

(研究題目)

神経細胞移動機構の解析

Analysis of migration mechanism of neuron

(研究者)研究代表者	白尾智明	群馬大学医学部	教授
	Tomoaki Shirao	Gunma Univ. Sch. of Med	Professor
共同研究者	小林聡	慶應義塾大学医学部	助手
	Satoshi Kobayashi	Keio Univ. Sch. of Med	Research Associate
	三川隆	米国コーネル大学医学部	助教授
	Tkashi Mikawa	Cornell Univ. Med. Coll.	Associate Professor
	戸田正博	慶應義塾大学医学部	助手
	Masahiro Toda	Keio Univ. Sch. of Med	Research Associate
	池田圭郎	慶應義塾大学医学部	助手
	Keiro Ikeda	Keio Univ. Sch. of Med	Research Associate

Summary

Drebrins are novel actin-binding proteins. Since migrating neurons in both developing and adult brain express drebrins at high levels, it was indicated that microfilament system plays important roles for the regulation of cell migration. We analyzed cytoskeletal proteins in migrating neurons using cell culture system, and found that protein kinase regulated neuronal migration by changing microfilament organization.

4-1 研究目的

脳ではそれぞれ固有の場所に散りばめられた神経細胞が、複雑かつ正確な神経回路網を形成している。そしてこの回路網こそが、脳機能の基盤となっているのである。しかしながら神経細胞はそのようなそれぞれの固有の場所で作られるわけではなく、遠く離れた脳室壁の神経上皮とよばれるところで作られ、そこから本来のあるべき場所まで正確に移動しなければならないのである。本研究はこの細胞移動の機構を明らかにすることを目的とするものであり、脳機能の理解にとって極めて重要な意味を持つと考えられる。神経細胞の移動を解析する際には、その外因と内因の研究が重要であるが、従来は、誘導物質や細胞外マトリクスなどの外因にのみ研究の主眼がおかれてきた。その結果ラミニンやL1と呼ばれる物質などが重要な役割を果たしていることがわかってきたが、同じ外的環境下にあっても、細胞の状態によりその移動の様子が変化することも知られてきた。このような現象の機構を解析するためにはもはや細胞の中でどの様な現象がおきているのかを知らずに研究を進めるわけにはいかない。そこで本研究は細胞骨格に着目することにより、神経細胞移動の内的機構を解析し、神経細胞移動を内外両側面から理解しようとするものである。

4-2 研究経過及び成果

(1) 生体脳の組織化学的解析

生後6週、8週、10週のラットをエーテル麻酔後4%パラホルムアルデヒドで経心的に還流固定し、常法により厚さ16 μ mの連続凍結切片を作成した。この切片について、MAb 12E3抗体 (embryonic N-CAMに対する抗体) あるいはMAb M2F6抗体を用いて常法により間接蛍光抗体法を行った。

生後1日~3週のラットを用いて発生過程小脳の顆粒細胞の細胞移動を免疫組織化学により調べた。小脳顆粒細胞は小脳最表層の外顆粒層増殖帯で作られた後、小脳深層へ細胞移動を行い内顆粒層へ到達すると細胞移動を停止する。今回の研究によりこの細胞移動は二つの位相に別れることがわかった。すなわち(1)外顆粒層

前移動帯における小脳表層と水平な方向の移動時のようにドレブリンを強く発現しているが、胎児型NCAMの発現は見られない時期と(2)小脳表層と垂直に深層に向かって移動をしている時のように、ドレブリンの発現が細胞突起に局限してきて、胎児型NCAMの発現が強陽性になっている時期とに分けられた。

次に我々は生後6週から10週のラット脳における側脳室上衣下層の神経細胞移動について解析した。この細胞は嗅球に到達した後移動方向を直角に曲げ嗅球顆粒細胞となる。脳室壁に並行に移動中の細胞は小脳外顆粒層前移動帯の細胞と同様にドレブリンを強く発現しているが、胎児型NCAMの発現は弱い。ところが嗅球に到達後直角に移動方向を変え放射状に移動中の細胞は小脳分子層を移動する細胞と同様にドレブリンの発現が細胞突起に局限してきて、胎児型NCAMの発現が強陽性になっている。以上より細胞移動には二つの位相があり、培養系で細胞移動を解析する際にその違いに留意する必要があると考えた。

(2) 培養系を用いた細胞移動の解析

前述したように神経細胞移動には二つの位相があるので、我々が今回実験に用いた系(すなわち小脳顆粒細胞の再凝集培養系)がどちらの位相に属するのかを検討した。再凝集塊から移動してくる神経細胞はドレブリン強陽性であったが、胎児型NCAM陽性の細胞はほとんどすべてが凝集塊中に留まっていて外に出てこない。従ってこの系は小脳顆粒細胞の前移動帯中で起きている細胞移動のモデルになると考えられた。この系では24時間以上の培養を行うことができないので、再凝集塊ではなく小脳スライスを用いた組織培養を行うと培養開始後3日後に胎児型NCAM陽性細胞の移動も始まり、それと同時に放射状の細胞移動が接線方向に変化した。従って後者の細胞移動は小脳顆粒細胞の分子層中で起きている移動のモデルになると考えられたが、今回の研究ではまず、種々の細胞接着分子がまだあまり発現していない前移動帯中の移動に関する解析を主に行った。

我々が最初計画していたL1発現組み替え培養細胞を用いた実験系はL1分子の生体内における発現が分子層で特異的に起きていることから、今回はL1発現細胞を用いずに基質にラミニンを用いて解析を行った。従来の実験から培養系における細胞移動は突起に沿って起こるので、突起伸展の程度に左右されることがわかってきた。そこで我々は突起伸展の影響を除外するために、migration indexの概念を用いた。これは再凝集塊から伸びだした神経突起の最遠端までの距離をneuritic lengthとしその半分の長さより遠くまで移動している顆粒細胞の割合をmigration indexと規定した。そうするとラミニン上の小脳顆粒細胞のmigration indexは培養開始後4時間のまだ突起が短いときから、培養開始後12時間の突起伸展が最大に達したときまで、25%から30%の間でほぼ一定であった。ところが、これに燐酸化酵素阻害剤の一種であるK252aを加えるとmigration indexが2~3%と細胞移動が特異的に阻害された。この阻害はA-kinase, C-kinaseの阻害では認められなかった。またカルモデュリン阻害薬によっても阻害されなかったので、受容体型のチロシン燐酸化酵素(すなわちNGFなどの神経栄養因子の受容体)に対する阻害効果ではないかと考えられた。

次に我々はラミニン上で移動を活発に行っている細胞と、K252a投与により移動を停止した細胞における細胞骨格の差を検討した。移動細胞においてはアクチンフィラメントはほとんどがドレブリン結合型となり、細胞膜近傍に局在していた。ところが移動停止細胞ではドレブリンの発現が減弱し、ドレブリン非結合型のアクチンフィラメントが、細胞内全体に分布していた。ニューロフィラメント、微小管の分布及び量については際だった変化は起きていなかった。

(3) ドレブリン結合型アクチンの遺伝子導入による解析

ドレブリン結合型アクチンの性質を解析するために通常はドレブリンを発現していない線維芽細胞のL細胞にドレブリンAを遺伝子導入法により強制発現させた。野生株のL細胞ではトロポミオシンの結合したストレスファイバーがよく発達していたが、ドレブリン発現細胞においてはトロポミオシンはアクチンファイバーから追い出されてそのかわりにドレブリンが結合した。そのドレブリン結合型のアクチンファイバーはストレスファイバーとは異なり、太い、曲がったファイバーで分岐をしたり、円を作ったりすることがわかった。精製蛋白を用いて行った生化学的結合実験においてもアクチンフィラメントに対してドレブリンとトロポミオシンは競合的に結合することがわかった。今まで知られていなかったこのドレブリン結合型のアクチンファイバーの詳細な解析は現在実験中である。

4-3. 発表論文リスト

- 1 Masahiro Toda, Tomoaki Shirao, Shinsei Minoshima, Nobuyoshi Shimizu, Shigeo Toya and Keiichi Uyemura. "Molecular cloning of cDNA encoding the actin-binding protein, human drebrin E and Chromosomal mapping of drebrin gene #." *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 196: 468-472 (1993)
- 2 Hideo Asada, Keiichi Uyemura and Tomoaki Shirao. "Actin-binding protein, drebrin, accumulates in submembranous regions in parallel with neuronal differentiation." *J. Neurosci. Res.* 38: 149-159 (1994)
- 3 Tomoaki Shirao, Kensuke Hayashi, Ryoki Ishikawa, Kaoru Isa, Hideo Asada, Keirou Ikeda and Keiichi Uyemura. "Formation of thick curving bundles of actin by drebrin A expressed in fibroblasts." *Exp. Cell Res.* in press
- 4 Ryoki Ishikawa, Kensuke Hayashi, Tomoaki Shirao, Yinhuan Xue, Takashi Takagi, Yo Sasaki and Kazuhiro Kohama. "Drebrin, a development-associated brain protein from rat embryo, causes the dissociation of tropomyosin from actin filaments" *J. Biol. Chem.* in press
- 5 白尾智明「ドレブリン E 1、E 2、A」タンパク質化学講座 第 9 巻 脳・神経タンパク質、接着タンパク質 (野村靖幸編) 印刷中
()
- 6 井上洋、白尾智明 "神経突起形成機序について：神経細胞と遺伝子導入細胞の超微構造より" 神経組織の成長,再生,移植 5: 21-22 (1993)
- 7 中坪信昭、新井興夫、白尾智明、植村慶一、斎藤望 "Confocal顕微鏡による新生ニューロンの形態と同定" 神経組織の成長,再生,移植 5: 25-27 (1993)
- 8 池田圭朗、浅田英穂、白尾智明、戸谷重雄、植村慶一 "非神経細胞に発現したドレブリン蛋白が細胞骨格に及び細胞接着に及ぼす影響" 神経組織の成長,再生,移植 5: 33-34 (1993)
- 9 白尾智明、石川良樹、林謙介、小林聡、「ラットドレブリンのアクチン結合部位の解析」神経化学32:236-237 (1993)
- 10 池田圭朗、白尾智明、戸谷重雄、植村慶一「非神経細胞に発現したドレブリン蛋白が細胞接着に及ぼす影響」神経化学 32: 358-359 (1993)
- 11 小林聡、林謙介、伊佐かおる、井上洋、大江千廣、白尾智明「蛋白リン酸化酵素阻害薬の培養神経細胞移動に及ぼす影響」神経化学 印刷中
- 12 林謙介、石川良樹、何曉玲、白尾智明 「ラット大脳シナプス後部におけるドレブリン—アクチン複合体」神経化学 印刷中
- 13 石川良樹、佐々木洋、林謙介、白尾智明、小濱一弘 「ラット胎児ドレブリンの精製と解析」神経化学 印刷中