層構造形成の分子メカニズムに重要な役割を果たしていることが知られています。そこで私はこのリーリンシグナルを可視化したいと考えました。

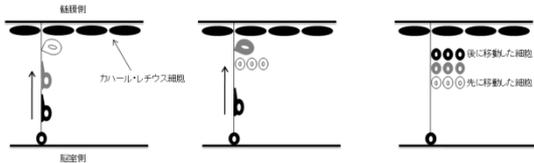


図1 大脳皮質形成過程における神経細胞の移動の様子

分泌タンパク質であるリーリンは髄膜側の辺縁帯にあるカハール・レチウス細胞で発現しています(図1)。神経細胞の産まれる脳室側から離れた場所にあるリーリンタンパク質を神経細胞はどうやって認識し、移動に利用しているのでしょうか? 現在までの仮説では、移動した神経細胞はリーリンタンパク質に出会うと移動をやめ、その場所に配置されるというストップシグナル説が有力です。しかしながら、リーラーマウスの脳室側にリーリンを発現させたトランスジェニックマウスでは部分的なレスキューが見られるという報告もあり(Magdaleno et al., Neuron 2002)、単なるストップシグナルであるということにも疑問が残ります。本研究で提案しているリーリンシグナルを可視化する技術はこれらの謎を解明することに貢献し、大脳皮質形成過程に関わる分子の機能を解明するためのブレイクスルーになると考えます。

## 2. 研究の目的

大脳皮質の層構造形成過程における神経細胞の移動および配置に関わる分子基盤は徐々に明らかにされつつあります。しかしながら、それらの分子が‘いつ’‘どこで’機能するのかというような時空間的制御機構については

未だ何もわかっておらず、この分野の理解が進まないことの一つとなっています。そこで私は新奇蛍光プローブを開発することにより、層構造形成シグナルと神経細胞の移動を脳スライス上で同時に可視化し、いつでもそのシグナルが活性化し、神経細胞が配置情報を受容しているのかを明らかにします。

## 3. 研究の方法

本研究ではリーリンシグナルを可視化するためにDab1のリン酸化を検出するFRET(蛍光共鳴エネルギー移動)型プローブを開発します。このプローブはDab1がリン酸化されるとSH2ドメインと結合することを利用して、CFPとYFPを近接させ、紫色(440nm)の光で励起したときに、水色(480nm)の蛍光から黄色(530nm)の蛍光に変化することを検出します(図2)。



図2 開発する FRET 型プローブ

(530nm)へ蛍光が変化することを検出します(図2)。これまで私の所属した研究室ではCrkIIを用いたチロシンリン酸化を検出するプローブを開発していることから(Kurokawa et al., J Biol Chem 2001)、Dab1のリン酸化を検出するプローブを開発することは可能であると考えます。そして移動する神経細胞へのプローブの導入方法は電気穿孔法を子宮内胎仔に使用し(Tabata et al., Neuroscience 2001)、スライスした胎仔の脳を共焦点顕微鏡で観察し、時空間的情報を獲得します。

## 4. 研究成果

私は候補となるプローブをまず6種類作製しました(図3)。これらのプローブはリン酸

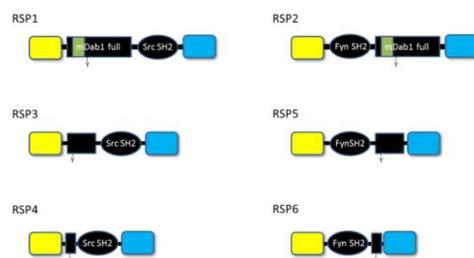


図3 リーリンシグナルプローブの候補(一部)

化される Dab1 をさまざまな長さにし、リン酸化した Dab1 に結合する SH2 ドメインは、Src と Fyn より使用します。また、これらのドメインをつなぐ順番を Dab1 を先にするものと、SH2 ドメインを先にするものを作製しました。そして、これらのプローブを HeLa 細胞や COS7 細胞などの培養細胞に導入し、蛍光顕微鏡でライブイメージングしました。リン酸化を惹起する刺激としては非特異的なリン酸化を誘導するオルソバナジウム酸ナトリウム (Na3VO4) を用いました。

Na3VO4 を添加し、440nm で励起したときの CFP、YFP の蛍光の ratio をイメージングしたところ、3 つの候補プローブがわずかに反応しました (図 4)。その変化率は 7% 程度であ

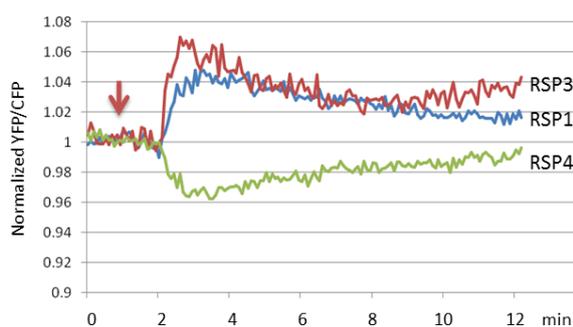


図 4 リン酸化によるレシオ変化

ったため、脳スライスに適用するには十分な変化率ではない可能性が考えられました。そこで、この 3 つの中で一番反応が大きかったプローブをさらに改変することにしました。リンカーの長さの変更、蛍光タンパク質に円順列変異体を適用、シアン、イエローの FRET ペアをグリーン、レッドの FRET ペアに変更などしてみました。最初の 7% 程度の変化率を超えるものを獲得することはできませんでした。

私はさらに Dab1 の長さの変更、使用する SH2 ドメインを変更するなどして、より変化率の高いプローブの作製を目指します。また、それと並行して、今回作製したプローブを脳スライスに導入し、リン酸化による変化を検出できるかどうか検討します。

##### 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 4 件)

①Mai Sato, Tetsuya Kitaguchi (co-first), Rika Numano, Kazuya Ikematsu, Masaki

Takeyama, Masayuki Murata, Ken Sato and Takashi Tsuboi. (2012): The small GTPase Cdc42 modulates the number of exocytosis-competent dense-core vesicles in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 420, 417-421.

②Ryoichi Mori, Kazuya Ikematsu, Tetsuya Kitaguchi, Sang Eun Kim, Momoko Okamoto, Takuya Chiba, Atsushi Miyawaki, Isao Shimokawa and Takashi Tsuboi. (2011): Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages is mediated by small GTPase Rab37. *Eur J Immunol* 41, 3230-3239.

③Ryo Aoki, Tetsuya Kitaguchi (co-first), Manami Oya, Yu Yanagihara, Mai Sato, Atsushi Miyawaki and Takashi Tsuboi. (2010): Duration of fusion pore opening and the amount of hormone released are regulated by myosin II during kiss-and-run exocytosis. *Biochem J* 429, 497-504.

④ Takashi Tsuboi, Tetsuya Kitaguchi (co-first), Satoshi Karasawa, Mitsunori Fukuda and Atsushi Miyawaki. (2010): Age-dependent preferential dense-core vesicle exocytosis in neuroendocrine cells revealed by newly developed monomeric fluorescent timer protein. *Mol Biol Cell* 21, 87-94.

[学会発表] (計 3 件)

①坪井貴司、北口哲也、唐澤智司、福田光則、宮脇敦史「神経内分泌細胞における優先的開口放出制御機構の解析」第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、平成 23 年 3 月、横浜。

②坪井貴司、北口哲也、唐澤智司、福田光則、宮脇敦史「産生時間依存的な開口放出機構の解析」第 87 回日本生理学会大会、平成 22 年 5 月、盛岡。

③青木亮、北口哲也、宮脇敦史、坪井貴司「ミオシン 2 は表層繊維状アクチンの再編成を介して融合孔の開いている時間を制御する」第 87 回日本生理学会大会、平成 22 年 5 月、盛岡。

[その他]

ホームページ等

[http://www.waseda.jp/WABIOS/index\\_ja.htm](http://www.waseda.jp/WABIOS/index_ja.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北口 哲也 (KITAGUCHI TETSUYA)  
早稲田大学・重点領域研究機構・准教授  
研究者番号：60432374

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし