慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Reelin-Dab1シグナルによる樹状突起の形成とガイダンス機構の解明
Sub Title	The analysis of Reelin-Dab1 signaling pathway for dendrite formation and guidance
Author	本田, 岳夫(Honda, Takao)
Publisher	
Publication year	2013
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2012.)
JaLC DOI	
Abstract	研究代表者らは、Dab1が樹状突起形成に関与し、核移行出来る事を明らかにした事から、Reelinは樹状突起形成に関わる遺伝子の発現制御をDab1の核移行を介して行うという仮説を考えた。dab1のノックダウンと同時に、下流で働くと考えられる候補分子を発現させた所、樹状突起が部分的に正常に形成され、候補分子がReelinシグナルの下流分子である可能性が示唆された。また、候補分子の樹状突起形成作用はリガンドとの結合により担われている可能性が示唆された。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2009～2011 課題番号：21700383 研究分野：総合領域 科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21700383seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2009～2011
課題番号：21700383
研究課題名（和文）　Ｒｅｅｌｉｎ－Ｄａｂ１シグナルによる樹状突起の形成とガイダンス機構の解明
研究課題名（英文）　The analysis of Reelin-Dab1 signaling pathway for dendrite formation and guidance
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

研究成果の概要（和文）：研究代表者らは、Dab1 が樹状突起形成に関与し、核移行出来る事を明らかにした事から、Reelin は樹状突起形成に関わる遺伝子の発現制御を Dab1 の核移行を介して行うという仮説を考えた。dab1 のノックダウンと同時に、下流で働くと考えられる候補分子を発現させた所、樹状突起が部分的に正常に形成され、候補分子が Reelin シグナルの下流分子である可能性が示唆された。また、候補分子の樹状突起形成作用はリガンドとの結合により担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 found that Dab1 is involved in dendrite formation and can translocate into nucleus, we hypothesized that Reelin regulates an expression of dendrite formation related genes through the Dab1 nuclear translocation. When we coexpressed dab1 knockdown vector and candidate gene expression vector, apical dendrite formation was partially normalized. Thus it was suggested that the candidate gene functions downstream of Reelin signaling pathway. Furthermore, the function of the candidate gene in the dendrite formation is dependent on its ligand-binding domain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域
科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学
キーワード：神経発生・分化・異常

１．研究開始当初の背景

発生期の大脳新皮質において、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（図 1)。

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大脳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（Tissir and Goffinet, Nat. Rev. Neurosci. 2003)。

研究代表者らは、*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、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(図 2)。

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はいたが、ニューロンの配置異常に伴う二次的な異常と考えられており、Reelin シグナルそのものの異常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、上記の実験結果と、*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 を通じて樹状突起形成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

研究代表者らは、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(Nulcear 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(研究代表者) and Nakajima, JBC, 2006, 図 3)。

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。

研究代表者らは、樹状突起形成に関与すると考えられているタンパク質について調査した。その結果、あるタンパク質をノックダウンあるいはノックアウトした際のニューロンの形態が、*dab1* をノックダウンした際に観察される形態と非常に似ていることに気がついた。Reelin-Dab1 シグナルとの関連は不明であったが、Reelin シグナルの下流分子がその候補分子であり、*dab1* をノックダウンした場合、その候補分子の遺伝子発現量が減少しているのではないかと考えた。そこで、*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所、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（図４）。

そこで本研究計画では、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ことを目標とした。

３．研究の方法

Dab1 による樹状突起形成の制御を説明する最も単純なモデルは、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し、樹状突起の発達とガイダンスを制御しているというものである。作業仮説通りであるならば、*reeler* 及び *yotari* マウスで候補分子のタンパク質量の差が変化していることが期待されるので、発現量の差の有無をウエスタンブロット解析や、免疫組織化学染色で比較する。差が検出された場合、タンパク質量の差を生むメカニズムとして、転写を制御する可能性と、タンパク質の生成・分解を制御する可能性がある。転写制御である可能性については定量的 PCR を行い、mRNA の量に差があるか検証する。

また、dab1 のノックダウンによる樹状突起形成異常を候補分子がどのようにレスキューしたのかを明らかにするため、候補分子の欠失変異体を用いてレスキューに必要な領域を探索する。

候補分子を介した Reelin-Dab1 シグナルは樹状突起形成に重要であると考えられるが、*reeler* や *yotari* マウスで観察されるニューロンの移動障害とどのように関連しているのかは明らかではない。つまり、Reelin シグナルの機能は樹状突起形成が主で、その異常により二次的に移動障害も引き起こされるのか、あるいは樹状突起形成以外にも、移動に関わる機能がある為に配置異常が起こるのかを区別出来ていない。そこで、*reeler* マウスに候補分子をエレクトロポレーションにより導入し、候補分子が *reeler* マウスの移動障害をレスキューするか解析し、候補分子が樹状突起形成を促進する作用以外にニューロンの移動にも関与しているか検証する。

図 1

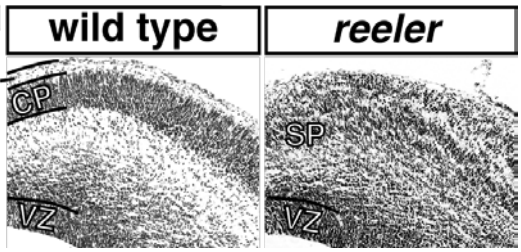


図2

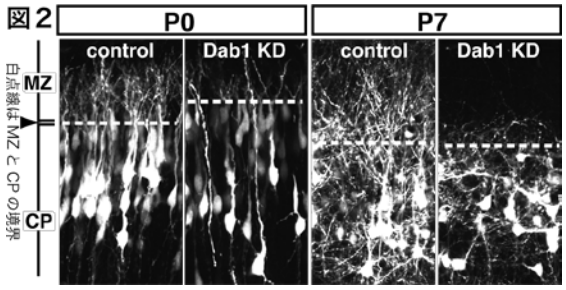


図3

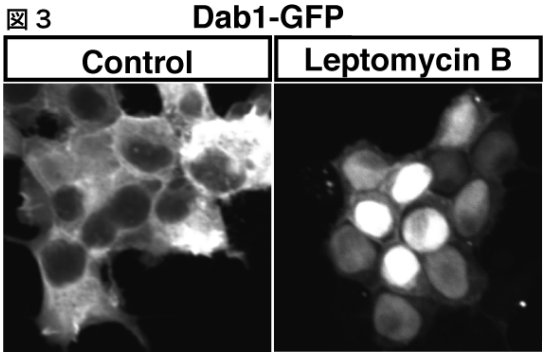
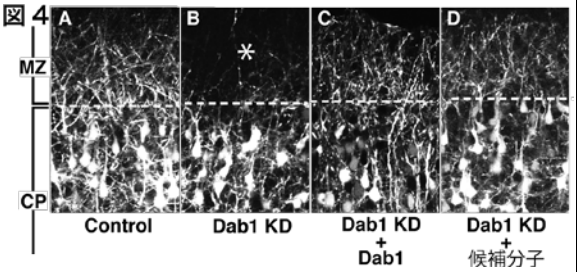


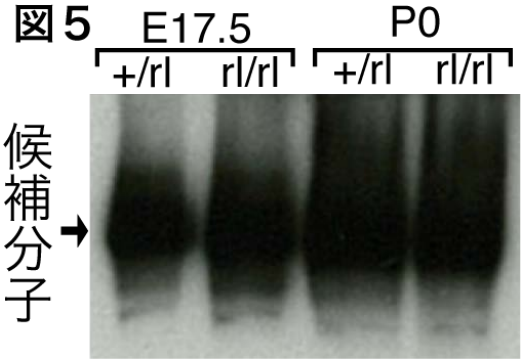
図4



４．研究成果

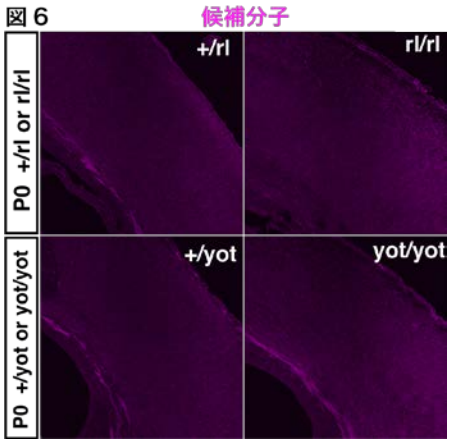
候補分子の *reeler* マウスに於けるタンパク質量の変化の有無を検討する為、胎生 17.5 日（E17.5）と生後 0 日（P0）の *reeler* マウス（*rl/rl*）とヘテロ接合マウス（*+/rl*）の大脳皮質を切り出し、ウエスタンブロット解析を行った。その結果、タンパク質量には大きな差は検出されなかった（図５）。

図5



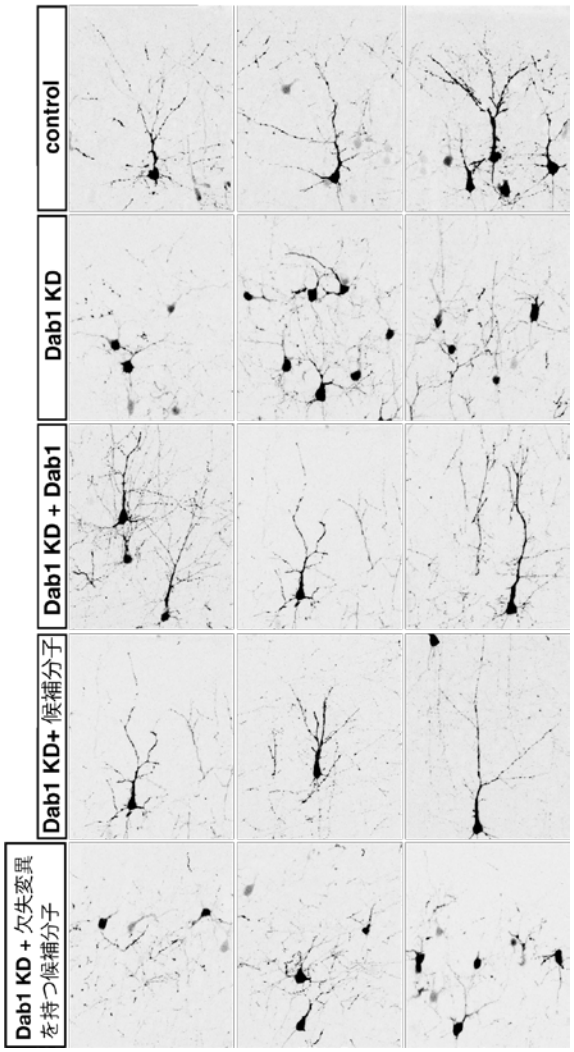
また、生後 0 日（P0）の *reeler* マウス（*rl/rl*）とヘテロ接合マウス（*+/rl*）及び、*yotari* マウス（*yot/yot*）とヘテロ接合マウス（*+/yot*）について候補分子の免疫組織化学染色を行ったが、染色強度に大きな差は観察されなかった。

図6



次に、*dab1* のノックダウンによる樹状突起形成の異常を候補分子がどのようにレスキューしたのかを明らかにする為、候補分子のリガンド結合部位を欠損させた変異体を用いて、レスキュー実験を行った（図６）。E14.5 日目のマウス脳にエレクトレポレーションを行い、生後７日目で固定した。この際、それぞれの細胞の形態を観察しやすくする為、細胞がまばらに蛍光タンパク質 GFP を発現するように工夫したベクターを導入した。

図7



ラベルされた細胞の形態については、先端樹状突起の長さの合計（図７）、先端樹状突起の分岐の数（図８）、先端樹状突起が辺縁帯と皮質板の境界線を乗り越えている細胞の割合（図９）について定量解析を行った。

尖端樹状突起の長さの合計については、Dab1 を用いたレスキュー実験でコントロールと同じ程度に回復、候補分子によるレスキュー実験では部分的に回復した。リガンド結合部位を欠く候補分子では Dab1 のノックダウン実験とほぼ同じ値であった。先端樹状突起の分岐の数についても同様な傾向が観察された。また、先端樹状突起が辺縁帯と皮質板の境界線を乗り越えている細胞の割合については、Dab1 によるレスキュー実験で部分的にレスキューされた。また、候補分子によるレスキュー実験でもわずかではあるが、レスキュー効果が確認された。一方、リガンド結合部位を欠損した候補分子については、コントロール実験より低い値が観察された。これらの実験結果より、候補分子による Dab1 ノックダウンレスキュー効果は候補分子とリガンドとの結合に依存している可能性が示唆された。

図 8

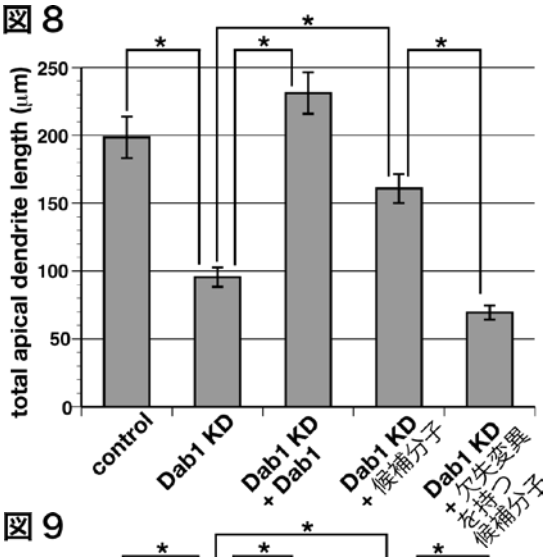


図 9

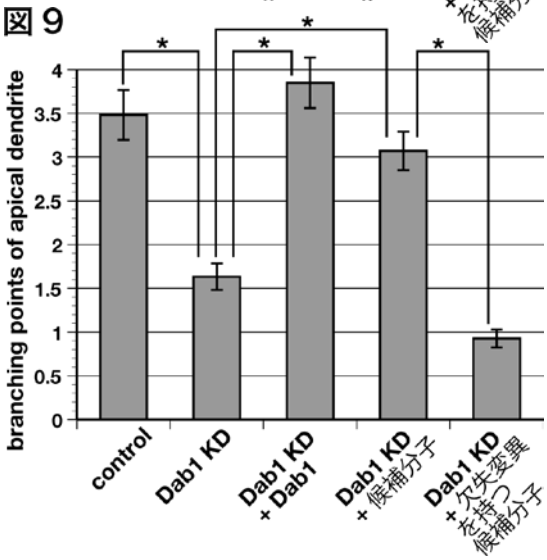
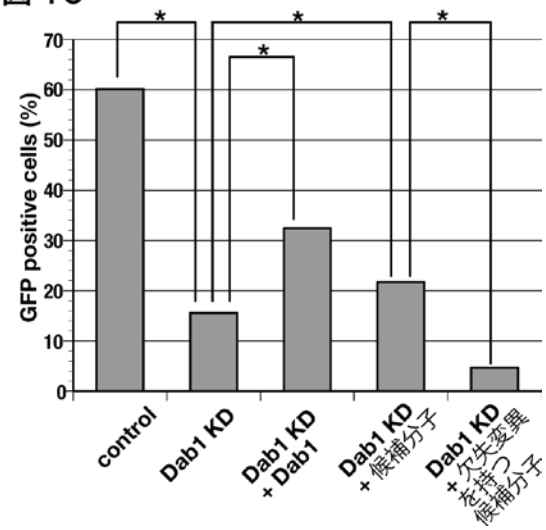
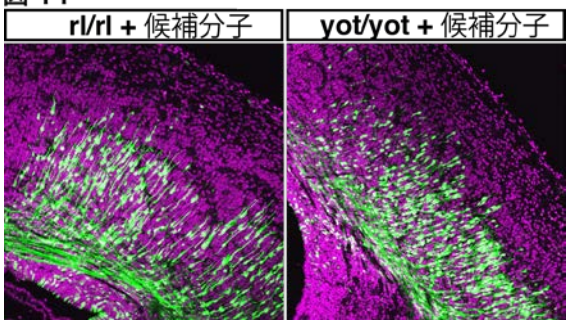


図 10



次に、*reeler* や *yotari* マウスで観察される移動障害を候補分子がレスキューすることが出るかを観察した。E14.5 日に GFP 発現ベクターと候補分子発現ベクターを同時に導入し、P0 で固定して GFP を発現している細胞の位置を観察した（図１０）。候補分子の発現では、*reeler*、*yotari* マウス両方で観察される細胞の移動障害をレスキューすることは出来なかった。

図 11



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 Takao Honda, Kazuma Kobayashi, Katsuhiko Mikoshiba, Kazunori Nakajima.
Regulation of Cortical Neuron Migration by the Reelin Signaling Pathway.
Neurochemical Research, 査読有り, 36, 2011, 1270-9

http://dx.doi.org/10.1007/s11064-011-0407-4

② Katsutoshi Sekine, Takao Honda, Takeshi Kawauchi, Ken-ichiro Kubo, Kazunori Nakajima.
The outermost region of the developing cortical plate is crucial for both the switch of the radial migration mode and the Dab1-dependent "inside-out" lamination in the neocortex.
The Journal of Neuroscience, 査読有, 31, 2011, 9426-39
http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0650-11.2011

〔学会発表〕(計３件)

① 本田岳夫、仲嶋一範“Analysis of the nucleocytoplasmic shuttling of Dab1 required for cortical structure formation(脳の皮質形成を制御するDab1の核移行メカニズムの解析)” 第54回日本神経化学会大会、2011年9月26-28日、加賀

② 本田岳夫、仲嶋一範“大脳皮質層形成を制御する Dab1 の核移行メカニズムの解析 (Analysis of the nuclear translocation mechanism of Dab1 required for layer formation of the cerebral cortex)”第33回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2010)、2010年9月2-4日、神戸

③ 本田岳夫、山崎真弥、長澤寿磨、阿部学、崎村建司、仲嶋一範“Analysis of the role of Dab1-nucleocytoplasmic shuttling for layer formation of cerebral cortex (Dab1 の核細胞質間シャトリングが大脳皮質層形成に果たす役割の解明)”第52回日本神経化学会大会、2009年6月22-24日、渋川 (伊香保)

〔その他〕
ホームページ等
http://plaza.umin.ac.jp/~Nakajima/index.html

６．研究組織

(1)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