

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24700357

研究課題名(和文)脳組織構築を制御する Reelin-Dab1シグナルによる樹状突起形成機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the dendrite formation mechanism by Reelin-Dab1 signaling pathway

## 研究代表者

本田 岳夫 (Honda, Takao)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30365225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々はDab1が樹状突起形成に関与し核移行する事を明らかにした事から、Dab1が遺伝子発現制御を介して樹状突起形成を行う仮説を考えた。dab1ノックダウンと同時に候補分子を発現させた結果、樹状突起が一部正常に形成された為、候補分子がDab1の下流分子である可能性が示唆された。候補分子のタンパク質量はreelerマウスで顕著な差が無かった為、候補分子によるDab1シグナルの増強の可能性を検討した。候補分子をノックダウン後にReelin刺激を行い、Dab1のチロシンリン酸化量を観察したが、顕著な変化が観察されなかったことから、他の制御機構によって樹状突起形成の制御が行われている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：As we have found that Dab1 is involved in dendrite formation and is subject to nucleocytoplasmic shuttling, we hypothesized that Dab1 might regulate the dendrite formation through the regulation of gene expression. To examine this hypothesis, we expressed a candidate gene to dab1-knockdown neurons, and found that a candidate gene could partially rescue the abnormal dendrite formation. Because of no significant difference in Dab1 protein amount in reeler, we next examined whether the candidate molecule could enhance a putative dendrite formation signal by Dab1-signaling pathway. Dissociated neurons with or without knockdown plasmids against the candidate molecule were treated with Reelin, and Dab1 tyrosine phosphorylation, a plausible target of the candidate molecule, was compared. However, we could not detect a significant difference of the level, suggesting that the dendrite formation rescue effects by the candidate molecule might be caused by other regulation mechanism.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：Reelin Dab1 reeler yotari NLS NES 核細胞質間シャトリング 樹状突起形成

## 1. 研究開始当初の背景

発生期の脳新皮質において脳室帯で誕生したニューロンは、脳表面に向かって移動し、辺縁帯直下で移動を終了させ、樹状突起を発達させた後、皮質と呼ばれる層構造を作る。これまで、辺縁帯にある Cajal-Retzius 細胞から分泌される Reelin が、ニューロンの細胞内の Dab1 をリン酸化し、ニューロンの移動や配置に大変重要な役割を果たしている事が、変異マウス (それぞれ *reeler* と *yotari*) の解析等から明らかにされてきた。しかしその後、Reelin-Dab1 シグナルがどのような分子に伝達され、どのようにニューロンの配置を制御し脳新皮質層形成に関与しているか、つまり Reelin シグナルのアウトプットが何であるのかは未だ明確な答えは得られておらず、神経発生分野の大きな未解決問題の一つとなっている (Honda et al., *Neurochem. Res.* 2011)。

我々は、*dab1* に対する siRNA (small interfering RNA) 発現ベクターをエレクトロポレーション法により子宮内の胎仔脳に導入し、*dab1* をノックダウンし、*in vivo* でのニューロンの移動、発達過程を詳細に観察した。その結果、通常は脳表面に向かい十数本分岐を行う樹状突起が、一、二本分岐を持つのみになり (Sekine, Honda, et al., *J Neurosci.*, 2011)、また生後発達するにつれて辺縁帯を避けるように樹状突起が配向する等、樹状突起の発達とガイダンスに異常が集中して観察された。この実験結果より、辺縁帯への樹状突起の発達・侵入が Reelin-Dab1 シグナルにより制御されている可能性が示唆された。樹状突起のガイダンス異常は *reeler* マウスで既に観察されていたが、ニューロンの配置異常に伴う二次的な異常とも考えられる為、Reelin シグナルそのものの影響であるのかは不明であった (Terashima et al., *J. Comp. Neurol.*, 1985)。しかしながら申請者の実験結果、さらに *reeler* マウス、*yotari* マウスでは主として樹状突起の発達によって形成される辺縁帯が形成されない事を考え合わせると、Reelin は Dab1 を通じて樹状突起の形成とガイダンスを制御する重要な役割を果たしている可能性が非常に高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

