

Title	大脳新皮質層構造形成機構の解析：分泌タンパク質リーリンによる脂質ラフト制御
Sub Title	The analysis of cortical layer formation in the mammalian developing neocortex : regulation of lipid rafts by a secreted molecule 'Reelin'
Author	林, 周宏(Hayashi, Kanehiro)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2020
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2019. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究は、分泌タンパク質リーリンによる哺乳類大脳新皮質6層構造形成の制御メカニズムを解くことを目的に行った。リーリンは脳形成期より発現する分泌性タンパク質であり、その欠損マウスが大脳新皮質層構造の逆位を示すことから、層構造形成に必須の分子と考えられるが、リーリンによる層構造形成メカニズムは未だ説明できていない。申請者は、最近、リーリンにより神経細胞上の脂質ラフトにリーリンシグナル関連分子が集積することを見出した。そこで、リーリンによる脂質ラフト制御を明らかにすることが大脳新皮質層構造形成機構の糸口になると考え、研究を遂行した。</p> <p>まず、大脳新皮質発生期における脂質ラフトの分布を明らかにするために、脂質ラフトに豊富に存在するコレステロールを指標に組織染色を行った。その結果、コレステロールはリーリンが局在する脳辺縁帯に多く存在しており、リーリンと脂質ラフトの関連性が示唆された。続いて、マウス大脳皮質から単離した初代培養神経細胞にリーリンを添加し、その後に脂質ラフト画分を分離した。western blotにより、脂質ラフトに豊富に存在する糖脂質GM1をリーリン刺激有無で定量比較したところ、予想外に両者に差は認められなかった。このことは、リーリン刺激により、神経細胞上に新たに脂質ラフトが形成されるのではなく、すでに存在するマイクロ脂質ラフトが会合することを示唆する。次に、リーリン刺激により脂質ラフトに移行する分子の同定を行った。その結果、リーリン受容体に結合し、リーリンシグナルのハブタンパク質として機能するDab1、Dab1の下流に存在するPI3-Kinaseがリーリン刺激依存的に脂質ラフトに移行することが分かった。一方、同じくリーリンの下流分子であるC3G分子等のリーリン刺激による脂質ラフトへの移行は見られなかった。これらの結果は、リーリンシグナルカスケードにはラフト依存的と非依存的な機構があることを示唆している。</p> <p>I performed this study in order to understand How Reelin molecule regulate the formation of the 6-layered structure in the mammalian neocortex. Reelin is a secreted protein and expressed in the mammalian developing neocortex. Reelin-deficient mice show inverted cortical layers, which suggests Reelin is essential for the layer formation of the mammalian neocortex. However, its regulatory mechanism has not been understood. Recently, I found that Reelin induce accumulation of its downstream molecule into lipid rafts onto neurons. Then I performed the study to analyze the regulatory mechanism of lipid rafts by Reelin, which may be a cue for elucidating of the mechanism of layer formation in the mammalian developing neocortex.</p> <p>At first, in order to clarify the distribution of lipid rafts in the mouse developing neocortex, I conducted the staining of a brain section against the cholesterol which is rich in lipid rafts. The result shows cholesterol was rich in the marginal zone where Reelin is secreted, which may suggest association of Reelin with lipid rafts. Next, we exposed Reelin-containing medium to the primary cultured neurons from embryonic mouse cortex, then the lipid raft fraction was collected. The quantitative analysis of the ganglioside 'GM1' which is also rich in lipid rafts showed no difference between Reelin-stimulated and Mock-stimulated neurons, suggesting Reelin does not induce the synthesis of the novel lipid raft, but assembly of micro lipid rafts. Finally, I investigated molecules to translocate into lipid rafts by the Reelin stimulation. I identified Dab1 which is a hub protein on downstream of Reelin and PI3-kinase which is a downstream protein of Dab1. On the other hand, another Reelin-downstream molecules such as C3G were not translocated into lipid rafts. A series of results indicate Reelin transmit some signals via lipid rafts.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2019000007-20190311">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2019000007-20190311</a>

研究代表者	所属	医学部基礎教室	職名	専任講師	補助額	500（特B）千円
	氏名	林 周宏	氏名（英語）	Kanehiro Hayashi		
研究課題（日本語）						
大脳新皮質層構造形成機構の解析—分泌タンパク質リーリンによる脂質ラフト制御—						
研究課題（英訳）						
The Analysis of cortical layer formation in the mammalian developing neocortex –Regulation of lipid rafts by a secreted molecule ‘Reelin’ –						
1. 研究成果実績の概要						
<p>本研究は、分泌タンパク質リーリンによる哺乳類大脳新皮質6層構造形成の制御メカニズムを解くことを目的に行った。リーリンは脳形成期より発現する分泌性タンパク質であり、その欠損マウスが大脳新皮質層構造の逆位を示すことから、層構造形成に必須の分子と考えられるが、リーリンによる層構造形成メカニズムは未だ説明できていない。申請者は、最近、リーリンにより神経細胞上の脂質ラフトにリーリンシグナル関連分子が集積することを見出した。そこで、リーリンによる脂質ラフト制御を明らかにすることが大脳新皮質層構造形成機構の糸口になると考え、研究を遂行した。</p> <p>まず、大脳新皮質発生期における脂質ラフトの分布を明らかにするために、脂質ラフトに豊富に存在するコレステロールを指標に組織染色を行った。その結果、コレステロールはリーリンが局在する脳辺縁帯に多く存在しており、リーリンと脂質ラフトの関連性が示唆された。続いて、マウス大脳皮質から単離した初代培養神経細胞にリーリンを添加し、その後脂質ラフト画分を分離した。western blotにより、脂質ラフトに豊富に存在する糖脂質 GM1 をリーリン刺激有無で定量比較したところ、予想外に両者に差は認められなかった。このことは、リーリン刺激により、神経細胞上に新たに脂質ラフトが形成されるのではなく、すでに存在するマイクロ脂質ラフトが会合することを示唆する。次に、リーリン刺激により脂質ラフトに移行する分子の同定を行った。その結果、リーリン受容体に結合し、リーリンシグナルのハブタンパク質として機能する Dab1、Dab1 の下流に存在する PI3-Kinase がリーリン刺激依存的に脂質ラフトに移行することが分かった。一方、同じくリーリンの下流分子である C3G 分子等のリーリン刺激による脂質ラフトへの移行は見られなかった。これらの結果は、リーリンシグナルカスケードにはラフト依存的と非依存的な機構があることを示唆している。</p>						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
<p>I performed this study in order to understand How Reelin molecule regulate the formation of the 6-layered structure in the mammalian neocortex. Reelin is a secreted protein and expressed in the mammalian developing neocortex. Reelin-deficient mice show inverted cortical layers, which suggests Reelin is essential for the layer formation of the mammalian neocortex. However, its regulatory mechanism has not been understood. Recently, I found that Reelin induce accumulation of its downstream molecule into lipid rafts onto neurons. Then I performed the study to analyze the regulatory mechanism of lipid rafts by Reelin, which may be a cue for elucidating of the mechanism of layer formation in the mammalian developing neocortex.</p> <p>At first, in order to clarify the distribution of lipid rafts in the mouse developing neocortex, I conducted the staining of a brain section against the cholesterol which is rich in lipid rafts. The result shows cholesterol was rich in the marginal zone where Reelin is secreted, which may suggest association of Reelin with lipid rafts. Next, we exposed Reelin-containing medium to the primary cultured neurons from embryonic mouse cortex, then the lipid raft fraction was collected. The quantitative analysis of the ganglioside ‘GM1’ which is also rich in lipid rafts showed no difference between Reelin-stimulated and Mock-stimulated neurons, suggesting Reelin does not induce the synthesis of the novel lipid raft, but assembly of micro lipid rafts. Finally, I investigated molecules to translocate into lipid rafts by the Reelin stimulation. I identified Dab1 which is a hub protein on downstream of Reelin and PI3-kinase which is a downstream protein of Dab1. On the other hand, another Reelin-downstream molecules such as C3G were not translocated into lipid rafts. A series of results indicate Reelin transmit some signals via lipid rafts.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 （著者・講演者）	発表課題名 （著書名・演題）	発表学術誌名 （著書発行所・講演学会）	学術誌発行年月 （著書発行年月・講演年月）			
林 周宏、井上聖香、仲尾信彦、久保健一郎、安達泰治、仲嶋一範	分泌性糖タンパク質 Reelin による N-cadherin の制御機構	第 42 回日本神経科学大会・第 62 回日本神経化学会大会合同大会	2019 年 7 月			