

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：33910

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640040

研究課題名(和文)脳組織内ニューロン移動メカニズム解明を目指した細胞内構造の多次元動態解析

研究課題名(英文)Analyses of dynamic movement of intracellular structures underlying neuronal migration in the developing brain

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体内を移動するニューロンで実際に機能している核転位機構を正しく理解するためには、脳の中を移動するニューロンの内部で細胞内構造の相対的な配置がどのように変化しているか明らかにする必要がある。本研究では、脳組織内のニューロン観察に供するための三波長蛍光ライブ観察系を確立し、核転位プロセスの段階ごとに微小管系とアクチン系との細胞内配置の変化を調べた。その結果、核転位の際に中心体と核の位相が逆転する局面において移動する核の後方にアクチン線維の集積が観察され、核が中心体を追い越すような局面においては、核を動かすための駆動力を発生するためにアクチン系が重要な働きをしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neuronal migration is an integrative process involving leading process formation, nucleokinesis, and rear retraction, all of which depend on the function of cytoskeletons. In this study, live imaging of microtubule (MT) and actin cytoskeletons in migrating neocortical neurons in slice culture was performed. In migrating neurons, two types of nucleokinesis were observed. The first one is the nucleus-centrosome (N-C) coupling type of nucleokinesis. Centrosome proceeded into the leading process prior to the N-C coupling type of nucleokinesis. Rear accumulation of F-actin was not necessarily observed during the N-C coupling type of nucleokinesis. The second type of nucleokinesis is the N-C inversion during which translocating nucleus overtake the centrosome. Rear accumulations of F-actin were observed when the N-C inversion occurred. These data suggest that the actomyosin system underlies the N-C inversion type of nucleokinesis during which the MT-dynein system could not pull the nucleus.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞移動 ニューロン 微小管 アクチン

1. 研究開始当初の背景

ニューロンの移動は発生期の脳における神経回路形成の基盤となる重要なプロセスである。研究開始当初、組織内を移動するニューロンが前方に先導突起と呼ばれる大きな突起を伸長させ、細胞核を先導突起内部に滑り込ませること(核転位)により細胞体を前方へと進めてゆくことが明らかにされていた。しかし、先導突起形成の制御機構、核転位の際に核を動かす駆動力の実態など、その分子メカニズムに関しては未知の部分が多く残されていた。とりわけ、核転位の駆動力発生系については微小管モーター系とアクトミオシン系が協調的に働いている可能性が高く、詳細な分子メカニズム解明のためには、それぞれの細胞骨格系と核の位置相関を高い時空間解像度で観察する必要があった。

2. 研究の目的

脳組織内をニューロンが移動する際には周囲にひしめく細胞を押し分けて核を前方へと転位させる必要があり、その破綻は脳奇形・精神発達遅滞などのヒト疾患の原因となる。ゆえに、ニューロンの核転位がどのようなメカニズムにより達成されているのか盛んに研究されてきた。これまでに、微小管モーター系、アクトミオシン系により発生する駆動力が重要であるという一見相反する観察が多数報告されているが、実際には核転位の段階ごとに異なる駆動力発生系を切り替えて利用している可能性もある。従来、技術的な制約から、微小管と核、アクチンと核それぞれの局在変化を個別に解析してきたが、本研究では三波長蛍光ライブ観察の手法で微小管・アクチン・核の位相変化を同時観察することにより、解析精度を飛躍的に向上させ、核転位機構の実態に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、近年幅広い分野の研究で使われている緑と赤の蛍光蛋白質を利用した二波長蛍光観察系に近赤外蛍光蛋白質 iRFP を融合した蛍光ライブモニター分子群を追加して、脳組織内におけるニューロンの細胞内構造を三波長蛍光ライブ観察することが可能な実験系を構築して利用した。これにより、中心体・アクチン・核の動態を同時観察することが可能となり、核転位プロセスの段階ごとに、微小管系とアクトミオシン系の細胞内配置を調べ、核転位への関与様式を調べることが出来た。三波長ライブ観察には以下に示す蛍光プローブを用いた。

赤：中心体 (PACT-mKO1)

緑：アクチン (Lifeact-EGFP)

青：核 (H2B-iRFP)

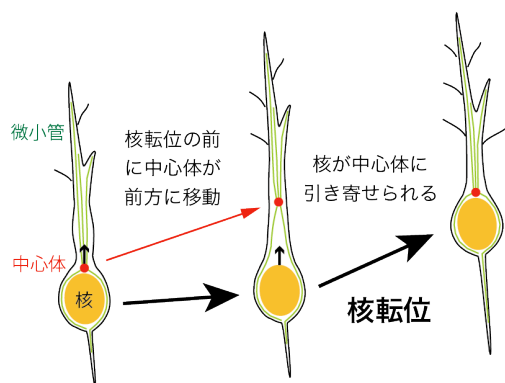
蛍光プローブの発現にはニューロン特異的かつ散発性に蛍光標識することが可能な発現プラスミドを用いた。観察には胎生 13 日目マウスの側脳室から脳室帯の神経前駆細胞に子宮内電気穿孔法で遺伝子導入を行い、胎内で 2 日間維持したのちに、遺伝子導入した神経前駆細胞から産生された後、脳表層に向けて移動しつつあるニューロンを用いた。子宮内電気穿孔の 2 日後に組織スライスを作成し、共焦点顕微鏡ステージ上で培養しながら 15 分間隔で蛍光観察した。得られた画像データをもとに中心体・アクチン・核の細胞内配置の変化を読み取るためのモニタージェを作成し解析した。

4. 研究成果

核転位プロセスの段階ごとに微小管系とアクトミオシン系の細胞内配置の変化を明らかにした。この際、核転位と中心体の動きから、核転位を次ページの図 1 に示す二つの型 (I 型と II 型) に分類して解析した。II 型の核転位では、中心体と核の位相が逆転する局面において、移動する核の後方に、アクチ

ンの集積が観察された (図2)。一方、I型の核転位では、核後方へのアクチンの集積は必ずしも観察されなかった。これらの結果は、核が中心体を追い越すような局面において、核を動かすための駆動力をアクトミオシン系が発生している可能性を示唆している。

I型：核転位に先立ち中心体が核の前方に移動しその後、核が中心体に追いつくケース



II型：核転位の際に、核が中心体を追い越す形で前方に移動するケース

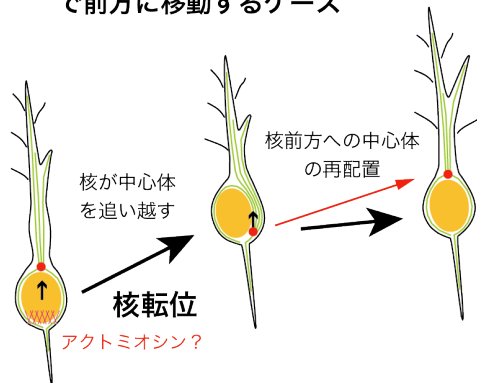


図1 大脳皮質ニューロンの移動において観察される核転位の様式

I型の場合、マイナス端指向性モーターであるダイニンが核を中心体(微小管マイナス端)に引き寄せることができる。しかし、II型では核が中心体を追い越す動きをダイニンがサポートすることは困難である。このような核転位の局面ではアクトミオシン系が主たる駆動力発生系として関与する可能性が高いと予想した。

これらの観察結果については、ASCB2014、EMBO2015などの国際学会にてポスター発表を行った。今後、データの信頼性を高めるために観察例数を増やすための実験を行い、結果を原著論文として発表する予定である。

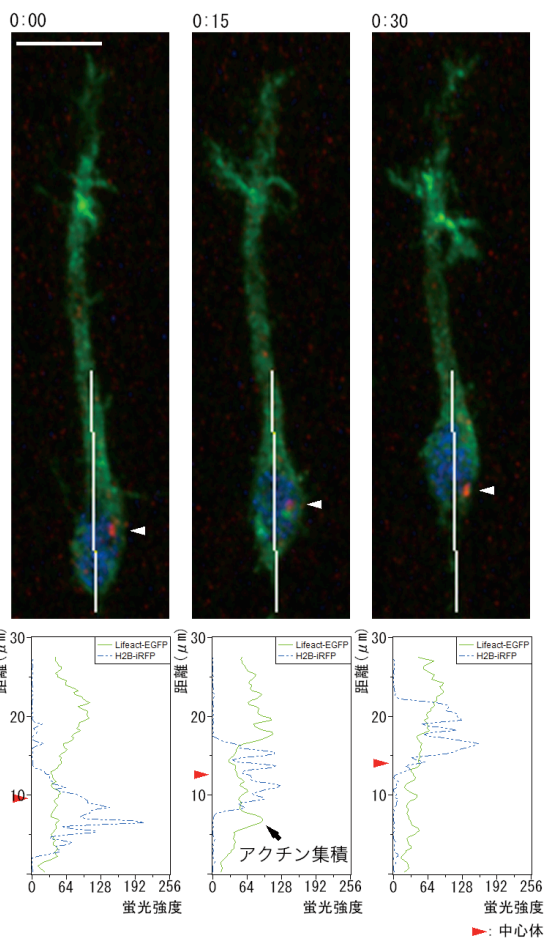


図2 II型の核転位で観察される核後方へのアクチンの集積

II型の核転位の局面では核の動きと同調して核後方へのアクチンの集積が観察された。

上段：15分間隔で取得した画像

赤：中心体 (PACT-mKO1)

緑：アクチン (Lifeact-EGFP)

青：核 (H2B-iRFP)

下段：上段の各パネルに示された白線に沿って、蛍光強度を測定したプロット

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 2 件)

① Shah B, Lutter D, Tsytsyura Y, Glyvuk N, Sakakibara A, Klingauf J, *Püschel AW. Rap1 GTPases are master regulators of neural cell polarity in the developing neocortex. *Cereb Cortex*. 2016 Jan 4. pii: bhv341. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26733533. 査読有

② *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

[学会発表] (計 3 件)

① Sakakibara A. "Rear accumulation of actin underlies nucleus-centrosome inversion type of nucleokinesis in migrating neocortical neurons" (EMBO2015 Annual Meeting, Birmingham, U.K., 2015年9月5~8日) ポスター

② Sakakibara A. "Rear accumulation of actin underlies nucleus-centrosome inversion type of nucleokinesis in migrating neocortical neurons" (ASCB2014 Annual Meeting, Philadelphia, U.S.A., 2014年12月7~10日) ポスター

③ 榑原明、安藤良太、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微小管の機能 (第66回日本細胞生物学会大会、奈良県新公会堂 (奈良県、奈良市)、2014年6月11~13日) 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