我々は、これまで細胞内タンパク質と考えられてきた Dab1 が、一つの核移行シグナル (Nuclear Localization Signal: NLS) と二つの核外輸送シグナル (Nuclear Export Signal: NES) を持ち、核と細胞質間を両方向に移動している核細胞質間シャトルタンパク質である事を明らかにした (Honda and Nakajima, *JBC*, 2006)。Dab1 が核に移行する事実を考え合わせると、“Reelin シグナルは移動を終えたニューロンに対して、Dab1 の核移行を介して何らかの遺伝子の発現制御を行い、それにより辺縁帯での樹状突起の

形成を促進・ガイダンスしている”、という仮説が可能性の一つとして考えられるようになった。

我々はこれまでの様々な研究結果に基づき、ある分子に注目した。特にこの分子をノックダウンしたニューロンの形態が辺縁帯を避けるように樹状突起が配向していること等、*dab1* をノックダウンしたニューロンの形態と酷似していることに我々は気がついた。そこで、Reelin シグナルの下流分子がこの候補分子であり、*dab1* をノックダウンした場合、その遺伝子発現量が減少しているのではないかと考え、*dab1* をノックダウンしたニューロンに、候補分子を同時に発現させた。その結果、樹状突起形成異常がレスキューされる事が明らかとなった。

Reelin-Dab1 シグナルと候補分子との、*in vivo* における実際のクロストークの有無や形式については現時点では不明である。クロストークがあるのならば、上記作業仮説のように遺伝子発現を介するもの、そうでないならば、タンパク質の細胞表面量の調整等が行われている可能性が考えられる。またクロストークがない場合でも、上記観察結果は Reelin-Dab1 シグナルによって活性化されるシグナルが、候補分子により活性化出来る可能性を示しており、どのようなメカニズムで候補分子が樹状突起の形成・ガイダンス機構をレスキューしたのかを解明することにより、Reelin-Dab1 シグナルによる樹状突起形成機構を理解することにつながると考えられる。

そこで本研究計画では、(1) Reelin-Dab1 シグナルと候補分子とのクロストークメカニズムを明らかにするとともに、(2) 候補分子がどのような分子メカニズムで *dab1* ノックダウンによる樹状突起形成・ガイダンス異常をレスキューしたのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

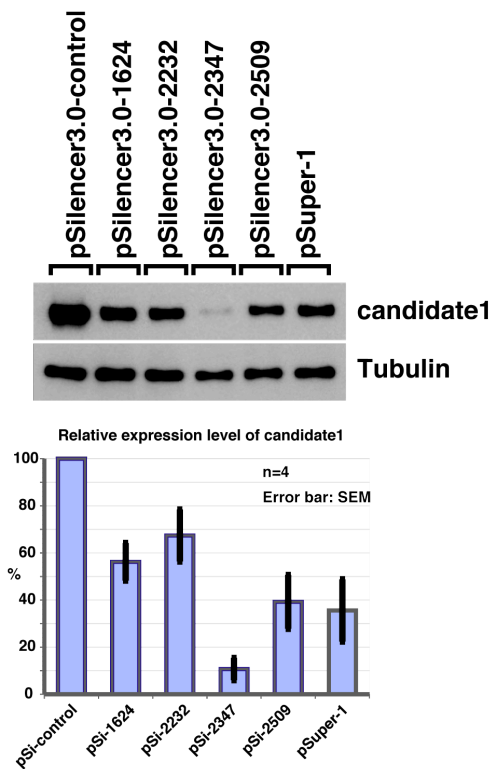
*dab1* ノックダウンによる樹状突起形成の異常は候補分子の強制発現によりレスキューされた。この観察結果より、*reeler*、*yotari* マウス、*dab1* ノックダウンニューロンでは候補分子のタンパク質量が減少していることが考えられる。Dab1 が候補分子のタンパク質量を制御するモデルについては、主に二つの可能性が考えられる。(1) 遺伝子発現を介する経路 (Reelin シグナルを受けた Dab1 が核内に移行して候補分子の発現を誘導する)、と (2) 遺伝子発現を介さない経路 (Reelin シグナルを受けた Dab1 が、候補分子の分解等を制御する) である。

これまでの研究で、*reeler* マウスの脳皮質の粗抽出液では、候補分子のタンパク質量に顕著な差は観察出来なかった為、タンパク質の局在化の制御の可能性は残されているが、タンパク質量や遺伝子発現量の制御ではない別のメカニズムで制御されている可能性が示唆された。そこで別のメカニズムとし

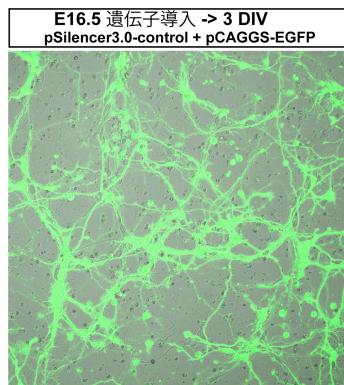
て、Reelin-Dab1 シグナルが候補分子により増強される可能性を考え、候補分子のノックダウンでニューロンを Reelin 刺激した際に Dab1 のリン酸化量が減少するか検討した。

#### 4. 研究成果

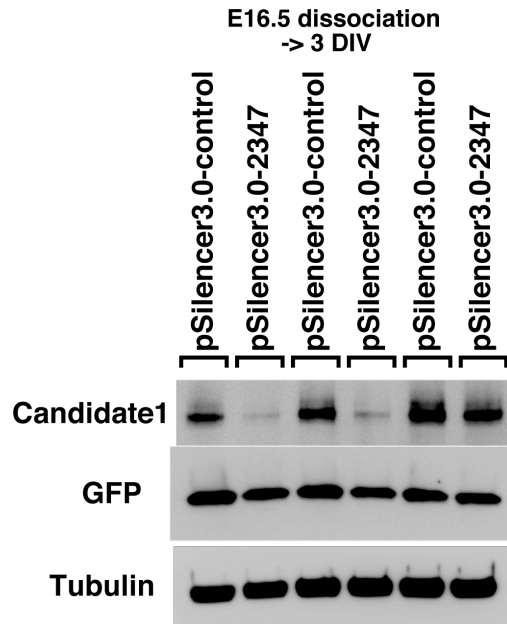
候補分子の働きを阻害する為に、候補分子に対するノックダウンベクターの作成を行った。コーディング領域に対する4つのターゲット部位を選択し、ノックダウン用の pSilencer3.0 ベクターに組み込んだ。ノックダウン効果を確認する為に、候補分子を発現する発現ベクターと共にノックダウンベクターをそれぞれ HEK293T 細胞に導入し、発現を確認した。その結果、pSilencer3.0-2347 ベクターが候補分子の発現を一割程度に抑制することが出来た。



次に、初代培養神経細胞に効率良く遺伝子導入する技術検討を様々に行い、胎生 16.5 日目の神経細胞に高効率に遺伝子導入する系を確立した。

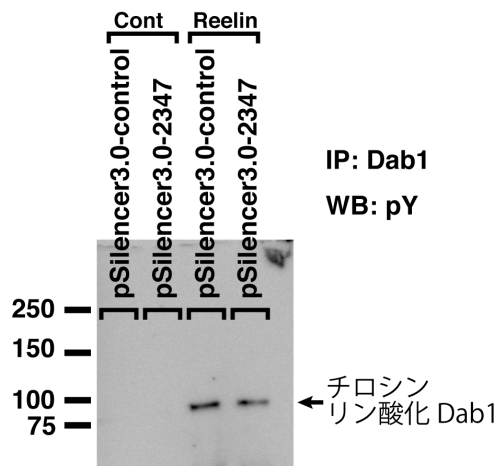


この実験系を用いて、神経細胞で実際に候補分子のノックダウンが引き起こされるか検討した所、多くの場合、高効率でノックダウンが引き起こされることが示された。



次に、候補分子をノックダウンした状態で、Reelin 刺激を行い、Dab1 のチロシンリン酸化量が変化するか解析を行った。胎生 16.5 日目の ICR マウスから大脳新皮質を切り出し、pSilencer3.0-control と pSilencer3.0-2347 ベクターを pCAGGS-EGFP と共に導入し、3 日間培養した。これらの神経細胞にコントロール用の培養上清と、Reelin を含む培養上清を 10 分間反応させた。神経細胞を溶解後、Dab1 に対する抗体で Dab1 を免疫沈降法により回収し、SDS-PAGE、Western blot により PVDF メンブレンに転写後、抗リン酸化チロシン抗体によりリン酸化チロシンを検出した。Control メディウムでは検出出来なかったチロシンリン酸化された Dab1 が、Reelin との反応では検出された。しかしながら、候補分子のノックダウン下でも Dab1 のチロシンリン酸化が同様に検出された。

E16.5 dissociation  
-> culture for 3 days  
-> stimulation for 10 min



この結果より、*dab1* ノックダウンによる樹状突起形成異常を候補分子がレスキューした仕組みについては、*Dab1* よりも下流で働く分子の活性が候補分子により増強等された結果、引き起こされた可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

(1) Shigeaki Kanatani, Takao Honda, Michihiko Aramaki, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, Mami Ishida, Daisuke H. Tanaka, Takeshi Kawauchi, Katsutoshi Sekine, Sayaka Kusuzawa, Takahiko Kawasaki, Tatsumi Hirata, Hidenori Tabata, Per Uhlen, Kazunori Nakajima, The COUP-TFII/Neuropilin-2 is a molecular switch steering diencephalon-derived GABAergic neurons in the developing mouse brain, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 査読有り, 112, 2015, E4985-94, 10.1073/pnas.1420701112

(2) Takao Kohno\*, Takao Honda\*, Ken-ichiro Kubo\*, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori, Importance of Reelin C-Terminal Region in the Development and Maintenance of the Postnatal Cerebral Cortex and Its Regulation by Specific Proteolysis, *The Journal of Neuroscience*, 査読有り, 35, 2015, 4776-4787, 10.1523/JNEUROSCI.4119-14.2015, \*: equal contributors

(3) Yuki Hirota, Ken-ichiro Kubo, Kei-ichi Katayama, Takao Honda, Takahiro Fujino, Tokuo T. Yamamoto, and Kazunori Nakajima, Reelin Receptors ApoER2 and VLDLR Are Expressed in Distinct Spatiotemporal Patterns in Developing Mouse Cerebral Cortex, *Journal of Comparative Neurology*, 査読有り, 523, 2015, 463-78, 10.1002/cne.23691

(4) Mai Yamakawa, Daisuke Ito, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Mariko Noda, Kazunori Nakajima, and Norihiro Suzuki, Characterization of the dipeptide repeat protein in the molecular pathogenesis of c9FTD/ALS, *Human Molecular Genetics*, 査読有り, 24, 2015, 1630-45, 10.1093/hmg/ddu576

(5) Katsutoshi Sekine, Takeshi Kawauchi, Ken-ichiro Kubo, Takao Honda, Joachim Herz, Mitsuharu Hattori, Tatsuo Kinashi, and

Kazunori Nakajima, Reelin controls neuronal positioning by promoting cell-matrix adhesion via inside-out activation of integrin  $\alpha 5\beta 1$ . *Neuron*, 査読有り, 76, 2012, 353-369, 10.1016/j.neuron.2012.07.020

(6) Sayaka Kusuzawa, Takao Honda, Yuko Fukata, Masaki Fukata, Shigeaki Kanatani, Daisuke H. Tanaka, and Kazunori Nakajima, Leucine-rich glioma inactivated 1 (*Lgil*), an epilepsy-related secreted protein, has a nuclear localization signal and localizes both to the cytoplasm and nucleus of the caudal ganglionic eminence neurons, *European Journal of Neuroscience*, 査読有り, 36, 2012, 2284-2292 10.1111/j.1460-9568.2012.08129.x

[学会発表] (計18件)

(1) Takao Honda and Kazunori Nakajima, Analysis of the role of *Dab1* nucleo-cytoplasmic transport for migration of excitatory neurons (*Dab1* の核細胞質間輸送が興奮性神経細胞の移動に果たす役割の解明)、第9回神経発生討論会・難治疾患共同研究拠点共同開催学術集会、2016年3月18-19日、東京医科歯科大学M&Dタワー鈴木章夫記念講堂(東京都文京区)

(2) Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori, C-terminal region of Reelin is required for development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its functions are regulated by specific proteolysis、新学術領域研究「神経細胞の多様性と大脳新皮質の構築」第3回国際シンポジウム「Neocortical Organization 3」、2016年2月11-12日、東京大学小柴ホール(東京都文京区)

(3) 本田岳夫、仲嶋一範、*Dab1* 核細胞質間シャトリングの大脳新皮質層形成における役割の解明、日本解剖学会関東支部 第103回学術集会、2015年11月7日、慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県横浜市)

(4) 本田岳夫、仲嶋一範、二つの核移行経路による細胞質 Dab1 量の適切な調節が興奮性神経細胞移動に重要である、第 50 回慶應ニューロサイエンス研究会「システムとしての脳の理解と介入」、2015 年 10 月 31 日、慶應義塾大学信濃町キャンパス、(東京都新宿区)

(5) Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori, Importance of Reelin C-terminal region in the development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its regulation by specific proteolysis, Society for Neuroscience, Neuroscience 2015 meeting, 2015 年 10 月 17-21 日、Chicago (U. S. A)

(6) 本田岳夫、仲嶋一範、二つの核移行経路による細胞質 Dab1 量の適切な調節が脳皮質ニューロンの移動に重要である、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28-31 日、神戸国際会議場・神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

(7) 河野孝夫、本田岳夫、久保健一郎、中野良美、土屋綾香、村上達郎、阪野英幸、仲嶋一範、服部光治、巨大分泌蛋白質リーリンの C 末端領域を介した脳皮質形成機構、第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会、2015 年 7 月 4 日、名古屋市立大学 (愛知県名古屋市)

(8) Mai Yamakawa, Daisuke Ito, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Mariko Noda, and Kazunori Nakajima, and Norihiro Suzuki, Evidence of a link between TDP-43 and dipeptide repeat protein in c9FTD/ALS, 第 56 回日本神経学会学術大会、2015 年 5 月 20-23 日、朱鷺メッセ (新潟県新潟市)

(9) Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori, The novel function of Reelin in the dendrite development and layer formation in the postnatal brain, Society for Neuroscience, Neuroscience 2014 Meeting, 2014 年 11 月 15-19 日、Washington, D. C. (U. S. A)

(10) 廣田ゆき、久保健一郎、本田岳夫、藤野貴広、山本徳男、仲嶋一範、リーリン受容体 ApoER2 と VLDLR の脳皮質形成過程における発現と機能、第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学学会大会、2014 年 9 月 29 日-10 月 1 日、奈良県文化会館・奈良県新公会堂 (奈良県奈良市)

(11) Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Tatsuro Murakami, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori, The novel proteolytic cleavage of Reelin near C-terminus regulates postnatal neuronal development, 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11-13 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(12) 本田岳夫、仲嶋一範、大脳新皮質層形成に必須の Dab1 は Importin 依存性または非依存性に核移行する、第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2013)、2013 年 6 月 20-23 日、国立京都国際会館、(京都府京都市)

(13) 久保健一郎、関根克敏、山川眞以、石井一裕、野田万理子、廣田ゆき、本田岳夫、林周宏、仲嶋一範、発生期脳皮質においてリーリンはそのシグナル下流分子を通して神経細胞の凝集を誘導する、第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2013)、2013 年 6 月 20-23 日、国立京都国際会館 (京都府京都市)

(14) 河野孝夫、本田岳夫、久保健一郎、中野良美、村上達郎、仲嶋一範、服部光治、脳の形成を司る細胞外因子リーリンのプロテオリシスによる機能制御機構の解明、平成 25 年度 生理学研究所 研究会「シナプス恒常性維持の分子基盤とその破綻」、2013 年 6 月 6-7 日、生理学研究所 (愛知県岡崎市)

(15) Ken-ichiro Kubo, Katsutoshi Sekine, Yuki Hirota, Mai Yamakawa, Mariko Noda, Kazuhiro Ishii, Ayako Kitazawa, Kanehiro Hayashi, Takao Honda, and Kazunori Nakajima, How does Reelin regulate neuronal layer formation in the developing cortex?, 第 55 回日本神経化学学会大会・第 11 回アジア太平洋神経化学学会 合同大会、2012 年 9 月 30-10 月 2 日、神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)

(16) 河野孝夫、本田岳夫、久保健一郎、村上達郎、中野良美、本間夏美、仲嶋一範、服部光治、リーリンの新規機能調節機構の解明、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

(17) 本田岳夫、仲嶋一範、大脳新皮質構築を制御する Dab1 の核移行メカニズムの解析、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

(18) 本田岳夫、仲嶋一範、大脳新皮質構築を制御する Dab1 の核移行メカニズムの解析、

第44回慶應ニューロサイエンス研究会、2012  
年6月2日、慶應義塾大学信濃町キャンパス  
(東京都新宿区)

[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]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本田 岳夫 (Takao Honda)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：30365225

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし