

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500410

研究課題名(和文) 大脳皮質形成の基盤となるニューロン動態制御機構のライブ観察に基づく解明

研究課題名(英文) Live imaging analysis of molecular mechanisms underlying the neuronal morphogenesis in the developing cerebral cortex

研究代表者

榊原 明 (SAKAKIBARA, Akira)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号：20510217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は脳形成におけるニューロンの移動、樹状突起形成、神経軸索形成といった形態形成活動を細胞生物学的見地から解明することを目的としている。これまでに、ニューロン移動後期段階の細胞形態制御機構にアプローチするための発現時期遅延型遺伝子発現実験系構築に必要な情報として、胎生期マウス大脳皮質において、ニューロン特異的な転写プロモーターであるアルファチューブリン(Ta)プロモーター、NeuroDプロモーターが発現するタイミングを解析し比較を行った。その結果、NeuroDプロモーターによるCreの発現制御とTaプロモーターによる持続的な遺伝子発現系の組み合わせが有効であることが判った。

研究成果の概要(英文)：Forced expression of wild type or mutant molecules is a powerful tool for analyzing protein function in cells and it is important to restrict gene expression in specific cell type such as neurons. Although many proteins have been implicated in regulation of neuronal migration and polarization in the developing cerebral cortex, most described phenotypes were based on forced expression using constitutively active transcriptional promoters, which are also active in progenitors. This makes it difficult to analyze neuronal phenotypes in later stage. To develop a reliable expression system to validate the function of proteins in neurons, we have analyzed usability of transcriptional promoters in cortical neurons and progenitors. Expression patterns of several promoters including, EF-1, and CMV-actin chimeric, T1, NeuroD suggested that T1-driven strong neuronal expression triggered by NeuroD-Cre is a powerful tool for neuron-restricted expression of ectopic genes.

研究分野：神経科学

キーワード：ニューロン 細胞移動 軸索 樹状突起 大脳皮質形成

1. 研究開始当初の背景

哺乳類脳形成の基盤であるニューロンの移動、特徴的な細胞ドメイン（神経軸索、樹状突起）の形成を介した神経回路形成機構に関して、従来の研究は、(1) 固定された脳の標本におけるニューロン形態の観察に基づく研究（時間的連続性の欠如）、(2) 組織より解離し二次元の培養皿上で培養されたニューロンを利用した遺伝子操作、薬理学的手法に基づく研究（位置情報の消失）が主流であった。しかしながら、時々刻々と変化する発生過程の脳においては移動中のニューロン自体が脳原基の組織そのもの一部と化しており、そのような手法により得られる知見のみでは、極めて動的かつ複雑な生体環境下におけるニューロン移動、神経回路形成のメカニズムを正しく理解することは困難であろうと思われる。ゆえに、細胞形態制御の基盤となる分子メカニズムに関する解析についても、組織レベルでの形態形成が進行しつつある生きた組織の中で細胞動態ならびに細胞内器官のライブ観察に立脚したアッセイ系を用いて行なわれるべきである。近年、子宮内電気穿孔法によるマウス胎仔脳原基への遺伝子導入が可能となり、様々な変異分子の発現がニューロン移動に及ぼす影響を調べることが可能になった。しかし、現在、一般的に用いられている転写プロモーターによる遺伝子過剰発現系、ノックアウトマウスの解析系では、遺伝子発現開始、遺伝子機能欠損のタイミングが早すぎ、ニューロンが誕生する前の神経前駆細胞において発現が始まるため、神経前駆細胞の機能および移動初期の中間帯における多極型移動の過程を阻害してしまう場合に、より後期の皮質板に進入してからのロコモーション移動、樹状突起形成、軸索形成の制御メカニズムに関して分子レベルでの理解を進める上での妨げとなっていた。

2. 研究の目的

散発性ニューロン標識と共役した形での遅延型遺伝子発現システムを利用して、大脳皮質錐体ニューロンの移動後期段階、樹状突起形成、神経軸索形成の制御を司る分子メカニズムを分子レベルで解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 遅延型遺伝子発現システムの改良を目的として、ニューロン特異的なアルファチューブリン ($T\alpha$) プロモーター、NeuroD プロモーターと構成的転写プロモーターである EF-1 α プロモーター、神経系における外来遺伝子の発現に頻繁に利用されている CMV エンハンサーと β -actin プロモーターのキメラプロモーター、それぞれについて発現開始時期と発現強度の推移について比較検討する。

(2) 分化後のニューロンにおいて組換え酵素 Cre 依存的に shRNA の転写を制御可能なコンディショナルノックダウン系を構築し、ニューロンの形態形成に関与する遺伝子の機能を解析する。

4. 研究成果

本研究では、胎生期マウス大脳皮質において、ニューロン特異的な転写プロモーターであるアルファチューブリン ($T\alpha$) プロモーター、NeuroD プロモーターが発現するタイミングを解析し比較を行った。その結果、分化直後のニューロンにおける NeuroD プロモーターの発現開始時期は $T\alpha$ プロモーターと比較して有意に遅いが、発現強度に関しては一過性のピークを示すことから、ニューロン移動の後期に相当する、より分化したニューロンにおける持続的な遺伝子発現には適さないことが判明した。つまり、

Cre 依存的な遺伝子発現系において、NeuroD プロモーターによる Cre の発現制御と Ta プロモーターによる持続的な遺伝子発現系を組み合わせることが、ニューロン形態制御因子の過剰発現ならびに変異型分子を導入した細胞の表現型解析を進めるうえで有効であることが示唆された。また、Cre 依存的な shRNA 発現プラスミドの制御においても、NeuroD-Cre を利用することで、Ta-Cre と比較して、その発現開始時期を有意に遅らせることが出来ると考えられる。今後、これらの研究成果をニューロン移動後期段階の細胞形態制御機構にアプローチするための発現時期遅延型遺伝子発現実験系構築に応用してゆきたい。

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 9 件)

- ① Sakakibara A, Hatanaka Y. Neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Front Neurosci.* 2015 Apr 8;9:116. doi: 10.3389/fnins.2015.00116. eCollection 2015. Review. PubMed PMID: 25904841; PubMed Central PMCID: PMC4389351. 査読有
- ② Namba T, Kibe Y, Funahashi Y, Nakamuta S, Takano T, Ueno T, Shimada A, Kozawa S, Okamoto M, Shimoda Y, Oda K, Wada Y, Masuda T, Sakakibara A, Igarashi M, Miyata T, Faivre-Sarrailh C, Takeuchi K, Kaibuchi K. Pioneering axons regulate neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Neuron.* 2014 Feb19;81(4):814-29. doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.015. PubMed PMID: 24559674. 査読有
- ③ Okamoto M, Namba T, Shinoda T, Kondo T, Watanabe T, Inoue Y, Takeuchi K, Enomoto Y, Ota K, Oda K, Wada Y, Sagou K, Saito K, Sakakibara A, Kawaguchi A, Nakajima K, Adachi T, Fujimori T, Ueda M, Hayashi S, Kaibuchi K, Miyata T. TAG-1-assisted progenitor elongation streamlines nuclear migration to optimize subapical crowding. *Nat Neurosci.* 2013 Nov;16(11):1556-66. doi: 10.1038/nn.3525. Epub 2013 Sep 22. PubMed PMID: 24056697. 査読有

- ④ Sapir T, Levy T, Sakakibara A, Rabinkov A, Miyata T, Reiner O. Shootin1 acts in concert with KIF20B to promote polarization of migrating neurons. *J Neurosci.* 2013 Jul 17;33(29):11932-48. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5425-12.2013. PubMed PMID:23864681. 査読有

- ⑤ Sakakibara A, Ando R, Sapir T, Tanaka T. Microtubule dynamics in neuronal morphogenesis. *Open Biol.* 2013 Jul 17;3(7):130061. doi: 10.1098/rsob.130061. Review. PubMed PMID: 23864552; PubMed Central PMCID: PMC3728923. 査読有

- ⑥ Sakakibara A, Sato T, Ando R, Noguchi N, Masaoka M, Miyata T. Dynamics of centrosome translocation and microtubule organization in neocortical neurons during distinct modes of polarization. *Cereb Cortex.* 2014 May;24(5):1301-10. doi: 10.1093/cercor/bhs411. Epub 2013 Jan 10. PubMed PMID: 23307632. 査読有

- ⑦ Pérez-Martínez FJ, Luque-Río A, Sakakibara A, Hattori M, Miyata T, Luque JM. Reelin-dependent ApoER2 downregulation uncouples newborn neurons from progenitor cells. *Biol Open.* 2012 Dec 15;1(12):1258-63. doi: 10.1242/bio.20122816. Epub 2012 Oct11. PubMed PMID: 23259060; PubMed Central PMCID: PMC3522887. 査読有

- ⑧ Xie MJ, Yagi H, Kuroda K, Wang CC, Komada M, Zhao H, Sakakibara A, Miyata T, Nagata K, Oka Y, Iguchi T, Sato M. WAVE2-Abi2 complex controls growth cone activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration. *Cereb Cortex.* 2013 Jun;23(6):1410-23. doi: 10.1093/cercor/bhs123. Epub 2012 May 22. PubMed PMID: 22617848. 査読有

- ⑨ Nakamuta S, Funahashi Y, Namba T, Arimura N, Picciotto MR, Tokumitsu H, Soderling TR, Sakakibara A, Miyata T, Kamiguchi H, Kaibuchi K. Local application of neurotrophins specifies axons through inositol 1,4,5-trisphosphate, calcium, and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Sci Signal.* 2011 Nov 15;4(199):ra76. doi: 10.1126/scisignal.2002011. PubMed PMID: 22087032. 査読有

〔学会発表〕(計 19 件)

① Sakakibara, A. "Rear accumulation of actin underlies nucleus-centrosome inversion type of nucleokinesis in migrating neocortical neurons" (ASCB2014, Philadelphia, USA, December 8th, 2014) ポスター

② 榑原明、中野彰人、野口奈美子、黒田麻衣子、正岡実、宮田卓樹：大脳皮質ニューロンの移動と極性化における微小管の機能(第66回日本細胞生物学会大会、奈良新公会堂(奈良)、2014年、6月13日)ポスター

③ Sakakibara, A., Ando, R., Noguchi, N., Kuroda, M., Masaoka, M., Miyata, T. "Microtubule regulation of neuronal migration and polarization in the developing mouse cerebrum" (ASCB2013, New Orleans, USA, December 17th, 2013) ポスター

④ 榑原明、安藤良太、野口奈美子、黒田麻衣子、正岡実、宮田卓樹：胎生期マウス大脳皮質ニューロンの移動と極性化における微小管の機能(第36回日本分子生物学会年会、神戸コンベンションセンター(神戸)、2013年、12月3日)ワークショップ口演

⑤ Sakakibara, A., Ando, R., Noguchi, N., Kuroda, M., Masaoka, M., Miyata, T. "Microtubule regulation of neuronal migration and polarization in the developing mouse cerebrum" (EMBO 2013, Amsterdam, Netherlands, September 12th, 2013) ポスター

⑥ 榑原明、安藤良太、夫馬裕太、野口奈美子、黒田麻衣子、正岡実、宮田卓樹：大脳皮質ニューロンの移動と極性化における細胞質微小管の機能(Neuro2013、京都国際会館(京都)、2013年、6月22日)ポスター

⑦ 榑原明、安藤良太、夫馬裕太、野口奈美子、黒田麻衣子、正岡実、宮田卓樹：大脳皮質ニューロンの移動と極性化における細胞質微小管の機能(第65回日本細胞生物学会大会、ウイंकあいち(名古屋)、2013年、6月21日)シンポジウム口演&ポスター

⑧ Sakakibara, A., Ando, R., Sato, T., Noguchi, N., Masaoka, M., Miyata, T. "Microtubule dynamics in neocortical neurons during distinct modes of migration and polarization in the developing mouse cerebrum" (ASCB2012 Annual Meeting, San Francisco, USA, December 16th, 2012) ポスター

⑨ Sakakibara, A., Ando, R., Sato, T., Noguchi, N., Masaoka, M., Miyata, T. "Microtubule dynamics in neocortical neurons during distinct modes of migration and polarization in the developing mouse cerebrum" (EMBO2012 Annual Meeting, Nice, France, September 23th, 2012) ワークショップ口演

⑩ 榑原明、安藤良太、佐藤俊之、野口奈美子、正岡実、宮田卓樹：ニューロン移動と極性化における細胞質微小管の機能(第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場(名古屋)、2012年、9月18日)口演

⑪ 宮田卓樹、三輪貴之、榑原明、川口綾乃、橋本光広：小脳プルキンエ細胞を生み出す前駆細胞の挙動についての研究(第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場(名古屋)、2012年、9月18日)ポスター

⑫ Sakakibara, A., Ando, R., Sato, T., Noguchi, N., Masaoka, M., Miyata, T. "Dynamics of centrosome and microtubule plus ends in neocortical neurons during migration and axon formation in situ" (EMBO Conference Series Microtubules: Structure, Regulation and Functions, Heidelberg, Germany, May 24th, 2012) ポスター

⑬ 榑原明、安藤良太、佐藤俊之、野口奈美子、正岡実、宮田卓樹：ニューロン移動と極性化における細胞質微小管の機能(第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、山梨大学(甲府)、2012年、3月28日)シンポジウム口演

⑭ 榑原明、安藤良太、佐藤俊之、野口奈美子、正岡実、宮田卓樹：Function of centrosome and cytoplasmic microtubules in polarization of neocortical neurons during the 3D migration and process formation in situ(第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(横浜)、2011年、12月13日)口演

⑮ Sakakibara, A., Sato, T., Ando, R., Masaoka, M., Miyata, T. "Dynamics of centrosome and microtubule plus ends during migration and process formation in neocortical neurons in situ" (The 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, USA, November 11th, 2011) ポスター

⑯ Sakakibara, A., Ando, R., Sato, T., Noguchi, N., Masaoka, M., Miyata, T. "Function of centrosome and cytoplasmic microtubules in polarization of

neocortical neurons during the 3D migration and process formation in situ” (The 26th European Cytoskeletal Forum Meeting, Stresa, Italy, October 30th, 2011) ポスター

⑰ 榑原明、佐藤俊之、安藤良太、正岡実、宮田卓樹：大脳皮質錐体ニューロンの移動と突起形成における微小管動態 (第 34 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜 (横浜)、2011 年、9 月 16 日) 口演

⑱ 榑原明、佐藤俊之、安藤良太、正岡実、宮田卓樹：大脳皮質錐体ニューロンの移動・極性化における微小管細胞骨格の機能 (第 63 回日本細胞生物学会大会、北海道大学 (札幌)、2011 年、6 月 29 日) ポスター

⑲ Sakakibara, A., Sato, T., Ando, R., Masaoka, M., Miyata, T. “Centrosome dynamics in neocortical pyramidal neurons during the transition of migration mode from multipolar to locomotion, and formation of axon-like fiber” (Cortical Development 2011, Chania, Greece, May 21st, 2011) ポスター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榑原 明 (SAKAKIBARA, Akira)
中部大学・生命健康科学部・准教授
研究者番号：20510217

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし