

博士論文

論文題目 カルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ I α は
 大脳皮質興奮性神経細胞の放射状移動を制御する

氏 名 堀金 慎一郎

目次

第1章 論文内容の要旨

略称

第2章 序文

- 2.1 大脳皮質幼若期II/III層錐体細胞の放射状細胞移動
- 2.2 細胞小器官の周期的動態・配置変化に基づく Locomotion 様式移動
- 2.3 Ca^{2+} シグナリングによる神経細胞移動の制御
- 2.4 移動中細胞内 Ca^{2+} イメージングにおける問題点と解決策
- 2.5 GCaMP6s を用いた移動中細胞内 Ca^{2+} イメージング
- 2.6 神経細胞移動を制御する候補分子として CaMKI α が挙げられる

第3章 材料・方法

- 3.1 *In utero* electroporation
- 3.2 脳スライスの作製・培養
- 3.3 共焦点顕微鏡を用いた脳スライスのライブイメージング
- 3.4 脳スライスを用いた Ca^{2+} イメージング画像解析
- 3.5 CaMKI α flox マウスラインの樹立

3.6 ライブイメージングによる Locomotion 様式移動速度の定量

3.7 固定切片を用いた放射状細胞移動の定量

3.8 免疫組織染色法

第 4 章 結果

4.1 Locomotion 様式移動中の細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントは低速移動時に頻発する

4.2 Locomotion 様式移動中の細胞内 Ca^{2+} 上昇は一部 L-VDCC に依存し L-VDCC 活性の薬理的亢進により細胞移動速度が低下する

4.3 EGTA-AM の添加により、細胞内 Ca^{2+} 上昇イベント頻度・ベースラインでの細胞内 Ca^{2+} 濃度が共に減少し細胞移動速度が低下する

4.4 FPL 添加・EGTA-AM 添加の各々で移動中細胞の核形態が変化する

4.5 移動中細胞特異的 CaMKI α cKO により放射状移動が障害される

4.6 移動中細胞特異的 CaMKI α KD により移動速度が減少する

4.7 CaMKI α CA の強制発現により Locomotion 様式移動中の細胞移動速度が減少する

第 5 章 考察

5.1 Locomotion 様式移動における周期的な移動速度の変化と細胞内 Ca^{2+} 流入量の相関関係

5.2 周期的な細胞内 Ca^{2+} 流入量の変動による Locomotion 様式移動の制御

5.3 Locomotion 様式移動を制御する新規分子 CaMKI α の発見

5.4 今後検討を予定する項目

5.5 研究成果の意義

引用文献

図説

謝辞

第1章 要旨

本研究は神経細胞移動の制御機構解明を目的とし、 Ca^{2+} シグナリングに焦点を当てた。まず移動中細胞における細胞内 Ca^{2+} 動態を評価した結果、低速移動時に細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントが頻発することが分かった。次に薬剤を用い移動中細胞内への Ca^{2+} 流入量を増加・減少させた結果、細胞移動速度はいずれも低下したが、細胞・核形態は異なる特徴を示した。更に神経細胞移動を制御する分子の検討を行い、 $\text{CaMKI}\alpha$ 機能の抑制・亢進操作を行った結果、いずれも細胞移動が抑制され、これらの結果は薬剤添加による Ca^{2+} シグナリング操作結果と合致した。以上から移動中神経細胞内における Ca^{2+} シグナリングの適切な強度・時間パターンが神経細胞移動を促進することが示唆された。

略称

VZ	Ventricular zone
SVZ	Subventricular zone
IZ	Intermediate zone
CP	Cortical plate
MZ	Marginal zone
PS	Pial surface
IUE	<i>In utero</i> electroporation
CaM	Calmodulin
CaMKI	Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent protein kinase I
CaMKK	Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent protein kinase kinase
L-VDCC	L-type voltage-dependent calcium channel
CA	Constitutive active form
GECI	Genetically encoded Ca ²⁺ indicator
ROI	Region of interest
SD	Standard Deviation
RFP	Red fluorescent protein
CFP	Cyan fluorescent protein
FPL	FPL 64176

AM	Acetoxymethyl
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
IHC	Immunohistochemistry
KD	Knockdown
cKO	Conditional knockout
TV	Targeting vector
WT	Wild type
OE	Over expression
TRE	Tetracycline response element
rtTA	Reverse tetracycline-controlled transactivator
Dox	Doxycycline
CA	Constitutive active
PFA	Paraformaldehyde
NLS	Nuclear localization signal

第2章 序文

2.1 大脳皮質幼若期II/III層錐体細胞の放射状細胞移動

私達の脳機能を成立させるために不可欠なものとして、神経回路網における神経間連絡 (Petreanu et al., 2012) や神経間連絡強度の可塑的変化がある (Manabe et al., 1992; Aiba et al., 1994; Deissroth et al., 1996; Bito et al., 1996)。こうした幼若期・成体期の脳機能は、発生期に適切な諸過程を経ることで、組織・器官レベルで脳という大枠がつくられ初めて成立している。そうした発生期の諸過程には、神経細胞の分化・増殖、神経細胞移動、神経突起の伸長とターゲティングが主に挙げられる (Noctor et al., 2001; Rakic 1971; Brose et al., 1999)。発生期のイベントはそのいずれかが破綻をきたしてもその後の脳機能に重篤な機能障害を生じさせる。そのため、そうした破綻の実態解明と、それらを正常に成立させるメカニズムの解明は、理学・医学の双方に大きく寄与すると考えられる。著者はこれら発生期イベントのうち、特に神経細胞移動に着目し研究を開始した。

発生期における神経回路形成において、分化した各種神経細胞は適切な位置にまで移動し回路形成を開始する必要がある (Hatten 1999)。こうした神経細胞移動の異常により、滑脳症に代表される脳機能障害が生じることが知られている (Gleeson et al., 1998)。本研究では神経細胞移動のモデル系として、大脳皮質幼若期II/III層錐体細胞の放射状細胞移動を選択した。大脳皮質幼弱錐体細胞の移動過程であるが、これはまず Ventricular zone (VZ) で分化した神経細胞が、幹細胞から脳表側へと放射状に伸

びる Glial fiber を伝い Subventricular zone (SVZ) にまで移動する (Noctor et al., 2004)。ここで一度、移動中神経細胞は Glial fiber から離れ Bipolar cell から Multipolar cell となる (Tabata et al., 2003)。Multipolar cell は Intermediate zone (IZ) の脳表側まで遊走移動し、そこで再び Glial fiber に接着し Locomotion と呼ばれる移動様式を開始する (Nadarajah et al., 2001)。この際に細胞形態は再び強い極性をもった Bipolar cell となり、またほぼ同時期に、進行方向とは反対側の細胞極から将来軸索となる Trailing process を伸ばし始める (Higginbotham et al., 2007; LoTurco et al., 2006)。また Locomotion 中細胞は進行方向に対しては将来樹状突起となる Leading process を伸ばす。Locomotion を始めた神経細胞は、Cortical plate (CP) へ侵入し、さらに Marginal zone (MZ) にまで移動する (Sekine et al., 2011)。CP から MZ を通過する過程のなかで、遅くに分化した神経細胞は早くに分化した細胞を追い越し、より Pial surface (PS) に近い位置へと移動する (Inside-out manner) (Nadarajah and Parnavelas 2002; Cooper 2008)。発生後期には MZ は大脳皮質 I 層、CP は II~VI 層へとそれぞれ分化する (Greig et al., 2013)。その中で II/III 層錐体細胞となるものは胎生期 E14.5 で神経細胞へと分化し、72 時間後の E17.5 には CP から MZ を移動する (Greig et al., 2013) (図 1A)。本研究ではこうした大脳皮質 II/III 層錐体細胞の移動過程のうち、特に Locomotion 様式移動を主な観察の対象とした。

2.2 細胞小器官の周期的動態・配置変化に基づく Locomotion 様式移動

Locomotion 様式移動をする神経細胞内では、中心体から伸びた微小管が籠のよう

に核を包み込み、微小管はダイニン・LIS1 等の分子を介し核膜と結合している (Tanaka et al., 2004, Zhang et al., 2009)。Locomotion 中細胞ではまず Leading process の伸長が起こり、それと並行し Leading process 内をまず中心体が核に先行して進む。なおこの際、Leading process の基部に Swelling という特徴的な形態が現れ、その内部に中心体が存在する (Tsai et al., 2007)。中心体の移動に続き、中心体から伸びる微小管に持ち上げられる形で核が移動し、この際に移動中細胞は移動速度を増加させる。すなわち Locomotion 様式移動は主に中心体・微小管・核の動態・配置変化に基づき、周期的に移動速度の増加・減少を繰り返す (Tsai et al., 2007) (図 1B)。なおこうした細胞小器官の周期的な動態・配置変化に基づく神経細胞の移動様式は幼若期大脳皮質錐体細胞の Locomotion 様式移動のみならず、多くの神経細胞種の移動において保存されている (Bellion et al., 2005; Solecki et al., 2009; Ghashghaei et al., 2007)。Locomotion 様式移動を含めた神経細胞移動は、細胞種により移動速度や細胞内に発現する分子群等いくつかの違いがあるが (Marín and Rubenstein 2001)、その移動過程が中心体・微小管・核の周期的動態・配置変化に基づくことに関しては非常に高い共通性をもつ。すなわち、これら細胞小器官の周期的な動態・配置変化を制御するメカニズムの解明は、神経細胞移動を本質的に理解する上で不可欠と考えられる。またこうした周期性を制御するメカニズムの存在を仮定した際に、そのメカニズムは周期中の特定段階で活性化と不活性化を繰り返すことが想定される。各種神経細胞移動の 1 周期は長いものでも数時間程度と考えられる (Kumada and Komuro 2004; Yanagida et al., 2012; Kitazawa et al., 2014)。こうし

た時間スケールで活性化・不活性化を繰り返し得るメカニズムとして本研究では細胞内 Ca^{2+} シグナリングを想定した。

2.3 Ca^{2+} シグナリングによる神経細胞移動の制御

成体期と同様に神経系の発達過程においても、カルシウムシグナリングは神経回路形成、神経細胞の分化、神経細胞死の誘導など、様々な現象を制御している (Iino, 1996; Mikoshiba, 1997; Berridge, 1998; Spitzer NC, 2006; Takemoto-Kimura et al., 2010)。脳構造を規定する層形成や領域形成に不可欠な神経細胞移動においても、カルシウムシグナリングが必要であることが各神経細胞種で言われてきた。(Komuro and Rakic., 1992; Zheng et al., 2007; Guan et al., 2007)。小脳顆粒細胞を用いた研究では、細胞内 Ca^{2+} 上昇頻度と細胞移動速度が正の相関をもつことが示されてきた (Kumada and Komuro 2004)。しかし一方で、生後期に Olfactory bulb へと移動する抑制性神経細胞では細胞内 Ca^{2+} 上昇を抑制しても移動速度に影響が見られないことが報告されている (Darcy and Isaacson, 2009)。また更に、胎生期大脳皮質錐体細胞の移動過程では、人為的な細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントの増加により移動速度が低下することが報告されている (Bando et al., 2014a; Bando et al., 2014b)。すなわち、細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントが神経細胞の移動に対して果たす役割については、細胞種毎に見ると矛盾した報告が挙げられ、その機能が重要視されながら未だ不明な点が多い。この主因には、細胞内 Ca^{2+} シグナリングが周期的な細胞小器官の動態・配置変化を繰り返す細胞移動のいかなる段階で機能するかという作用点が不明であること、そして

細胞内 Ca^{2+} シグナリングの分子実体についての検討が十分にされていないことの2点が挙げられると考えた。

2.4 移動中細胞内 Ca^{2+} イメージングにおける問題点と解決策

本研究では神経細胞移動のモデル系として大脳皮質 II/III 層錐体細胞の Locomotion 様式移動を選択した。Locomotion 様式移動は細胞小器官の周期的な動態・配置変化に基づき移動速度の増減を繰り返すが、そうした Locomotion 様式移動のいかなる段階で細胞内 Ca^{2+} シグナリングが機能するかを明らかにすることを目的とした。この間に答えるためには細胞内 Ca^{2+} シグナリングの最上流に位置する細胞内への Ca^{2+} 流入が周期的な移動速度の増減を繰り返す Locomotion 様式移動のいかなるタイミングで頻発するか、その相関関係を定量的に記述することが第一に必要であると考えた。

神経細胞移動速度の周期的増減と細胞内への Ca^{2+} 流入量の増減を定量的に記述した報告は1報のみある。その報告の中で小脳顆粒細胞の培養細胞では移動速度の増加と並行して細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントが起こり、平均移動速度と細胞内 Ca^{2+} 上昇頻度は正の相関をもつことが示されている (Komuro and Rakic., 1996)。しかしそうした知見を直接支持する報告はその後無く、小脳顆粒細胞の培養細胞で報告された知見が、他の神経細胞種においても共通しているのか、またより *in vivo* に近い実験系では移動速度と細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントとの間にいかなる相関が見られるのか等、疑問は多い。また *in vivo* での移動中細胞はいかなる細胞種においても、周囲の細胞構造の一

部・細胞外因子を足がかりにして移動を進める (Yokota et al., 2007; Notor et al., 2001; Ghashghaei et al., 2007)。そのため、移動過程の実体を掴むためには移動中細胞の周囲環境が *in vivo* 条件に近い実験系を用いることが重要であると考えた。また神経細胞は数時間に及ぶ周期的な移動速度の増減を繰り返すため、数時間から 10 時間程度の比較的長期に及ぶライブイメージングを行う必要もあった。以上より本研究ではまず培養細胞よりも *in vivo* 条件に近い脳スライスを実験サンプルとして設定し、数時間から 10 時間程度の移動中細胞内 Ca^{2+} イメージングが可能な実験系の作出を目標とした。

Komuro らの報告を脳スライスのような *in vivo* 条件に近い実験系で検討した報告が無い理由の一つに、 Ca^{2+} プローブの問題が挙げられると考えた。Komuro らの報告内では Ca^{2+} のケミカルプローブが用いられ、こうしたプローブは脳スライスへの負荷が難しく、また何より、細胞内での凝集や退色等により周期的に起きる移動の諸過程を十分に観察できるほどの長時間イメージングには適さない。こうした問題の解決策として、近年急速に発展しつつある Genetically encoded Ca^{2+} indicator (GECI) の使用がある (Chen et al., 2013; Inoue et al., 2014; Mank et al., 2008)。GECI を使用する利点としては、まず遺伝子コード型の Ca^{2+} プローブが細胞内で合成・供給され続けるため、長時間のイメージングに適していることがある。また第 2 の利点として、GECI は次に述べる *in utero* electroporation (IUE) (Tabata and Nakajima 2001) との併用により移動中細胞特異的に発現させることができる。そのため、脳スライス中の全細胞に対し非特異的に負荷されるケミカルプローブに比べ、GECI を使用した際

には移動中細胞内の Ca^{2+} 変動をより鮮明に捉えることができる。著者は本研究で複数の GECI を検討し、最終的に GCaMP6s が移動中細胞の細胞内 Ca^{2+} 変動を可視化するのに適していることを特定した。GCaMP シリーズは最も改良の進められた GECI であり、環状変異型 GFP、Calmodulin (CaM)、CaM のターゲット配列である M13 ペプチド (Myosin Light Chain Kinase 由来) の 3 つをプローブ内に含んでいる。GCaMP は周囲環境に Ca^{2+} が少ない状況では環状変異型 GFP 内で蛍光団が不完全にしか形成されず輝度が低いが、GCaMP の周囲環境に Ca^{2+} が増え GCaMP 内の CaM と Ca^{2+} が結合すると、CaM と同じく GCaMP 内の M13 が接近し、プローブ内全体で立体構造の変化が起き GFP 蛍光団の形成・蛍光輝度の上昇が起きる (Nakai et al., 2001)。本研究では現行の GCaMP シリーズの中で Ca^{2+} に応答して大きな輝度値変化を示す GCaMP6s を使用した (Chen et al., 2013)。

2.5 GCaMP6s を用いた移動中細胞内 Ca^{2+} イメージング

本研究では大脳皮質 II/III 層錐体細胞となるものの Locomotion 様式移動を観察の対象とし、こうした細胞内での Ca^{2+} 変動の可視化を第一の目的とした。大脳皮質 II/III 層錐体細胞であるが、これらは VZ において E14.5 で神経細胞へと分化し移動を開始する (Greig et al., 2013)。こうした特定時期に VZ で分化する神経細胞を標的として IUE を行うことで、特異的にプラスミドを導入することができる。IUE では、胎児マウスの脳室にプラスミドを打ち込みエレクトロポレーションを行うことで、脳室周囲の VZ に存在する分化過程の細胞にのみ時期特異的にプラスミドを導入することが可

能である(Tabata and Nakajima 2001)。

そのため、本研究では E14.5 に IUE を行い、GCaMP6s と細胞体標識を目的とした RFP を P2A 配列でつないだプラスミドを神経細胞へ導入した。GCaMP6s-P2A-RFP はひとまとまりの配列としてタンパク発現し、その後細胞内にある内在性のペプチダーゼがペプチドである P2A 配列を高効率で裁断する (Kim et al., 2011)。本研究では IUE から約 72 時間後の E17.5 で脳スライスを作成を行い、細胞体を常時可視化する RFP と CaMP6s の同時イメージングを行うことで、Locomotion 様式移動中神経細胞の細胞移動速度と細胞内 Ca^{2+} 上昇イベント頻度との相関関係を定量的に解析した (図 1C)。

2.6 神経細胞移動を制御する候補分子として CaMKI α が挙げられる

本研究では周期的に変化する細胞移動速度と細胞内 Ca^{2+} 流入量との間にある相関関係解析の他に、細胞移動を制御する細胞内 Ca^{2+} シグナリングの分子実態解明を目的としている。本研究室の先行研究により、こうした分子実体の候補として CaMKI α が挙げられた。本研究室の先行研究により、CaMKI α は GABA、Wnt5a を上流として発生期イベントである大脳皮質錐体細胞の軸索伸長を促進することが明らかとされている (Ageta-Ishihara et al., 2009; Ageta-Ishihara et al., unpublished) (図 1A)。また CaMKI α の Dominant negative 体の強制発現と、CaMKI α Knockdown (KD) によって未成熟大脳皮質 II/III 層錐体細胞の放射状移動細胞が抑制されることも示されていた (Adachi-Morishima, Takemoto-Kimura et al., unpublished data)。更に大脳

皮質における CaMKI α の mRNA シグナルは、E13 から認められ、発生段階が進むにつれ強くなる (Kamata et al., 2007)。こうした知見と本研究室による先行研究より、胎生期大脳皮質錐体細胞の移動過程においても CaMKI α が何らかの重要な機能を有することが示唆されていた。

Ca²⁺依存的な CaMKI α の活性化機構についてであるが、これにはまず Ca²⁺/CaM が CaMKI α に結合し、それと並行し CaMKI α のリン酸化酵素である Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase kinase (CaMKK) が同じく Ca²⁺/CaM の結合により活性化され、CaMKI α をリン酸化することが必要である。すなわちこうした多段階の制御を受けることで、CaMKI α はリン酸化酵素として活性をもつようになる。なお CaMKK によりリン酸化を受ける CaMKI α の部位は Thr-177 であることが示されている (Haribabu et al., 1995)。また CaMKI α は N 末端にキナーゼドメインをもち、C 末端にキナーゼ活性の自己抑制ドメインと Ca²⁺/CaM 結合ドメインをもつ (Goldberg et al., 1996)。なおこの自己抑制ドメインに変異 (286IHQS to 286EDDDI, 307F to A) を入れた際には、CaMKI α の自己抑制能が減弱し Constitutive active (CA) 体として機能することが知られている (Matsushita et al., 1996)。

第3章 材料・方法

3.1 *In utero* electroporation

In utero electroporation (IUE) は ICR mouse の胎仔 E14.5 に対し行った。Ca²⁺ 上昇と移動速度との相関解析実験・薬剤添加に伴う Ca²⁺動態計測実験には、pCAG-TagRFP-P2A-GCaMP6s 3.0μg/μl、薬剤添加に伴う移動速度変化測定実験には pCAG-mEGFP 0.75 μg/μl 、 pCAG-mTurquoise2-NLS 0.75 μg/μl 、 pCMV-DsRed-Centrin2 0.5 μg/μl、CaMKIα cKO での放射状移動の定量実験は pCAG-Cre:GFP 0.75μg/μl、または pCAG-EGFP 0.75μg/μl、更に細胞体のマーカーとして pCAG-TagRFP 0.5μg/μl、CaMKα cKO での核・中心体間距離計測実験は、pCAG-Cre:GFP 0.75μg/μl、または pCAG-mEGFP-NLS 0.75μg/μl、更に各種マーカーとして pCMV-DsRed-Centrin2 0.5 μg/μl、pCAG-mTurquoise2 1.0 μg/μl、CaMKIα KD 実験では pSuper basic shCaMKIα 0.5μg/μl、更に細胞体マーカーとして pCAG-mEGFP 0.5μg/μl、CaMKIαCA 発現に伴う移動速度への影響検討を目的とした実験では、pTRE-tight-mEGFP-CaMKIαCA 1.0μg/μl、または pTRE-tight-mEGFP 1.0μg/μl、更に pCAG-rtTA3G 0.5 μg/μl、pCAG-TagRFP 0.5 μg/μl、CaMKIαCA 発現に伴う核形態への影響検討を目的とした実験では、pTRE-tight-mEGFP-CaMKIαCA 1.0μg/μl、または pTRE-tight-mEGFP 1.0μg/μl、更に pCAG-rtTA3G 0.5 μg/μl 、 pCAG-mTurquoise2-NLS 0.5 μg/μl 、 pCMV-DsRed-Centrin2 0.5 μg/μl、pCAG-iRFP 0.5 μg/μl のプラスミド混合溶液を

各々導入した。

またエレクトロポレーション条件は電圧 45-50 v、パルス数 5-10 回、パルス長 50 ms、パルス間隔 1 s で行った。なおエレクトロポレーション条件は同一実験内では同様とした。エレクトロポレーターは ECM 830 BTX (Harvard apparatus) また電極はピセット円形白金電極 ϕ 3mm (ネッパジーン) を用いた (Saito, 2006)。

3.2 脳スライスの作製・培養

胎児マウスの解剖・脳スライスの作成は、E14.5 で IUE を行ってから 72 時間後の E17.5 に行った。なお CaMKI α KD 後の脳スライス作成のみ E14.5 で IUE を行ってから 60 時間後に行った。解剖は 95% O₂ と 5% CO₂ の混合ガスを通気し氷冷した 27 mM NaHCO₃、1.4 mM NaH₂PO₄、2.5 mM KCl、0.5mM Ascorbic acid、7.0 mM MgSO₄、1.0 mM CaCl₂、222.1 mM sucrose (Namiki et al., 2009) aCSF 溶液の中で行った。次に、取り出した脳を 3% Low melting temperature agarose (Lonza) に包埋し、ビブラトーム VT 1000S (Leica) により 200-300 μ m 厚の冠状断面脳スライスとした。作製した脳スライスは、Millicell Sterilized culture plate insert の上に設置し、その下には MEM 100ml (Gibco)、Glutamax x100 (Invitrogen) 1ml、EBSS (Gibco) 50ml、Horse serum (Gibco) 50ml、B27 (Gibco) 4ml、100mM CaCl₂ 0.9ml、100mM MgSO₄ 0.4ml を混合した溶液を満たし、溶液の受け皿として、35mm/ガラスベースディッシュ (Glass 27 Φ) (IWAKI) を用いた。なお、EGTA-AM 添加実験では Serum 中に含まれるエステラーゼによる AM 体分解を防ぐ目的で、MEM (GIBCO)

をベースとした、終濃度が各々 D-Glucose 30mM、Glutamax 1.8mM、NaHCO₃ 24mM、Penicillin/Streptomycin 90U/ml となる溶液を使用した (Kumada et al., 2004)。

3.3 共焦点顕微鏡を用いた脳スライスのライブイメージング

作成した脳スライスには CO₂ インキュベーター内部で 1 時間以上回復させた後、共焦点レーザースキャン顕微鏡 LSM510 META (Carl Zeiss) を用いてライブイメージングを行った。脳スライスの入ったガラスベースディッシュを CO₂ マイクロインキュベーター (INUBG2SF-ZILCS, TOKAI HIT) に設置し細胞内 Ca²⁺ イメージングのみの場合には 1 時間から 12 時間程度、薬剤添加に伴う細胞内 Ca²⁺ 流入量変化の検討実験では薬剤添加前後に各 15-20 分、また薬剤添加に伴う移動速度の定量には薬剤添加前後で各 6 時間のライブイメージングをそれぞれ行った。なお撮像頻度は長期 Ca²⁺ イメージングでは 0.1Hz、薬剤添加を伴う Ca²⁺ イメージングでは 0.5Hz、Ca²⁺ 上昇イベントの継続時間特定を目的とした Ca²⁺ イメージングでは 1Hz、Ca²⁺ イメージングを行わず細胞移動速度を定量する目的でのイメージングでは 5 分に 1 回とした。また薬剤添加実験では、予めよく混合した薬剤溶液 (FPL (Tocris) 10μm, Nimodipine (Tocris) 10 μm, Dox (Clontech) 1μg/ml, EGTA-AM 500μm, なお EGTA-AM 溶液のみ細胞内への透過性を増加させる目的で Pluronic F-127 (Life Technologies) 0.01%, Cremophore EL (Sigma) 0.005%を含む (Namiki et al., 2009)) の入ったガラスベースディッシュへ、脳スライスを乗せた Culture plate insert を移動させることで行い、薬剤溶液を 1 スライス当たり 10-20μl (EGTA-AM のみ 100μl) スライス上から添加し

た。なお薬剤添加後には 15 分以上 (EGTA-AM のみ Loading の時間として 30 分以上) 静置してからイメージングを再開した。

3.4 脳スライスを用いた Ca^{2+} イメージング画像解析

脳スライスを用いた GCaMP6s Ca^{2+} ライブイメージング画像の解析を IMARIS (BITPLANE) と ImageJ (NIH) を用いて行った。pCAG-TagRFP-P2A-GCaMP6s が導入された移動中神経細胞は TagRFP と GCaMP6s を発現するため、ライブイメージングにより得られた TagRFP 像より Region of interest (ROI) を抽出した。なお ROI は細胞移動に従い経時的に移動するよう設定した。次に ROI 内での GCaMP6s の輝度値 F_{GCaMP6s} を各フレームについて算出し、それらの値からバックグラウンド値を減算した ($F_{\text{GCaMP6s}} - F_{\text{GCaMP6s background}}$)。なおバックグラウンド値は脳スライス中の細胞シグナルが認められない領域を選択し算出した。また GMaMP6s のベース輝度値 F_0_{GCaMP6s} は撮像した全フレーム中から輝度値が下位 50% に含まれるフレームを抽出し、それらの輝度値から近似直線を作成することで設定した。なおこの下位 50% に含まれるフレームの輝度値から GCaMP6s ベース輝度値の Standerd Deviation (SD) も算出した。そして上述した各値を用いて $\Delta F/F_0_{\text{(GCaMP6s)}}$ を算出した ($\Delta F/F_0_{\text{(GCaMP6s)}} = (F_{\text{GCaMP6s}} - F_{\text{GCaMP6s background}}) / F_0_{\text{GCaMP6s}}$)。ここで用いた GMaMP6s のベース輝度値 F_0 は経時的に変化する。こうしたベース輝度値 F_0 を設定した目的には、撮像による GCaMP6s の退色補正と移動中細胞が焦平面からずれた際の輝度値補正がある。更に TagRFP 像の輝度値を用いて移動中細胞が焦平面からずれた際の $\Delta F/F_0_{\text{(GCaMP6s)}}$ 値の

補正を行った。この補正ではまず ROI 内での TagRFP の輝度値 F_{TagRFP} を各フレームについて算出し、それらの値からバックグラウンド値を減算した ($F_{TagRFP} - F_{TagRFP\ background}$)。次に TagRFP のベース輝度値 $F_0\ TagRFP$ を撮像した全フレームの平均値として設定した。そして以上の値から $\Delta F/F_0\ (TagRFP)$ を算出し ($\Delta F/F_0\ (TagRFP) = F_{TagRFP} - F_{TagRFP\ background} / F_0\ TagRFP$)、 $\Delta F/F_0\ (GCaMP6s)$ 値に対する補正を行い最終的な値である $\Delta F/F_0$ を算出した ($\Delta F/F_0 = (\Delta F/F_0\ (GCaMP6s) / \Delta F/F_0\ (TagRFP)) * 100$)。なおこの際 $\Delta F/F_0$ は 100 分率化した。

次に GCaMP6s ベース輝度値から算出した SD 値を用いて閾値を設定し、細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントの特定を行った。長期 Ca^{2+} イメージングにおいては、閾値の値を ($F_0\ GcaMP6s + 8SD$) * 100、それ以外の Ca^{2+} イメージングでは閾値の値を ($F_0\ GcaMP6s + 5SD$) * 100 とし、 $\Delta F/F_0$ の値がそれらの値を超えた際に細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントが発生したと定義した。

3.5 CaMKI α flox マウスラインの樹立

CaMKI α はエクソンを 12 個もちエクソン 2 に開始コドンが存在する。今回樹立した CaMKI α flox マウスラインはこのエクソン 2 を LoxP 配列ではさみ、Cre 酵素依存的に除去することで CaMKI α cKO を行う。マウスライン樹立の具体的手順であるが、これはまず CaMKI α エクソン 2 の両端に LoxP 配列を挿入し、Neomycin 耐性遺伝子と、5' arm (3.8Kbp) および 3' arm (5.1Kbp) を有したターゲティングベクターを作成し、エレクトロポレーションによる C57BL6/N 由来 ES 細胞 (RENKA) への

導入を行った (Mishina and Sakimura, 2007)。次にサザンブロット法にてスクリーニングを行い、相同組み換え ES 細胞を樹立し、キメラマウスを作出した。またキメラマウスから得られた F1 マウスと FLP recombinase を発現するトランスジェニックマウス (FLP66) との交配により Neomycin 耐性遺伝子を削除した (Takeuchi et al., 2007)。なおマウスの維持は C57BL6/N との交配により行い、最終的にはホモ系統を作出し実験に用いた。

3.6 ライブイメージングによる Locomotion 様式移動速度の定量

脳スライスを用いて行ったライブイメージング画像を基に、CP を移動する Locomotion 中細胞のトラッキングを行い移動速度の定量を行った。脳スライスを用いたライブイメージング画像における CP 部の特定であるが、これはライブイメージングを終えた脳スライスに対し 4%PFA 固定・ヘキスト染色を行い、IZ/CP 間境界を決定することで行った。なお、VZ/IZ/CP の各層は細胞密度が異なるためヘキスト染色による核染色像から各境界を決定することが可能である。また各種薬剤添加実験・CaMKI α KD 実験においてはライブイメージング開始時に IZ/CP 境界付近に位置する細胞をトラックし、長期 Ca²⁺イメージング実験においてはライブイメージング開始時に CP に位置しイメージング終了時まで CP に留まる細胞をトラックした。なお細胞のトラッキングはマニュアルで行った (ImageJ, Manual Tracking)。

3.7 固定切片を用いた放射状細胞移動の定量

E14.5 での IUE によって、蛍光タンパクによる移動中細胞の可視化をした胎児マウスから、E17.5 で脳切片を作成し放射状細胞移動の進行を定量した。まず 4%PFA で固定した脳を切片化しヘキスト染色を行った。次に共焦点顕微鏡を用いたサンプルの撮像を行い、ヘキスト像と移動中細胞の蛍光像を取得した。ヘキスト像から VZ/IZ 間、IZ/CP 間境界の特定を行い、また蛍光像を 2 値化したものから各層に位置する細胞の数をマニュアルでカウントし、各層に位置する移動中細胞の割合を算出した。

3.9 免疫組織染色法

4%PFA により固定し作成した脳切片は、0.3 % Triton X-100、 1 % Bovine serum albumin (Sigma) 、 5 % Normal goat serum (Vector) を PBS に溶かした溶液中で室温において 1 時間振盪しブロッキングを行った。また 1 次抗体として CaMKI α ラビットモノクローナル抗体 (Epitomics) と 4°C で 30/N 反応させた。CaMKI α 抗体の希釈率は 1:500 とした。二次抗体反応は Alexa Fluor 555 anti rabbit IgG (Molecular Probes) を使用し、室温で 2 時間反応させ、その後ヘキスト染色を行った。

第 4 章 結果

4.1 Locomotion 様式移動中の細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントは低速移動時に頻発する

Locomotion 様式移動中の細胞は細胞内小器官の動態・配置変化を基礎とした周期的な移動速度の増減を繰り返すが、そのような諸段階の中で、細胞内 Ca^{2+} 流入量はどのように変化するか、この間を明らかにする目的で Locomotion 様式移動中細胞の長期 Ca^{2+} イメージングを行った。

長期 Ca^{2+} イメージングを開始する前の予備的検討として、適切なフレームレートを求める目的で Locomotion 様式移動中細胞での Ca^{2+} 上昇イベント継続時間を測定した。実験は脳スライスを用いた Ca^{2+} イメージングを 1Hz で 1 時間程度行った。イメージングを行った脳に対して PFA 固定・ヘキスト染色を行い、ヘキスト染色像から IZ-CP 境界、CP-MZ 境界を決定した (図 2A 左)。先行研究より CP-MZ 境界から CP 側に約 $50\mu\text{m}$ の地点で移動様式は Locomotion から Terminal translocation にシフトする (Sekine et al., 2011)。そのため細胞が Terminal translocation 様式移動を行う領域として L1 を定義した。また L1 の一部を除いた CP 領域を 2 割し、MZ 側を L2、IZ 側を L3 と定義した (図 2A 右)。その結果、Locomotion 様式を示す移動中細胞でも、MZ に近いもの (L2 cells) は、IZ に近いもの (L3 cells) よりも Ca^{2+} 上昇イベントの継続時間が短いことが分かった (L2 cells= $48.0 \pm 3.1\text{s}$, L3 cells= $55.3 \pm 3.9\text{s}$) (図 2B,C)。またそれら Locomotion 中細胞の細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントのうち 10 秒以上の継続時間を示すものが 95.6% (261/273 events) であった。なお Locomotion 様式移

動の次の移動様式である Terminal translocation を行う細胞は、更に短い Ca^{2+} 上昇イベントの継続時間を示した (L1 cells = $41.4 \pm 2.6\text{s}$) (図 2B,C)。また特定した細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントの振幅幅を定量したところ L1、L3、L2 の順に大きいことが分かった (L1 cells = $175.2 \pm 7.8\%$, L2 cells = $66.4 \pm 1.3\%$, L3 cells = $141.7 \pm 4.3\%$) (図 2D)。なお単位時間あたりでのイベント発生頻度には L1 から L3 で有意差が検出されなかった (L1 cells = 7.0 ± 1.3 (#/hr), L2 cells = 4.9 ± 0.9 (#/hr), L3 cells = 5.3 ± 1.2 (#/hr)) (図 2E)。以上の予備的データは、大脳皮質を移動する錐体細胞内の Ca^{2+} 動態が、発生が進むに連れて変化してゆくことを示唆している。

更に長期 Ca^{2+} イメージングの予備的実験として、移動中細胞に GCaMP6s を発現させた際の放射状細胞移動への影響を検討した。この実験では E14.5 の WT マウスに対し IUE を行い長期 Ca^{2+} イメージングで用いるのと同じ、pCAG-GCaMP6s-P2A-TagRFP を発現させ、E17.5 で解剖し脳切片の作成を行った。CP/IZ/VZ 各層を移動中の細胞数割合を Control 条件 (pCAG-TagRFP を発現) と比較したところ、GCaMP6s を強制発現させた切片で放射状移動に異常は認められなかった (Control: CP = $37.7 \pm 3.6\%$, IZ = $55.5 \pm 3.9\%$, VZ = $7.7 \pm 3.2\%$, GCaMP6s: CP = $31.1 \pm 5.9\%$, IZ = $61.2 \pm 5.5\%$, VZ = $7.6 \pm 1.6\%$) (図 3)。こうした実験結果により GCaMP6s の強制発現により放射状移動への明らかな影響は無いことがわかった。

次に長期 Ca^{2+} イメージングを行い、単位時間あたりでの Locomotion 中細胞の移動速度と細胞内 Ca^{2+} 上昇イベント数の相関を解析した。Locomotion 中細胞の細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントは 10 秒以上の継続時間を示すものが 95.6% (261/273 events) で

あることから、撮像頻度は 0.1Hz とした。Locomotion 中細胞を 10 時間以上撮像し、各フレームにおける Locomotion 中細胞の積算移動距離と細胞内 Ca^{2+} 動態を各細胞について明らかにした (図 4A)。また、積算移動距離から各フレームでの移動速度を算出し、移動速度が $3.1\mu\text{m/hr}$ 以下の区間を Slow phase、それ以外の区間を Non-slow phase と定めた。次に図 4A で示した細胞に対しビンを 2 時間と定め、各ビン内での平均移動速度と Ca^{2+} 上昇イベント頻度の相関解析を行った。各ビン内の Ca^{2+} 上昇イベント数を横軸に、平均移動速度を縦軸に取り点をプロットし、ビンを 1 フレームずつシフトさせ全ての時間枠から点の値を抽出した。その結果、 Ca^{2+} 上昇イベント頻度と移動速度との間には逆相関があることが示された (図 4B)。また記録した全ての細胞に対しビンを定め同様の解析を行い全ての結果をプールしたところ同様に、 Ca^{2+} 上昇イベント頻度と移動速度との間には逆相関が確認された (図 4C)。さらに異なる解析として、細胞毎に Slow phase 区間と Non-slow phase 区間での Ca^{2+} 上昇イベント数の発生比率を算出し比較したところ、Slow phase でのイベント発生比率が有意に高いことが分かった (Slow phase= 1.20 ± 0.10 , Non-slow phase= 0.65 ± 0.15) (図 4D)。また細胞毎に Ca^{2+} 上昇イベント発生時フレームの移動速度を算出し、全フレームから算出した平均移動速度に基づく標準化を行った。そして標準化後の値を用い Ca^{2+} 上昇イベント発生時の移動速度と全フレームの平均移動速度を比較した。その結果 Ca^{2+} 上昇イベント発生時に移動速度が有意に低下することが分かった (Total frame= 1.00 ± 0.00 , Ca^{2+} event frame= 0.54 ± 0.12) (図 4E)。以上の結果はいずれも、神経細胞が低速で移動する時間帯に Ca^{2+} 上昇イベントが頻発することを示唆する。またこの結果

は脳スライスを用いた実験系で初めて、神経細胞の周期的な移動速度変化と細胞内 Ca^{2+} 流入量増減の相関関係を明らかにしたものである。以上の新規知見から、著者は「周期的な細胞小器官の動態・配置変化を繰り返す Locomotion 様式移動において、周期的な細胞内への Ca^{2+} 流入量の増減とそれに伴う Ca^{2+} シグナリング活性の増減が移動を促進する」という作業仮説を立て、仮説の検証に移った。

4.2 Locomotion 様式移動中の細胞内 Ca^{2+} 上昇は一部 L-VDCC に依存し L-VDCC 活性の薬理的亢進により細胞移動速度が低下する

次に先の作業仮説を検討する目的で、人為的に細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントを亢進させた際の Locomotion 様式移動への影響を検討した。まず当研究室の先行研究を含め、幼若期大脳皮質錐体細胞の細胞内 Ca^{2+} 上昇はその一部が L-type voltage-dependent calcium channel (L-VDCC) 依存的であることが既に示されている (上條, 2014, Bando et al., 2014b)。そのため L-VDCC アクチベーター FPL 64176 (FPL) を添加した際の Locomotion 中細胞の細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントを観察した (図 5A)。FPL の添加により、細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントの発生頻度に有意な変化は認められなかった (Before = 0.50 ± 0.06 (#/min), FPL = 0.59 ± 0.09 (#/min)) (図 5B)。しかしその一方で、FPL の添加により 1 イベントあたりの Ca^{2+} 上昇幅は有意に増加していた (Before = 31.9 ± 8.6 (%), FPL = 133.6 ± 32.8 (%)) (図 5C)。以上の結果は、FPL 添加により Locomotion 様式移動中細胞内への Ca^{2+} 流入量は増大し、それは Ca^{2+} 上昇イベント頻度の増加ではなく、1 イベントあたりの細胞内 Ca^{2+} 流入量の増加によることを

示唆している。

次に、L-VDCC の拮抗薬である Nimodipine 添加による細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントへの変化を観察した。その結果、細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントの発生頻度に減少が認められた (Before= 0.48 ± 0.05 (#/min), Nimodipine= 0.22 ± 0.05 (#/min)) (図 5D)。以上より Locomotion 中細胞内への Ca^{2+} 流入は少なくとも一部は L-VDCC に依存することが示された。なお、Vehicle 添加を行った Control 条件では、Vehicle 添加前後で Ca^{2+} イベントの発生頻度に有意な差は検出されなかった (Before= 0.59 ± 0.06 (#/min), Vehicle= 0.59 ± 0.09 (#/min)) (図 5E)。また Vehicle を添加した際の 1 イベント当たりの Ca^{2+} 流入量にも有意な差は検出されなかった (Before= 15.4 ± 4.8 (%), Vehicle= 16.9 ± 4.5 (%)) (図 5F)。

次に、FPL を添加した際の Locomotion 様式移動への影響を検討した。FPL 添加前後で、同一脳スライス中の Locomotion 中細胞をトラックし、トラックした細胞の平均移動速度を定量した。Vehicle 条件では Vehicle 添加前後で平均移動速度に有意な違いは認められないが、FPL 添加条件では FPL 添加後に平均移動速度が低下した (Vehicle: Before= 14.5 ± 3.6 $\mu\text{m/hr}$, After= 12.9 ± 1.9 $\mu\text{m/hr}$, FPL: Before= 13.9 ± 1.1 $\mu\text{m/hr}$, After= 7.3 ± 1.1 $\mu\text{m/hr}$) (図 5G)。

以上の結果は Locomotion 中細胞内への Ca^{2+} 流入量を薬理的に増加させることで Locomotion 中細胞の移動速度が低下することを示す。Locomotion 中細胞は周期的に細胞内への Ca^{2+} 流入量を増減させることを図 4 の実験で明らかにしたが、FPL 添加に伴う異常な細胞内 Ca^{2+} 流入はこの周期性を破綻させたことが考えられる。すなわち

FPL 添加に伴う Locomotion 様式移動の抑制は、「周期的な細胞小器官の動態・配置変化を繰り返す Locomotion 様式移動において、周期的な細胞内への Ca^{2+} 流入量の増減とそれに伴う Ca^{2+} シグナリング活性の増減が移動を促進する」という作業仮説を支持するものである。

4.3 EGTA-AM の添加により、細胞内 Ca^{2+} 上昇イベント頻度・ベースラインでの細胞内 Ca^{2+} 濃度が共に減少し細胞移動速度が低下する

次に Locomotion 中細胞内への Ca^{2+} 流入量を減少させた際の、移動速度への影響を検討した。作業仮説に基づく考察では、細胞内への Ca^{2+} 流入量を減少させた際には、周期的な細胞内への Ca^{2+} 流入量増加に伴う Ca^{2+} シグナリング活性の亢進が阻害され、Locomotion 様式移動が抑制されることが考えられる。こうした仮説を検討する目的で、薬理的に Locomotion 中細胞内への Ca^{2+} 流入量を減少させ、移動速度を測定した。

実験には Acetoxymethyl (AM) 体化した Ca^{2+} キレーターの Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) を用いた。AM 体化化合物は、細胞内に取り込まれた際に細胞内のエステラーゼにより AM 体が切断されて初めて機能する。つまり EGTA-AM は細胞内へ取り込まれることで初めて EGTA へと分解され Ca^{2+} キレーターとして機能する (Darcy and Isaacson, 2009)。まず EGTA-AM 添加による Locomotion 中細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントへの影響を観察したところ、細胞内 Ca^{2+} 上昇イベント頻度が減少することが示された (Before= 0.58 ± 0.07 (#/min), EGTA-AM= 0.08 ± 0.04 (#/min)) (図

6A,B)。また更に、EGTA-AM 添加による Locomotion 中細胞内のベースライン Ca^{2+} 濃度への影響を検討した。EGTA-AM 添加前後で GCaMP6s のベースライン輝度値を測定し、添加後の値を添加前の値で標準化したところ、EGTA-AM 添加により GCaMP6s のベースライン輝度値が有意に低下することが分かった (Before= 1.0 ± 0.0), EGTA-AM= 0.79 ± 0.06) (図 6C)。以上から EGTA-AM の添加により、細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントの減少だけでなく細胞内 Ca^{2+} 濃度のベースラインが低下することが示唆された。

次に EGTA-AM を添加した際の Locomotion 様式移動への影響を検討した。実験は EGTA-AM 添加前後で、同一脳スライス中の Locomotion 中細胞をトラックし、トラックした細胞の平均移動速度を定量することで行った。Vehicle 条件では Vehicle 添加前後で平均移動速度に有意な違いは認められないが、EGTA-AM 添加条件では EGTA-AM 添加後に平均移動速度が低下していた (Vehicle: Before= $13.5 \pm 1.2 \mu\text{m/hr}$, After= $13.8 \pm 0.9 \mu\text{m/hr}$, EGTA-AM: Before= $12.4 \pm 1.0 \mu\text{m/hr}$, After= $4.3 \pm 0.6 \mu\text{m/hr}$) (図 6D)。以上の結果より、EGTA-AM 添加に伴う Locomotion 中細胞内での Ca^{2+} 上昇イベントの減少・細胞内ベースライン Ca^{2+} 濃度の減少によって Locomotion 様式移動の平均移動速度が低下することが分かった。EGTA-AM 添加に伴うこうした細胞内 Ca^{2+} 動態の変化は、周期的に起こる細胞内 Ca^{2+} 流入量の増加が抑制された結果と考えられる。すなわちこの実験結果は FPL 添加実験と異なり、細胞内 Ca^{2+} シグナリングの周期的な活性亢進を抑制したことで Locomotion 様式移動が抑制されたと考えられる。

4.4 FPL 添加・EGTA-AM 添加の各々で移動中細胞の核形態が変化する

FPL・EGTA-AM の各種薬剤添加実験において、細胞内 Ca^{2+} 流入量は増加・減少し、いずれの薬剤添加実験においても Locomotion 中細胞の移動速度が低下した。これらの薬剤添加実験はいずれも、細胞内 Ca^{2+} 流入量の周期的な増減を変化させ、周期的な細胞小器官の動態・配置変化を繰り返す Locomotion 様式移動を破綻させたと考えられる。そこで更に詳細な検討として、FPL・EGTA-AM の各種薬剤添加により、Locomotion 様式移動の周期性が具体的にどのような影響を受けたかを検討した。

図 4 での実験より Locomotion 中細胞は移動速度の異なる Slow phase と Non-slow phase を繰り返し、細胞内への Ca^{2+} 流入量は Slow phase で多く Non-slow phase で少ないことが明らかとなった。細胞内への Ca^{2+} 流入量の増減が Locomotion 様式移動の周期性を制御するとすれば、FPL・EGTA-AM 各種薬剤添加により細胞内への Ca^{2+} 流入量が増減した際に、Slow phase と Non-slow phase の各段階の特徴を示す移動中細胞の割合がそれぞれ増加することが考えられる。そのため次に、脳スライスに対し FPL・EGTA-AM 各種薬剤添加を行い、細胞小器官を指標として Slow phase と Non-slow phase 各段階の特徴を示す Locomotion 中細胞の割合が増加するか検討した。今回の実験では、Slow phase と Non-slow phase 各移動段階を特定する細胞小器官として、核を用いた。Locomotion 様式移動は、中心体とそこから伸びる微小管によって核が持ち上げられ進行してゆくが、その核は微小管に持ち上げられる際に縦長の紡錘体形を示し、持ち上げられた後に球体形に近づくことが知られている (Schaar et al., 2005; Nishimura et al., 2014)。また Locomotion 様式移動は、核が紡錘体形を

示す際に移動速度が増加し、球体形に近づいた際に移動速度が減少する (Nishimura et al., 2014)。そのため核がどれだけ球体形に近いかを評価することで、Locomotion 中細胞が Non-slow phase・Slow phase のいずれの移動過程の特徴を示すか評価できると考えた。実際の実験では撮像した 2 次元画像中の核を楕円と見なし、その長軸・短軸の比 (長軸長/短軸長) から核がどれだけ円形に近いかを評価した。また核は Nuclear localization signal (NLS) 配列をもつ mTurquoise2 を、予め IUE で移動中細胞へ導入することで可視化した。

まず FPL 添加実験であるが、この実験では脳スライスを薬剤添加後 2 時間で PFA 固定し核形態の評価を行った。その結果 Vehicle 添加を行ったコントロール条件群に対し、FPL 添加を行った条件群で Locomotion 中細胞の核が球体に近い性質を示した (Control= 2.37 ± 0.09 , FPL= 2.04 ± 0.05) (図 7A)。この実験結果は FPL 添加に伴う細胞内 Ca^{2+} 流入量の増大により、Locomotion 中細胞が Slow phase の特徴をより強く示すようになることを示唆する。

次に EGTA-AM 添加実験を行い、この実験では脳スライスを薬剤添加後 1 時間で PFA 固定し核形態の評価を行った。その結果コントロール条件群に対し EGTA-AM 添加を行った条件群では、Locomotion 中細胞の核が縦長の紡錘体に近い性質を示した (Control= 2.27 ± 0.12 , EGTA-AM= 2.64 ± 0.09) (図 7B)。この実験結果は EGTA-AM 添加に伴う細胞内 Ca^{2+} 流入量の減少により、Locomotion 中細胞が Non-slow phase の特徴をより強く示すようになることを示唆する。以上 2 つの実験結果は、薬剤添加に伴う Locomotion 中細胞内への Ca^{2+} 流入量の増加・減少によって、

Slow phase・Non-slow phase の異なる移動段階の特徴を示す Locomotion 中細胞の割合が増加したことを示唆する。またこれらの実験結果と、FPL・EGTA-AM の各種薬剤添加によって Locomotion 中細胞の移動速度が減少したことを合わせて考えると、FPL 添加実験では Slow phase から Non-slow phase への移行、つまりは核が微小管により持ち上げられ始め、紡錘体形となり移動速度が増加する過程が抑制されていたと考えられる。また逆に EGTA-AM 添加実験では Non-slow phase から Slow phase への移行、つまりは核が微小管に最後まで持ち上げられ、球体形になる過程が抑制されていたと考えられる。なお、EGTA-AM 添加により Non-slow phase から Slow phase への移行が抑制される可能性を先に述べたが、これは Locomotion 中細胞が高速での移動を継続的に行うということではない。Locomotion 中細胞内で核は先行する核から伸びる微小管により持ち上げられることで縦長の紡錘体形となり、その際に核と中心体は接近してゆく。そして核が最後まで持ち上げられ、球体形となった後に中心体は前進を再開する。つまり、EGTA-AM 添加により核が縦長の紡錘体形で維持されることは、その後の移動過程である中心体の前進が再開されず、細胞移動の周期が停止し続けることを示唆する。こうした仮説を検討するため、脳スライスを用いたライブイメージングによって、EGTA-AM 添加による Locomotion 中細胞の細胞形態への影響を観察した。この観察は図 6D で EGTA-AM 添加に伴う移動速度への影響を検討したサンプルに対し行い、Vehicle を添加した Control 条件と EGTA-AM を添加した条件の各々で細胞形態を経時観察することで行った。Control 条件の Locomotion 中細胞は EGTA-AM 条件の細胞よりも長い距離を移動し、またその細胞体には縦長の

紡錘体形を示す時間帯と球体形を示す時間帯が交互に現れた (図 7C 左)。一方で EGTA-AM を添加した細胞では細胞体の形が縦長の紡錘体形のまま維持され、明確な球体形を示さないものが見られた (図 7C 右)。以上の結果から EGTA-AM 添加実験では Non-slow phase から Slow phase への移行、つまり核が微小管に最後まで持ち上げられ球体形になる過程が抑制され、その結果周期性をもつ細胞移動が停止したと考えられる。以上の結果は FPL・EGTA-AM の各種添加によって、Locomotion 様式移動が周期的移動の異なる過程で停止することを示唆し、これは「周期的な細胞小器官の動態・配置変化を繰り返す Locomotion 様式移動において、周期的な細胞内への Ca^{2+} 流入量の増減とそれに伴う Ca^{2+} シグナリング活性の増減が移動を促進する」という作業仮説を支持するものである。

4.5 移動中細胞特異的 CaMKI α cKO により放射状移動が障害される

次に、Locomotion 様式移動を実際に制御する、 Ca^{2+} シグナリングの分子実体検討を行った。こうした分子実体の候補として、当研究室の先行研究により CaMKI α が挙げられた。当研究室の先行研究では、CaMKI α が Locomotion 様式移動と並行して開始する大脳皮質幼若錐体細胞のイベントである軸索の伸長に対し機能すること (Ishihara et al., 2009)、また CaMKI α の Dominant negative 体の強制発現と、CaMKI α KD の各々の操作によって大脳皮質 II/III 層錐体細胞の放射状細胞移動が抑制されることが既に示されていた (Adachi-Morishima et al., unpublished)。なお CaMKI α 抗体を用いた Immunohistochemistry (IHC) により、Locomotion 中細胞が

CaMKI α 発現を示すことを今回新たに確認した (図 8A-C)。本研究は以上の先行研究の後続研究に位置づけられ、今回は新たに CaMKI α flox マウスを作成し、移動中細胞特異的な CaMKI α conditional knockout (cKO) による放射状細胞移動への影響を検討した。

まず CaMKI α flox マウス作成のストラテジーについて述べる。CaMKI α はエクソンを 12 個もちエクソン 2 に開始コドンが存在する。今回作成した Flox マウスラインはこのエクソン 2 を LoxP 配列ではさみ、Cre 酵素依存的に除去することで CaMKI α cKO を行う。なお ES 細胞での組換の成功を判断するスクリーニングを目的として Targeting vector (TV) は FRT で挟まれた Neomycin を含むが、最終的には Flippase を発現するマウスラインと掛けあわせ Neomycin は除去した (図 9A)。作成した CaMKI α flox マウスに対して Cre 酵素依存的なゲノムの組換が成功するか検討する目的で、E14.5 で Cre 酵素を IUE により導入し、E17.5 で脳を可溶化し粗抽出したゲノムをテンプレートとして PCR を行った。プライマー位置は図 6A の赤矢頭で示され、Cre 酵素依存的なゲノム組換が起きれば短い PCR 産物が合成される。PCR の結果 Cre 酵素を発現させた CaMKI α flox マウスで短い PCR 産物が合成され、Cre 酵素依存的ゲノム組換が起きることが確かめられた (図 9B)。

次に、移動中細胞特異的に CaMKI α cKO を行い、放射状細胞移動への影響を検討した。移動の評価は CaMKI α flox マウスに対し、E14.5 で IUE による Cre 酵素を発現させ E17.5 で脳切片を作成後、CP/IZ/VZ 各層を移動中の細胞の割合を算出することで行った。その結果 Cre 酵素を導入しないコントロール条件に比べ、Cre 酵素を導

入した条件では放射状細胞移動が低下することが分かった (*Camk1^{fl/fl}-Cre(-)*: CP=35 ± 3.8%, IZ=59 ± 3.3%, VZ=5.8 ± 1.9%, *Camk1^{fl/fl}-Cre(+)*: CP=20 ± 5.4%, IZ=75 ± 5.0%, VZ=4.1 ± 1.5%.) (図 9C)。なお強制発現させた Cre 酵素は、配列非特異的ゲノム組換えを行い、発現した細胞に対し毒性を発揮することが知られている (Loonstra et al., 2001)。そのため CaMKI α flox マウスではなく、Wild type (WT) マウスに対し IUE を行い、Cre 酵素を発現させ放射状移動を評価した。その結果、CaMKI α flox マウスで見られた放射状移動の低下は見られなかった (WT-Cre (-) : CP=22 ± 6.2%, IZ=73 ± 6.3%, VZ=4.7 ± 1.4%, WT-Cre (+) : CP=21 ± 3.7%, IZ=72 ± 2.5%, VZ=7.3 ± 2.6%.) (図 9D)。そのため CaMKI α cKO で見られた放射状移動の低下は Cre 酵素の非特異的ゲノム組換えによるものではなく、特異的ゲノム組み換えによる CaMKI α mRNA・タンパクの欠失によるものと考えられる。

更に CaMKI α cKO による放射状移動の障害が細胞形態・細胞内小器官のどういった異常によるものかを検討する目的で、Leading process の長さ と核・中心体間距離の測定を各々行った。Leading process であるが、これは Locomotion 中細胞の進行方向に伸びる神経突起で、適切な細胞が行われる際には周期的な伸長を繰り返す (Marin et al., 2006)。Leading process 内部には中心体等、適切な神経細胞移動に重要と言われる細胞小器官が数多く存在し (Higginbotham et al., 2007)、Leading process の適切な伸長はそれら細胞小器官の動態・配置変化に基づく移動過程が適切に行われているかを評価する一つの指標となる。Leading process 長の定量は、図 9C で放射状細胞移動を定量した脳切片を高倍で撮像したものを用いた。その結果、

CaMKI α cKO で Leading process の伸長が認められた (*Camk1^{fl/fl}*-Cre(-)= 44.6 \pm 1.9 μ m, *Camk1^{fl/fl}*-Cre(+)= 50.9 \pm 2.1 μ m) (図 9E)。また、CaMKI α cKO マウスにおける核・中心体間距離の測定は、中心体を dsRed-Centrin2 (CETN2) (Tanaka et al., 2004)、核を脳切片作成後のヘキスト染色で各々標識することで行った。その結果 CaMKI α cKO マウスの Locomotion 中細胞では核・中心体間距離が短縮していた (*Camk1^{fl/fl}*-Cre(-)=2.05 \pm 0.14 μ m, *Camk1^{fl/fl}*-Cre(+)= 1.65 \pm 0.13 μ m) (図 9F)。以上の結果より、移動中細胞特異的 CaMKI α cKO によって放射状移動が抑制され、その際 Locomotion 中細胞では Leading process の伸長と核・中心体の接近が起きていることが分かった。これらの結果は、CaMKI α が Leading process、核そして中心体の周期的な動態・配置変化を直接・間接的に制御し、Locomotion 様式移動を含む放射状細胞移動を制御することを示唆している。

4.6 移動中細胞特異的 CaMKI α KD により移動速度が減少する

次に、実際に CaMKI α 機能を阻害した際に、Locomotion 中細胞の移動速度に影響が出るかを検討した。本研究室の先行研究により、移動中細胞特異的 CaMKI α KD によって未成熟大脳皮質II/III層錐体細胞の放射状移動細胞が障害されることが既に示されていた (Adachi-Morishima et al., unpublished data)。そのため、CaMKI α KD による Locomotion 様式移動への影響を脳スライスを用いたライブイメージングにより検討した。実際の実験操作はまず、E14.5 の WT マウスに対し IUE による CaMKI α KD ベクターの導入を行い、約 60 時間後の E17.0 で脳スライスの作成を行った。次

に脳スライス中の CP を移動する Locomotion 中細胞を 12 時間観察した結果、コントロールベクターを導入したものに比べ、CaMKI α KD ベクターを導入したものでは、平均移動速度が低下した細胞が見られた (図 10A)。また各細胞から得られた移動速度の変遷を疑似カラー化したところ、CaMKI α KD 条件群で移動速度の減少傾向が見られ (図 10B)、平均移動速度を定量した結果 CaMKI α KD 群で平均移動速度の有意な減少が認められた (Control=6.4 \pm 0.7 μ m/hr, CaMKI α KD =3.5 \pm 0.5 μ m/hr) (図 10C)。更にこうした平均移動速度の低下が移動のどのような質的要因に基づくのかを検討した。Locomotion 中細胞を含め多くの神経細胞は、核・中心体が接近する際に移動速度を一過的に増加させる跳躍運動 (Saltatory movement) を行い、この跳躍運動が繰り返されることで細胞移動は進行してゆく (Edmondson et al., 1987)。今回は細胞毎にこの跳躍運動をイベントとして抽出し、イベントの発生頻度を検討した。まず、フレーム間の移動距離からフレーム毎の移動速度を算出し、30 μ m/hr 以上の移動速度を示した際に跳躍運動が起きたと定義した (図 10D)。跳躍運動の回数を Control 群、CaMKI α KD 群の各々でカウントした結果、CaMKI α KD 群で有意な減少が見られた (Control=5.1 \pm 0.6 (#/cell), CaMKI α KD=2.7 \pm 0.5 (#/cell)) (図 10F)。なお跳躍運動 1 イベント当たりで、イベントの継続時間・イベント当たりの積算移動距離を各々評価した結果、Control 群と CaMKI α KD 群の間に有意な違いは認められなかった (定量結果は非掲載)。更に、CaMKI α KD による Locomotion 中細胞への影響を Leading process の長さを指標として解析した結果、CaMKI α cKO と同じく Leading process の伸長が認められた (Control= 54.9 \pm 1.7 μ m, CaMKI α KD= 62.3 \pm

1.8 μ m) (図 10F) 。以上より CaMKI α KD により Locomotion 中細胞の移動速度が低下し、Leading process の異常な伸長が観察された。この Leading process の異常な伸長は CaMKI α cKOでも認められたものであり、CaMKI α cKOにおいても CaMKI α KD と同様に Locomotion の速度低下が起きていることが考えられる。

4.7 CaMKI α CA の強制発現により Locomotion 様式移動中の細胞移動速度が減少する

CaMKI α cKO/KD による CaMKI α の機能阻害では共に放射状細胞移動が障害され、更に放射状細胞移動の中で Locomotion 様式移動に異常が生じることが示唆された。ここで更に、移動中細胞特異的に CaMKI α の Constitutive active (CA) 体を発現させ、CaMKI α 機能を亢進した際の Locomotion 様式移動への影響を検討した。実験には IUE による移動中細胞特異的なプラスミド導入に加え、Tet-on システムによる時期特異的 CaMKI α CA の発現誘導を行った。Tet-on システムについてであるが、これには Tetracycline response element (TRE) 配列の下流に目的分子を挿入したプラスミドと、Reverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA) をコードするプラスミドを使用する。rtTA は Tetracycline の誘導體である Doxycycline (Dox) 存在下で TRE 配列に結合し、転写活性因子として TRE 下流の分子を発現誘導する (Gossen et al., 1992) 。

今回は TRE 配列の下流に mEGFP-CaMKI α CA を挿入し Dox 依存的な転写誘導を行った。CaMKI α CA 発現による Locomotion 様式移動への影響検討は、E14.5 で IUE

を行い、E17.5 で脳スライスを作成することで行った。脳スライスを用いて Dox 依存
的 mEGFP-CaMKI α CA の発現誘導を観察したところ、Dox 添加から約 2 時間程度で
mEGFP 輝度値の上昇が見られた（結果は非掲載）。そのため Dox 添加前後で 6 時間
ずつ脳スライス中を移動する Locomotion 中細胞をトラックしたところ、Dox 添加に
伴う CaMKI α CA 発現によって平均移動速度が低下していた（Control: Before=13.6
 \pm 1.4 μ m/hr, After=12.4 \pm 1.3 μ m/hr, CaMKI α -CA: Before=14.0 \pm 1.2 μ m/hr,
After=1.7 \pm 0.2 μ m/hr）（図 11A）。またライブイメージング後に脳スライスを PFA
固定し、細胞形態を観察した結果、CaMKI α CA を強制発現した Locomotion 中細胞
は明らかな形態異常を示し、球体に近い形状となっていた（図 11B）。こうした細胞
形態の変化から、CaMKI α CA を強制発現した際にも FPL 添加を行った際と同様に、
核形態が球体に近い性質を示すことが考えられた。そのため IUE により核マーカ
ーである mTurquoise2-NLS を導入し、CaMKI α CA 強制発現実験を行った。この実験
では脳スライスを Dox 添加後 6 時間で PFA 固定し CP を移動する細胞内の核形態を
評価した。その結果 Control 条件における移動中細胞の核形態と比較し、CaMKI α CA
強制発現条件では核形態が球体形に近づくものが複数見られた（図 11C）。

以上をまとめると CaMKI α CA の強制発現に伴う CaMKI α 機能、すなわち Ca²⁺シ
グナリング活性の亢進により、Locomotion 様式移動が抑制され、核形態が球体形に
近い細胞が見られるようになった。ここでの実験結果と CaMKI α cKO/KD の実験結
果を合わせて考えると、CaMKI α は適切な放射状移動に必要であるが、過剰な活性も
また放射状移動を抑制することが分かる。すなわち CaMKI α の適切な酵素活性の強度、

あるいは酵素活性の適切な時間変化が放射状移動を促進すると考えられる。また CaMKI α CA 強制発現実験では、FPL 添加実験と同じく移動中細胞の核形態が球体形に近づいた。すなわち FPL 添加による細胞内 Ca²⁺流入量の増加時と同様に、CaMKI α CA 強制発現による Ca²⁺シグナリング活性の亢進時にも、周期的に進む Locomotion 様式移動の Slow phase から Non-slow phase への移行が抑制され、その結果移動速度が低下したと考えられる。

第5章 考察

5.1 Locomotion 様式移動における周期的な移動速度の変化と

細胞内 Ca^{2+} 流入量の相関関係

本研究は、脳スライスを用いた実験系で初めて、移動中の神経細胞における周期的な移動速度の変化と細胞内 Ca^{2+} 流入量（頻度）との相関を記述することに成功した（図 4A）。また低速移動中（Slow phase）では細胞内 Ca^{2+} 流入量が多く、低速移動中ではない時間帯（Non-slow phase）では細胞内 Ca^{2+} 流入量が少ない（図 4A-E、図 12A）という相関関係は神経細胞移動におけるいかなる実験系においても報告の無い、全く新たなものである。移動中細胞内で一過的な Ca^{2+} 流入が起きることや、 Ca^{2+} シグナリングが細胞移動を制御することは多くの神経細胞種で言われてきた（Komuro and Rakic., 1992; Zheng et al., 2007; Guan et al., 2007）。しかしそうした細胞内 Ca^{2+} シグナリングが、周期的に細胞小器官の動態・配置変化を繰り返す細胞移動のいかなる過程において機能するかという作用点については多くが不明であった。本研究で明らかとなった周期的な細胞移動速度の増減と細胞内 Ca^{2+} 流入量との相関関係は、 Ca^{2+} シグナリングが細胞移動のいかなる過程において機能し得るかを検討する上で有用かつ不可欠と思われる。またそうした細胞内 Ca^{2+} シグナリングの活性は、細胞内 Ca^{2+} 流入量の増減に対応しその活性を上下させると考えられるため、周期的な細胞移動速度の増減に対応する形で細胞内への Ca^{2+} 流入量・ $\text{CaMKI}\alpha$ 活性が増減することが考えられた。そのため本研究では、「周期的な細胞小器官の動態・配置変化を繰り返

す Locomotion 様式移動において、周期的な細胞内への Ca^{2+} 流入量の増減とそれに伴う Ca^{2+} シグナリング活性の増減が移動を促進する」という作業仮説を立て、仮説の検証を行った。

5.2 周期的な細胞内 Ca^{2+} 流入量の変動による Locomotion 様式移動の制御

先の作業仮説より、周期的に変化する細胞内 Ca^{2+} 流入量を人為的に増減させた際には、細胞移動の周期性が乱れ、細胞移動速度が低下することが考えられた。本研究ではまず L-VDCC を標的とし、FPL を用いた薬理操作により細胞内への Ca^{2+} 流入量を増大させた。そうした操作の結果 Locomotion 中細胞の移動速度は減少し (図 5G)、また細胞体中の核は球体形に近づくという Slow phase に特徴的な表現形を示した (図 7A)。更に EGTA-AM 添加により細胞内 Ca^{2+} 流入量・ベースラインでの細胞内 Ca^{2+} 濃度を減少させた際にも、FPL 添加時と同様に Locomotion 中細胞の移動速度は減少した (図 6D)。しかしその一方で FPL 添加時とは異なり、EGTA-AM 添加時には細胞体中の核は球体形ではなく、縦長の紡錘体形に近づくという Non-slow phase に特徴的な表現形を示した (図 7B)。更にライブイメージングにより EGTA-AM 添加による細胞体形への影響を経時観察した結果、細胞体は紡錘体形を維持し続けた (図 7C)。以上の結果は FPL・EGTA-AM の各種添加によって、Locomotion 中細胞が周期的移動の異なる過程 (Slow phase・Non-slow phase) で停止することを示唆している (図 12A)。すなわち Locomotion 中細胞は、まず細胞内 Ca^{2+} 流入量が多い時間帯では Slow phase に滞留し、細胞内 Ca^{2+} 流入量が減少するに従い Non-slow phase

へ移行する。次に、細胞は Non-slow phase において核が縦長の紡錘体形となり前進するが、その最後期において細胞内 Ca^{2+} 流入量の増加に伴い再び球体形に近づき、再び Slow phase へ移行する。以上の様に周期的な細胞内への Ca^{2+} 流入量の増減が細胞小器官の動態・配置変化を制御し Locomotion 様式移動が進行してゆくと考えられる (図 12A)。

5.3 Locomotion 様式移動を制御する新規分子 CaMKI α の発見

次に細胞内 Ca^{2+} 流入量の増減に応じて Locomotion 様式移動を制御する分子の探索を行い、著者の研究成果と本研究室による研究成果から、Locomotion 様式移動を制御する新規分子 CaMKI α が特定された。具体的な実験結果としては、CaMKI α cKO/KD による機能阻害実験を行ったところ、各実験で放射状移動が抑制された (図 9C, Adachi-Morishima et al., unpublished data)。また CaMKI α cKO/KD による機能阻害実験の結果、各実験に共通して Locomotion 中細胞の Leading process が異常に伸長するという表現形が見られた (図 9E, 図 10F)。更に CaMKI α cKO によって Locomotion 中細胞内の核と中心体が異常に接近することが明らかとなった (図 9F)。そしてライブイメージングを用いた実験から CaMKI α KD により Locomotion 中細胞の移動速度が低下することが分かった (図 10A-C)。以上の研究結果はまず、CaMKI α が Locomotion 様式移動を制御することを示唆する。次に CaMKI α 機能阻害による Leading process の伸長と、CaMKI α cKO による核・中心体間距離の短縮について合わせて考察する。Leading process は Locomotion 中細胞が Slow phase から Non-slow

phase に移行する前段階として伸長し、Non-slow phase において Leading process の中を中心体と核が進行する (Schaar et al., 2005., Marin et al., 2006) 。また Non-slow phase が進むにつれて中心体から伸びる微小管が核を持ち上げ、中心体と核との距離は短縮してゆく (Schaar et al., 2005., Marin et al., 2006) 。以上の先行研究による知見と、CaMKI α cKO により Locomotion 様式移動が抑制されたこと、更に CaMKI α cKO により Leading process の伸長と核・中心体間距離の短縮が並行して起きたという表現形を全て合わせて考える。まず CaMKI α cKO により、Locomotion 中細胞は Leading process が伸長する Non-slow phase の段階で停止していたと考えられる。更に CaMKI α cKO により核・中心体間距離が短縮したことから、Non-slow phase の中でも核が中心体に持ち上げられ接近する後期で停止していたことが考えられる。こうした考察は核が微小管によって持ち上げられ移動速度が一過的に上昇する跳躍的運動 (Saltatory movement) のイベント数が、CaMKI α KD によって減少することからも支持される (図 10E) 。また更に、EGTA-AM 添加により核形態が縦長の紡錘体形となり Non-slow phase で停止するという考察とも合致する。以上のような細胞内 Ca²⁺流入量・Ca²⁺シグナリング活性を抑制した際に、Locomotion 中細胞が Non-slow phase で停止するというモデルが適切かを検討するため、今後 CaMKI α cKO による核形態への影響を検討する予定である。

更に本研究では CaMKI α 機能阻害実験の他に CaMKI α CA を強制発現させることで、CaMKI α 機能亢進実験を行った。その結果 CaMKI α 機能を阻害した際と同様に、CaMKI α 機能を亢進した際にも Locomotion 様式移動が抑制された (図 11A) 。更に

は、CaMKI α の機能亢進によって細胞体の形態は球体形に近づき（図 11B）、核マーカーを用いた実験により核形態も球体形に近づくことが分かった（図 11C）。すなわち、FPL 添加・CaMKI α 機能亢進の各操作によって細胞内 Ca²⁺流入量の増大・Ca²⁺シグナリング活性の亢進が各々起こり、いずれの操作によっても Slow phase で滞留する細胞が増え、Locomotion 様式移動が抑制されたと考えられる（図 12A）。

以上をまとめると、まず EGTA-AM 添加・CaMKI α cKO/KD 各々の操作によって、細胞内 Ca²⁺流入の抑制・Ca²⁺シグナリングの抑制が各々引き起こされ、いずれの操作でも Locomotion 様式移動が抑制された。また各操作に伴う細胞形態・細胞小器官の表現形から Locomotion 中細胞は Non-slow phase の後期で停止していたことが考えられる。次に FPL 添加・CaMKI α CA 強制発現の各操作によって、細胞内 Ca²⁺流入の促進・Ca²⁺シグナリングの亢進が各々引き起こされ、いずれの操作でも Locomotion 様式移動が抑制された。さらに FPL 添加・CaMKI α CA 強制発現の各操作によって細胞形態・細胞小器官の表現形から Locomotion 中細胞は Slow phase で停止していたことが考えられる。すなわち、「周期的な細胞小器官の動態・配置変化を繰り返す Locomotion 様式移動において、周期的な細胞内への Ca²⁺流入量の増減とそれに伴う Ca²⁺シグナリング活性の増減が移動を促進する」といった、細胞移動速度と Ca²⁺流入量との間にある相関関係から導き出された作業仮説は、部分的ではあるが正しいことが示された（図 12A）。

5.4 今後検討を予定する項目

先に挙げた作業仮説の検討を更に進める目的で、以下に挙げる項目について検討を行う予定である。まず本研究では脳スライスを用いたライブイメージングにより細胞移動速度と細胞内 Ca^{2+} 流入量の相関関係を明らかにしたが (図 4A)、この際には TagRFP による細胞体の可視化と GCaMP6s による細胞内 Ca^{2+} 上昇イベントの可視化を行った。今後は更に mTurquoise2-NLS による核の可視化を並行して行い、細胞移動速度と細胞内 Ca^{2+} 流入量の情報に加え、核の形態、配置そして動態の変化から移動中細胞がどういった移動過程に位置するかをより厳密に特定し、3 者間での相関関係を明らかにする予定である。

次に FPL 添加によって細胞内への Ca^{2+} 流入量を増加させた際に、実際に CaMKI α 活性が亢進するかを検討する。CaMKI α は Ca^{2+} /CaM の結合に加え、CaMKK からリン酸化を受けることで活性化するが、このリン酸化部位は Thr-177 であることが既に特定されている (Haribabu et al., 1995)。更にこのリン酸化を受けた Thr-177 を認識するリン酸化抗体も市販されているため、FPL 添加後に脳スライスを可溶化し、リン酸化抗体を用いた Western blotting を行うことで、CaMKI α 活性が亢進したかを検討する予定である。

更に本研究では CaMKI α 機能阻害実験の結果から細胞内 Ca^{2+} 流入と Ca^{2+} シグナリングを各々抑制した際には Locomotion 様式移動が Non-slow phase で停止するという仮説を得たが、こうした仮説が正しければ CaMKI α cKO により核形態は縦長の紡錘体形 (EGTA-AM 添加時の表現形と共通) となることが想定される。そのため

CaMKI α cKO に伴う核形態への影響検討を行う予定である。また FPL 添加実験・CaMKI α 機能亢進実験の結果から細胞内 Ca²⁺流入を増大・Ca²⁺シグナリングを亢進させた際には、Locomotion 様式移動が Slow phase で停止するという仮説を得たため、更なる検討として CaMKI α 機能を亢進した際の核形態を定量的に評価する予定である。この際に仮説が正しければ CaMKI α 機能亢進によって核形態は球体形に近づく (FPL 添加時の表現形と共通)。なおこれは本研究で既に部分的に示された (図 11C)。

そして、CaMKI α の下流に位置する標的分子を特定することで、Locomotion 様式移動を制御する Ca²⁺シグナリングカスケードが最終的にどういった分子に帰結するかを検討する。Locomotion 中細胞において CaMKI α の基質候補となり、Locomotion 様式移動を直接制御し得る分子として Myosin II モータータンパクが挙げられる。Myosin II は重鎖と軽鎖の複合体からなり、この軽鎖中にリン酸化を受けることでモーター活性を亢進させる制御ドメインが存在する (Somlyo and Somlyo, 2003)。制御ドメイン内の Ser-19 がリン酸化を受けることで Myosin II はモータータンパクとして活性化するが (Ikebe and Hartshorne, 1985)、*in vitro* と Hela 細胞を用いた実験系により、CaMKI α が Ser-19 をリン酸化することが明らかにされている (Suizu et al., 2002)。また Myosin II 依存的神経細胞移動の制御機構についてであるが、これは Myosin II とアクチンが協調的に機能することでなされ、中心体移動の促進 (Solecki et al., 2009; Shinohara et al., 2012)、移動中細胞後部でのアクチン束の集積による核移動の促進 (Martini et al., 2010; Shinohara et al., 2012) が具体的機能として言われている。しかし Locomotion 様式移動においては、こうした Myosin II

とアクチンの協調的機能については不明な点が多く、Locomotion 様式移動を含めた放射状移動細胞において CaMKI α が Myosin II を活性化し得るか、また Myosin II とアクチンが強調的に働き移動を促進するかを検討する予定である。

最後に、本研究では各実験結果を総合的に考察することで、「移動中細胞内における Ca²⁺の周期的変動と、その下流で制御を受ける CaMKI α 酵素活性の周期的変動が、移動を制御する」という結論を得た。こうした結論を得るために、本研究では、移動中細胞内での Ca²⁺動態の観察、移動中細胞内での Ca²⁺動態の操作、そして移動中細胞内における CaMKI α 活性の操作を各々行った。しかしこれらの実験結果から、実際に「生理条件」において細胞内 Ca²⁺の変動と CaMKI α 酵素活性の変動が細胞移動を制御するという上記結論を導くには2つの問題点がある。1つ目はまず、本研究で行った細胞内 Ca²⁺動態の操作によって、細胞内 Ca²⁺が生理的な変動幅を逸脱していた可能性である。2つ目には、本研究での細胞内における CaMKI α 酵素活性の操作によって、CaMKI α 酵素活性が生理的な変動幅を逸脱している可能性である。これら2点の問題点に対して、細胞内 Ca²⁺動態、そして細胞内 CaMKI α 酵素活性を生理的な変動幅で変化させ、細胞移動と細胞形態について検討する目的で、以下に述べる実験系の使用が考えられる。まず細胞内 Ca²⁺を生理的な変動幅で減少させた際に、細胞移動と細胞形態がいかに変化するかについてであるが、ここでも本研究で用いた EGTA-AM を用いる。本研究内では、EGTA-AM の添加後に細胞内への薬剤負荷の時間として30分のインターバルを置いているが、この間に EGTA-AM は徐々に細胞内へと負荷され、細胞内 Ca²⁺上昇イベントの減少と細胞内ベーサルカルシウムの減少が認められるよ

うになる。そのため、EGTA-AM を添加した直後から、細胞移動、細胞形態、そして GCaMP6s による細胞内 Ca^{2+} 動態の可視化を行う。そうすることで、一過的であるが、細胞内 Ca^{2+} が生理的変動幅で減少をした際の細胞移動と細胞形態への影響を検討できるものと考えられる。次に、細胞内 Ca^{2+} を生理的な変動幅で上昇させた際に、細胞移動と細胞形態がいかに変化するかについてであるが、ここではチャンネルロドプシン (Tye et al., 2012) 、あるいは近年報告された、遺伝子コード型のケイジドカルシウムの使用が考えられる (Fukuda et al., 2014) 。後者は光受容タンパク由来の LOV ドメイン、カルモジュリン配列、そして M13 からなり、光照射によりタンパク構造が変化し、カルモジュリンに結合した Ca^{2+} が細胞内へ放出されるというものである。上記した光遺伝学的ツールはいずれも、光照射の頻度、継続時間、そして光強度を適宜設定することで、実際の細胞内 Ca^{2+} 上昇をある程度再現した形で、繰り返し細胞内 Ca^{2+} 上昇を人為的に引き起こすことができると考えられる。更に、CaMKI α 酵素活性を人為的に減少させ、生理条件における CaMKI α 機能を検討する方法について述べる。本研究で行われた CaMKI α cKO 実験によって CaMKI α が細胞移動に対し生理条件において必要であることが確認されたが、補足的にカルシウムカルモジュリンキナーゼ阻害剤である KN-93 (Ageta-Ishihara et al., 2010) を使用し、移動と細胞形態を観察することも考えられる。最後に CaMKI α 酵素活性を生理的な変動幅で上昇させた際に、細胞移動と細胞形態がいかに変化するかについてであるが、ここでも本研究で用いた Tet-On システムによる CaMKI α CA の強制発現を行う。本研究では Tet-On による CaMKI α 強制発現に伴う細胞移動・細胞形態の観察として、Dox 添加後に 1 時間

あるいは 3 時間のインターバルを置いている。そして mEGFP で標識された CaMKI α CA の発現は mEGFP を指標に Dox 添加後から 2 時間程度で観察されるが、実際には検出感度以下のタンパク発現は更に速くから行われていることが考えられる。そのため、Dox 添加直後から細胞移動と細胞形態を観察することで、一過的であるが、細胞内の CaMKI α 酵素活性が生理的変動幅で減少した際の細胞移動と細胞形態への影響を検討できると考えられる。以上の「生理条件」において細胞内 Ca²⁺の変動と CaMKI α 酵素活性の変動が細胞移動を制御することを検討する実験については必要性を適宜考慮し行う予定である。

5.5 研究成果の意義

本研究は各種細胞小器官の周期的な動態・配置変化が神経細胞移動の本質であると考え、そうした周期性の制御機構を明らかにすることを目的とした。こうした神経細胞移動の制御機構解明により得られる研究成果の意義であるが、これはまず精緻に細胞が配置され緻密で多様な構造をもつ私達の脳が、どのように形作られるかという生命科学における本質的問いに答える一助となるものと考えられる。また発生期における神経細胞移動の異常は古くは滑脳症等の明らかな脳構造異常の原因として挙げられてきた (Gleeson et al., 1998) 。近年では更に統合失調症や自閉症といった脳構造の明らかな異常を伴わず、長らく原因が不明とされてきた疾患の背景にも神経細胞移動の異常があることが明らかにされつつある (Ishizuka et al., 2011; Peñagarikano et al., 2011)。すなわち神経細胞移動の制御機構解明によって、こうした疾患原因のより正

確な把握と対処が可能になると考えられる。

引用文献

Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Fujii H, Mano T, Blaeser F, Chatila TA, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, Okuno H, Bito H. Control of Cortical Axon Elongation by a GABA-Driven Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase Cascade. *J. Neurosci.* 2009;29:13720-13729.

Aiba A, Kano M, Chen C, Stanton ME, Fox GD, Herrup K, Zwingman TA, Tonegawa S. Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell.* 1994;79:377-88.

Bando Y, Hirano T, Tagawa Y. Dysfunction of KCNK potassium channels impairs neuronal migration in the developing mouse cerebral cortex. *Cereb Cortex.* 2014a;24:1017-29.

Bando Y, Irie K, Shimomura T, Umeshima H, Kushida Y, Kengaku M, Fujiyoshi Y, Hirano T, Tagawa Y. Control of Spontaneous Ca^{2+} Transients Is Critical for Neuronal Maturation in the Developing Neocortex. *Cereb Cortex.* 2014b:(Epub ahead of print)

Bellion A, Baudoin JP, Alvarez C, Bornens M, Métin C. Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J Neurosci.* 2005;25:5691-9.

Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron.* 1998;21:13-26

Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca^{2+} - and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell.* 1996;87:1203-14.

Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell.* 1999;96:795-806.

Brose K, Tessier-Lavigne M. Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr Opin Neurobiol.* 2000;10:95-102.

Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS. Ultrasensitive

fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*. 2013;499:295-300.

Cooper JA. A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends Neurosci*. 2008;31:113-9.

Darcy DP, Isaacson JS. L-type calcium channels govern calcium signaling in migrating newborn neurons in the postnatal olfactory bulb. *J Neurosci*. 2009;29:2510-8

Deisseroth K, Bito H, Tsien RW. Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*. 1996;16:89-101.

Fukuda N, Matsuda T, Nagai T. Optical Control of the Ca²⁺ Concentration in a Live Specimen with a Genetically Encoded Ca²⁺-Releasing Molecular Tool. *ACS Chem Biol*. 2014;9:1197-203.

Ghashghaei HT, Lai C, Anton ES. Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nat Rev Neurosci*. 2007;8:141-51.

Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, and Walsh CA. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*. 1998;92:63-72.

Goldberg J, Nairn AC, and Kuriyan J. Structural basis for the autoinhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Cell*. 1996;84:875-887.

Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:5547-51.

Greig LC, Woodworth MB, Galazo MJ, Padmanabhan H, Macklis JD. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14:755-69.

Guan CB, Xu HT, Jin M, Yuan XB, Poo MM. Long-range Ca^{2+} signaling from growth cone to soma mediates reversal of neuronal migration induced by slit-2. *Cell*. 2007;129:385-95.

Haribabu B, Hook SS, Selbert MA, Goldstein EG, Tomhave ED, Edelman AM,

Snyderman R, and Means AR. Human calcium-calmodulin dependent protein kinase I: cDNA cloning, domain structure and activation by phosphorylation at threonine-177 by calcium-calmodulin dependent protein kinase I kinase. *EMBO J.* 1995;14:3679-3686

Hatten ME. Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci.* 1999;22:511-39.

Higginbotham HR, Gleeson JG. The centrosome in neuronal development. *Trends Neurosci.* 2007;30:276-283.

Iino M. Functional properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and Ca²⁺ signaling. *Soc Gen Physiol Ser.* 1996;51:67-73.

Ikebe M, Hartshorne DJ. Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase. *J Biol Chem.* 1985;260:10027-31.

Inoue M, Takeuchi A, Horigane SI, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Fujii H, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito H. Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2. *Nat Methods.* 2015;12:64-70.

Ishizuka K, Kamiya A, Oh EC, Kanki H, Seshadri S, Robinson JF, Murdoch H, Dunlop AJ, Kubo K, Furukori K, Huang B, Zeledon M, Hayashi-Takagi A, Okano H, Nakajima K, Houslay MD, Katsanis N, Sawa A. DISC1-dependent switch from progenitor proliferation to migration in the developing cortex. *Nature*. 2011;473:92-6.

Kamata A, Sakagami H, Tokumitsu H, Owada Y, Fukunaga K, and Kondo H. Spatiotemporal expression of four isoforms of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I in brain and its possible roles in hippocampal dendritic growth. *Neurosci Res*. 2007;57:86-97.

上條 諭志. 発生期神経細胞におけるカルシウム動態解析. 東京大学大学院博士論文. 2014

Kim JH, Lee SR, Li LH, Park HJ, Park JH, Lee KY, Kim MK, Shin BA, Choi SY. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One*. 2011;6:e18556.

Kitazawa A, Kubo K, Hayashi K, Matsunaga Y, Ishii K, Nakajima K. Hippocampal pyramidal neurons switch from a multipolar migration mode to a novel "climbing"

migration mode during development. *J Neurosci.* 2014;34:1115-26.

Komuro H, Rakic P. Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science.* 1992;257:806-9.

Komuro H, Rakic P. Intracellular Ca^{2+} fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron.* 1996;17:275-85.

Krogsgaard-Larsen P, Johnston GA, Lodge D, Curtis DR. A new class of GABA agonist. *Nature.* 1997;268:53-55

Kumada T, Komuro H. Completion of neuronal migration regulated by loss of Ca^{2+} transients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:8479-84.

LoTurco JJ, Bai J. The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends Neurosci.* 2006;29:407-413.

Manabe T, Renner P, Nicoll RA. Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents. *Nature.* 1992;355:50-5.

Maness PF, Schachner M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci.* 2007;10:19-26.

Mank M, Santos AF, Direnberger S, Mrsic-Flogel TD, Hofer SB, Stein V, Hendel T, Reiff DF, Levelt C, Borst A, Bonhoeffer T, Hübener M, Griesbeck O. A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging. *Nat Methods.* 2008;5:805-11.

Marín O, Rubenstein JL. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2:780-90.

Marín O, Valdeolmillos M, Moya F. Neurons in motion: same principles for different shapes? *Trends Neurosci.* 2006;29:655-61.

Martini FJ, Valdeolmillos M. Actomyosin contraction at the cell rear drives nuclear translocation in migrating cortical interneurons. *J Neurosci.* 2010;30:8660-70.

Matsushita M, Nairn AC. Characterization of the mechanism of regulation of

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I by calmodulin and by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase. J Biol Chem. 1998;273:21473-81.

Mikoshiba K. The InsP3 receptor and intracellular Ca²⁺ signaling. Curr Opin Neurobiol. 1997;7:339-345

Mishina M, Sakimura K. Conditional gene targeting on the pure C57BL/6 genetic background. Neurosci Res. 2007;58:105-12.

Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL. Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. Nat Neurosci. 2001;4:143-50.

Nadarajah B, Parnavelas JG. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. Nat Rev Neurosci. 2002;3:423-32.

Nakai J, Ohkura M, Imoto K. A high signal-to-noise Ca probe composed of a single green fluorescent protein. Nat Biotechnol. 2001;19:137-41.

Namiki S, Sasaki T, Matsuki N, Ikegaya Y. Regional difference in stainability with calcium-sensitive acetoxymethyl-ester probes in mouse brain slices. *Int J Neurosci*. 2009;119:214-26.

Nishimura YV, Shikanai M, Hoshino M, Ohshima T, Nabeshima Y, Mizutani K, Nagata K, Nakajima K, Kawauchi T. Cdk5 and its substrates, Dcx and p27kip1, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons. *Development*. 2014;141:3540-50.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*. 2001;409:714-20.

Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*. 2004;7:136-44.

Peñagarikano O, Abrahams BS, Herman EI, Winden KD, Gdalyahu A, Dong H, Sonnenblick LI, Gruver R, Almajano J, Bragin A, Golshani P, Trachtenberg JT, Peles E, Geschwind DH. Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal

migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell*. 2011;147:235-46.

Petreaanu L, Gutnisky DA, Huber D, Xu NL, O'Connor DH, Tian L, Looger L, Svoboda K. Activity in motor-sensory projections reveals distributed coding in somatosensation. *Nature*. 2012;489:299-303.

Rakic P. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus Rhesus*. *J Comp Neurol*. 1971;141:283-312.

Saito T. In vivo electroporation in the embryonic mouse central nervous system. *Nat Protoc*. 2006;1:1552-8.

Sanchez-Vives MV, McCormick DA. Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci*. 2000;3:1027-34.

Schaar BT, McConnell SK. Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:13652-7.

Sekine K, Honda T, Kawauchi T, Kubo K, Nakajima K. 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. *J Neurosci.* 2011;31:9426-39.

Shinohara R, Thumkeo D, Kamijo H, Kaneko N, Sawamoto K, Watanabe K, Takebayashi H, Kiyonari H, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumiya S. A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nat Neurosci.* 2012;15:373-80.

Solecki DJ, Trivedi N, Govek EE, Kerekes RA, Gleason SS, Hatten ME. Myosin II motors and F-actin dynamics drive the coordinated movement of the centrosome and soma during CNS glial-guided neuronal migration. *Neuron.* 2009;63:63-80.

Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003;83:1325-58.

Spitzer NC. Electrical activity in early neuronal development. *Nature.* 2006;444:707-12.

Suizu F, Fukuta Y, Ueda K, Iwasaki T, Tokumitsu H, Hosoya H. Characterization

of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I as a myosin II regulatory light chain kinase in vitro and in vivo. *Biochem J.* 2002;367:335-45.

Tabata H, Nakajima K. Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience.* 2001;103:865-72.

Tabata H, Nakajima K. Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci.* 2003;23:9996-10001.

Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Kamijo S, Ageta-Ishihara N, Fujii H, Okuno H, Bito H. Differential roles for CaM kinases in mediating excitation-morphogenesis coupling during formation and maturation of neuronal circuits. *Eur J Neurosci.* 2010;32:224-230.

Takeuchi T, Nomura T, Tsujita M, Suzuki M, Fuse T, Mori H, Mishina M. Flp recombinase transgenic mice of C57BL/6 strain for conditional gene targeting. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293:953-7.

Tanaka T, Serneo FF, Higgins C, Gambello MJ, Wynshaw-Boris A, Gleeson JG.

Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J Cell Biol.* 2004;165:709-21. Tsai JW,

Tsai JW, Bremner KH, Vallee RB. Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nat Neurosci.* 2007;10:970-9.

Tye KM, Deisseroth K. Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13:251-66.

Yanagida M, Miyoshi R, Toyokuni R, Zhu Y, Murakami F. Dynamics of the leading process, nucleus, and Golgi apparatus of migrating cortical interneurons in living mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:16737-42.

Yokota Y, Gashghaei HT, Han C, Watson H, Campbell KJ, Anton ES. Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration in the developing cerebral cortex. *PLoS One.* 2007;2:e794.

Zhang X, Lei K, Yuan X, Wu X, Zhuang Y, Xu T, Xu R, Han M. SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice. *Neuron.* 2009;64:173-87.

Zheng JQ, Poo MM. Calcium signaling in neuronal motility. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:375-404.

図説

図1 研究の背景

A, 大脳皮質幼若期II/III層錐体細胞の放射状細胞移動

II/III層錐体細胞となるものは胎生期E14.5で神経細胞へと分化し（図左）、72時間後のE17.5にはCPからMZを移動する（図中央）。なお大脳皮質各層の錐体細胞はVZで分化し、幹細胞から脳表側へと放射状に伸びるGlial fiberを伝いSVZにまで移動する。ここで一度、移動中神経細胞はGlial fiberから離れBipolar cellからMultipolar cellとなる。Multipolar cellはIZの脳表側まで遊走移動し、そこで再びGlial fiberに接着しLocomotionと呼ばれる移動様式を開始する。この際に細胞形態は再び極性をもったBipolar cellとなり、またほぼ同時期に、進行方向とは反対側の細胞極から将来軸索となるtrailing processを伸ばし始める。Locomotionを始めた神経細胞は、CPへ侵入しさらにMZにまで移動する。CPからMZを通過する過程のなかで、遅くに分化した神経細胞は早くに分化した細胞を追い越し、よりPSに近い位置へと移動する（inside-out manner）。発生後期にはMZは大脳皮質I層、CPはII～VI層へとそれぞれ分化する（図右）。

B, 細胞小器官の周期的動態・配置変化に基づくLocomotion様式移動

Locomotion様式の移動をする神経細胞内では、中心体から伸びた微小管が籠のように核を包み込み、各種分子群を介し核膜と結合している。Locomotion様式移動の諸過程についてであるが、ここではまず核と中心体が近接しており、移動速度は低い（Slow phase）（図左）。次にLeading process内でまず中心体が進み（図中左）、中心体から伸びる微小管に持ち上げられる形で核が移動する（図中左）。この際に細胞は移動速度を増加させる（Non-slow phase）。そして次に核と中心体は再び近接し、移動速度は低下する（図右）。すなわちLocomotion様式移動は周期的な中心体、微小管、そして核の動態・配置変化に基づき、移動速度の増加・減少を繰り返す。

C, *In utero* electroporationによる大脳皮質幼若期II/III層錐体細胞の可視化

In utero electroporation (IUE) を行うことで、プラスミドを用いた細胞の可視化あるいは遺伝学的操作を細胞種特異的に行うことができる。この手法では、胎児マウスの脳室にプラスミドを打ち込みエレクトロポレーションを行うことで、脳室周囲のVZに存在する細胞にのみ時期特異的にプラスミドを導入することができる。本研究で観察対象とした大脳皮質幼若期II/III層錐体細胞はE14.5においてVZ内で神経細胞へ分化するため、E14.5胎児マウスに対しGCaMP6sとTagRFPをコードするプラスミドを打ち込みIUEを行った（図左）。その後母体内で胎児をE17.5まで発育させた後に脳スライスを作成し（図中）、Locomotion様式移動を示す移動中細胞のうちCPを移動中のものを観察した。またそうした移動中細胞に発現するGECIのGCaMP6sと細胞体マーカーのTagRFPを経時的に観察することで、細胞内Ca²⁺の変動と移動速度増減を定量した（図右）。

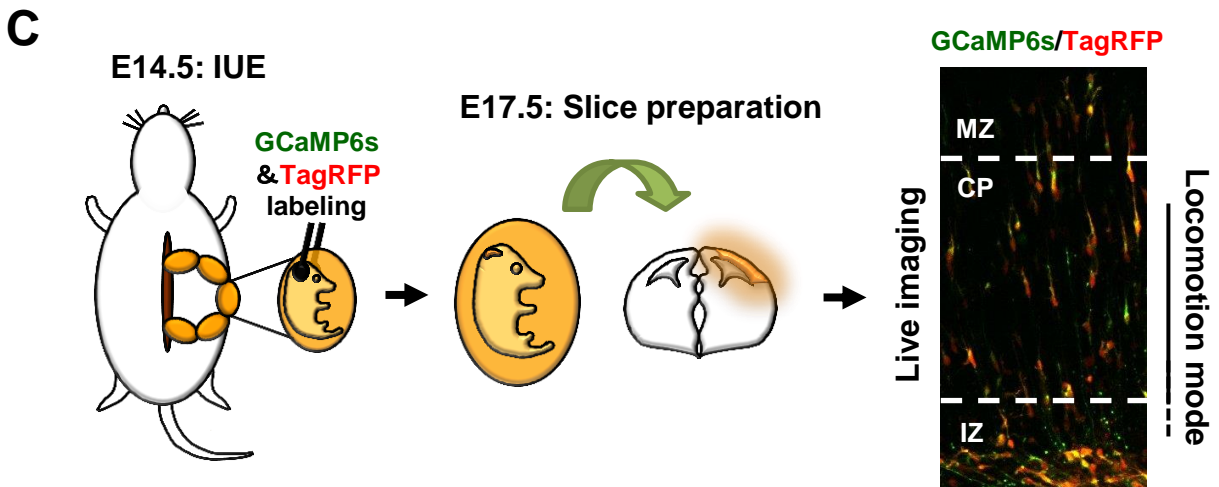
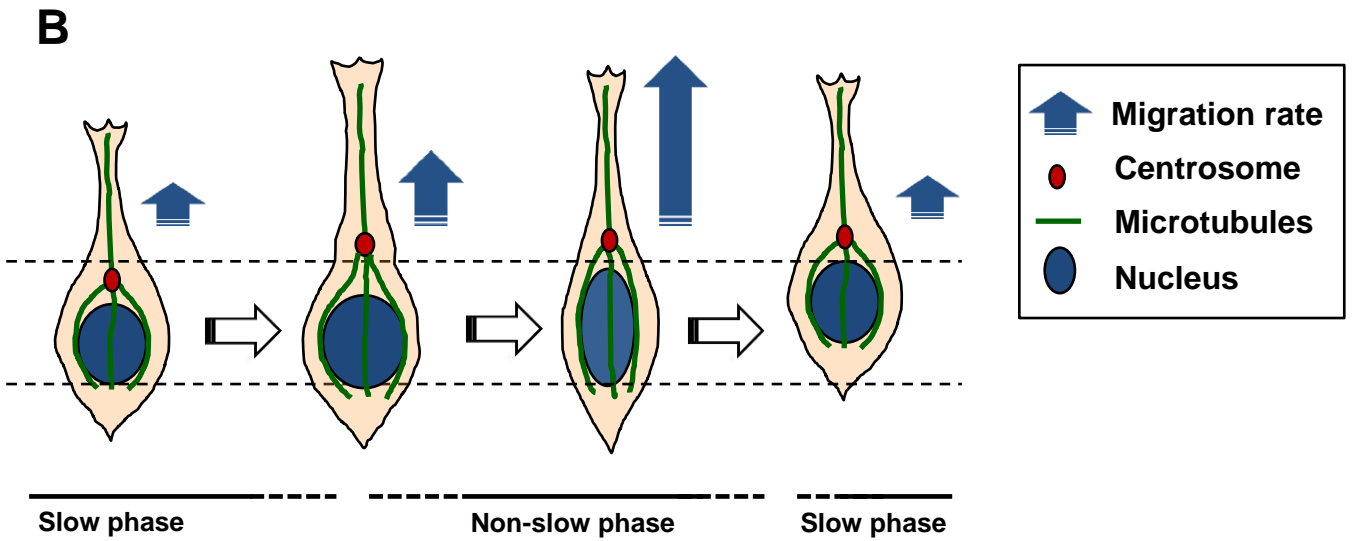
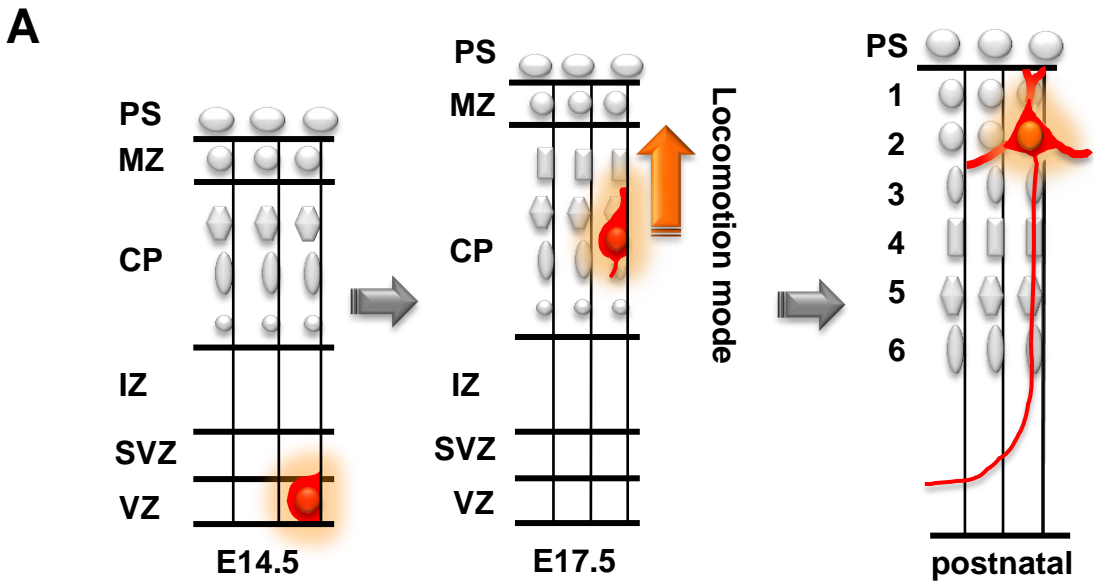


図2 大脳皮質各層を放射状移動する細胞の細胞内Ca²⁺動態の測定

A, ライブイメージング後のヘキスト染色による脳スライス大脳皮質各層の境界特定

IUEによりE14.5でpCAG-GCaMP6s-P2A-TagRFPを導入した胎児マウスからE17.5で脳スライスを作成し、GCaMP6sを用いたCa²⁺イメージングを行った。次にイメージング後の脳スライスはPFA固定・ヘキスト染色を行い、ヘキスト染色により判明した各層の細胞密度の違いから、IZ-CP間、CP-MZ間境界を決定した(図左)。先行研究よりCP-MZ境界からCP側に約50 μ mの地点で移動様式はLocomotionからTerminal translocationにシフトする(Sekine et al., 2011)。そのため細胞がTerminal translocation様式移動を行う領域としてL1を定義した。またL1の一部を除いたCP領域を2割し、MZ側をL2、IZ側をL3と定義した(図右)。(Scale bar, 100 μ m)

B, C, L1-L3にかけて細胞内Ca²⁺上昇イベント1イベントあたりの継続時間が減少していた

L1-L3各層を移動する神経細胞における自発的な細胞内Ca²⁺上昇イベントの観測に成功した(図B)。またGCaMP6sベースライン輝度値から設定した閾値に基づき、Ca²⁺上昇イベントを抽出し、Ca²⁺上昇イベントの継続時間を各層で比較した。各層でのCa²⁺イベント継続時間を累積度数分布化した結果、L3からL1にかけてCa²⁺イベントの継続時間が減少することが示された(図C左)。また統計的にもL3からL1にかけてCa²⁺イベントの継続時間が減少することが示された(図C右)。(n=192 events, from 3 slices, 29 cells in L1, n=159 events, from 3 slices, 33 cells in L2, n=114 events, from 3 slices, 24 cells) (*p<0.05, ***p<0.001, by Kruskal-Wallis test with Dunn's Multiple Comparison test)

D, L1-L3にかけて細胞内Ca²⁺上昇イベントのCa²⁺増大幅が変化していた

抽出したCa²⁺上昇イベントのピーク各点からCa²⁺上昇イベントの上昇幅を算出しL1-L3で比較した結果、上昇幅はL1、L3、L2の順に大きいことが統計的に示された。(n=742 peaks, from 3 slices, 29 cells in L1, n=2822 peaks, from 3 slices, 33 cells in L2, n=891 peaks, from 3 slices, 24 cells) (**p<0.001, by Kruskal-Wallis test with Dunn's Multiple Comparison test)

E, L1-L3にかけて細胞内Ca²⁺上昇イベント数の発生頻度は変化しない

Ca²⁺上昇イベントの発生頻度をL1-L3で比較した結果、各層において統計的有意差は検出されなかった。(n=192 events, from 3 slices, 29 cells in L1, n=159 events, from 3 slices, 33 cells in L2, n=114 events, from 3 slices, 24 cells) (n.s., not significant, by Kruskal-Wallis test with Dunn's Multiple Comparison test)

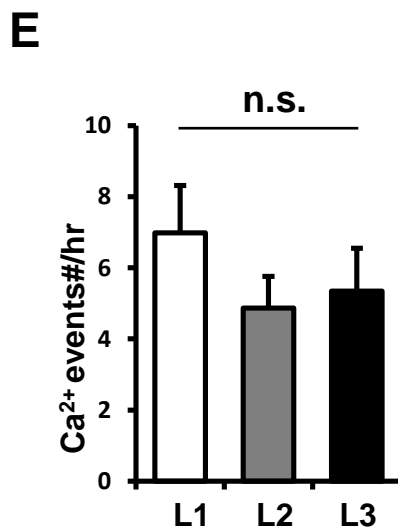
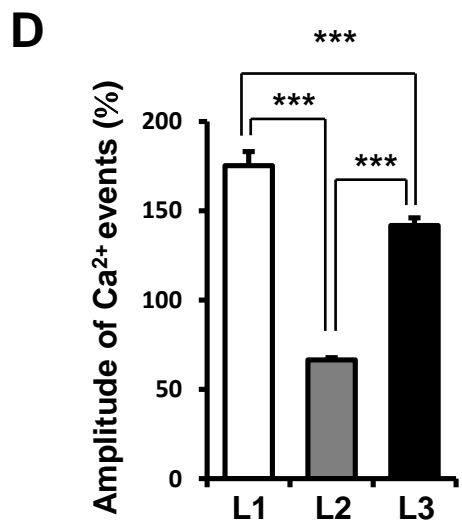
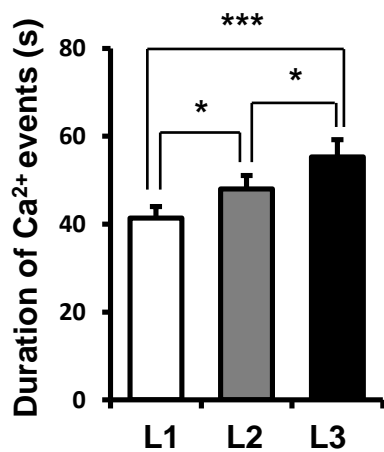
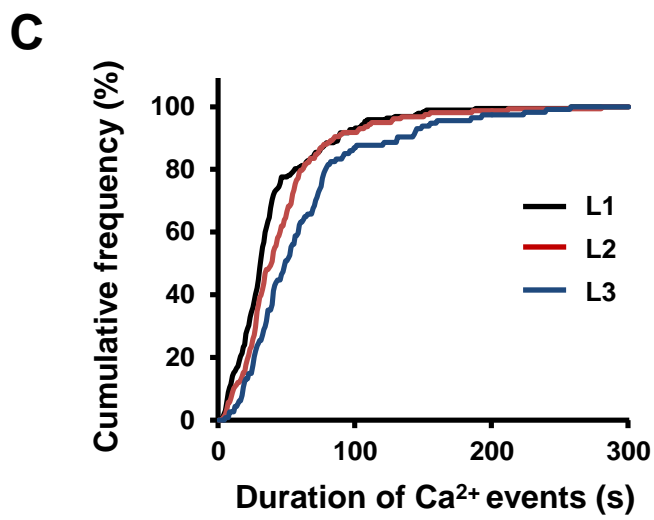
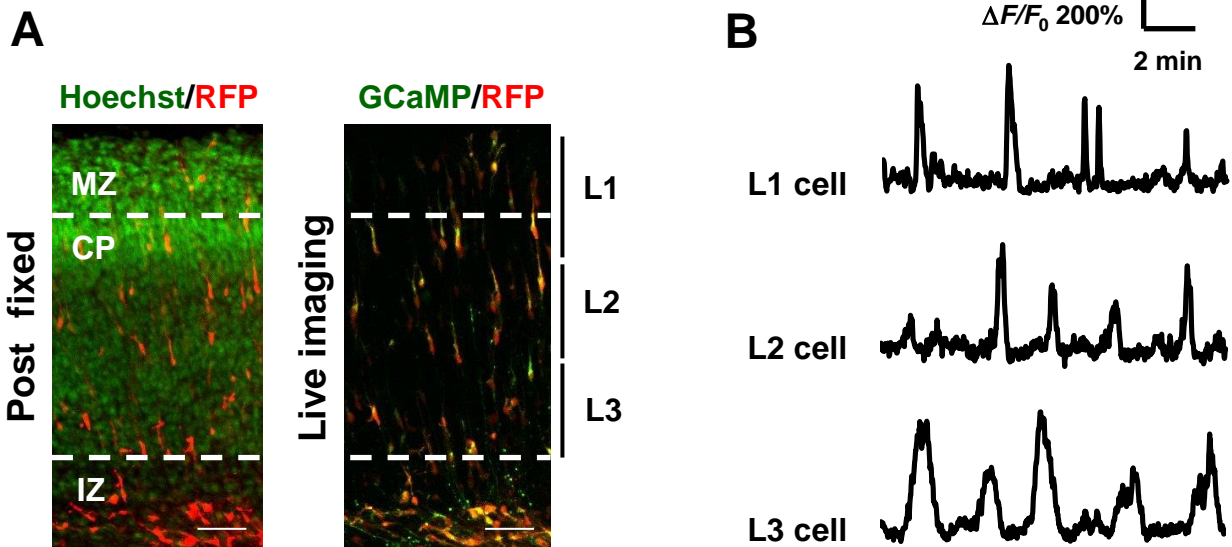


図3 GCaMP6sの強制発現による放射状移動への明らかな異常は見られなかった

A, GCaMP6sの強制発現による放射状移動への影響検討

E14.5のWTマウスに対しIUEによるpCAG-GCaMP6s-P2A-TagRFP導入を行い、E17.5で脳切片の作成を行った。その結果Control条件群(pCAG-TagRFPを発現)と比べ、GCaMP6sを強制発現させた条件群の切片で放射状移動に異常は認められなかった。(Control, n=1311 cells, 6 slices, GCaMP6s, n=1318 cells, 6 slices scale bar, 100 μ m) (n.s., not significant, by Student t-test)

A

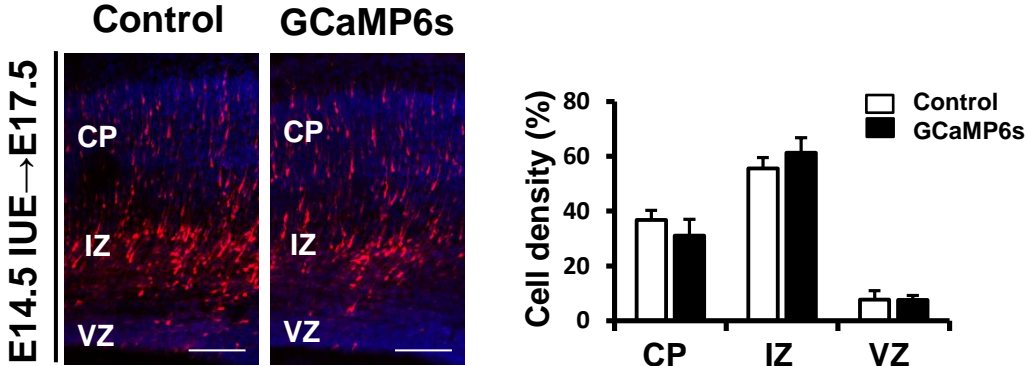


図4 Locomotion様式移動中の細胞内Ca²⁺上昇イベントは低速移動時に頻発した

A, Locomotion中細胞内の細胞内Ca²⁺動態の計測

pCAG-GCaMP6s-P2A-TagRFPを発現した移動中細胞を0.1Hzで10時間撮像したものを図に示す。移動中細胞では細胞内Ca²⁺動態を反映し、一過的なGCaMP6sの輝度値上昇が観察される(図A上段)。また移動中細胞の各フレームにおける積算移動距離と細胞内Ca²⁺動態を定量化した(図A下段)。黒線がCa²⁺の変化率 $\Delta F/F_0$ を、青線が積算移動距離を表す。また積算移動距離からフレーム毎の移動速度を計算し、移動速度が3.1 μm 以下の区間をSlow phase、それ以外の区間をNon-slow phaseと定めた。また図A上段の写真に対応する各フレームを黒矢頭と点線で示した。(Scale bar, 10 μm)

B, C, 特定時間枠での計測ではCa²⁺上昇イベントの発生数と移動速度は逆相関していた

図Aで示した細胞に対して、ビンを2時間と定めビン内のCa²⁺上昇イベント数を横軸に、平均移動速度を縦軸に取り点をプロットした。ビンは1フレームずつシフトさせ、全ての時間枠内から点の値を抽出した。その結果、Ca²⁺上昇イベント頻度と平均移動速度との間には逆相関があることが示された(図B) (n=2881 points)。また記録した全ての細胞に対し同様の解析を行い、全ての結果をプールしたところ同様にCa²⁺上昇イベント頻度と平均移動速度との間には逆相関が確認された(図C)。(n=40336 points, from 16 cells, 1 slice) (r^2 =r-squared of the Person correlation coefficient, ***p<0.001, by Pearson test.)

D, 低速移動中と定義した時間枠内ではCa²⁺上昇イベント数が増加していた

細胞毎にSlow phase区間とNon-slow phase区間でのCa²⁺上昇イベント数の発生比率を算出し比較したところ、Slow phaseでのイベント発生比率が有意に高いことが分かった。(n=16 cells, from 1 slice) (**p<0.01, by Student t-test)

E, Ca²⁺上昇イベント発生時の平均移動速度は全時間枠での平均移動速度と比べ減少していた

また細胞毎にCa²⁺上昇イベント発生時フレームの移動速度を算出し、全フレームから算出した平均移動速度に基づく標準化を行い、Ca²⁺上昇イベント発生時の平均移動速度と全フレームの平均移動速度を比較した。その結果Ca²⁺上昇イベント発生時に移動速度が有意に低下することが分かった(n=16 cells, from 1 slice) (***p<0.001, by Student t-test)

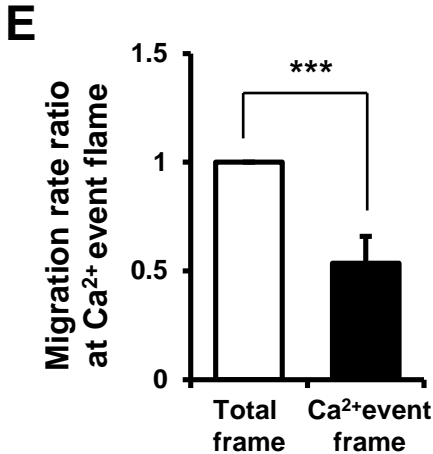
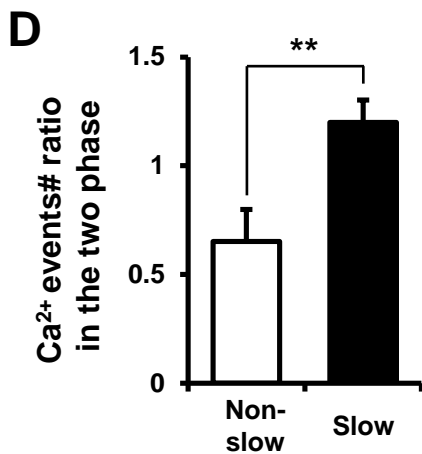
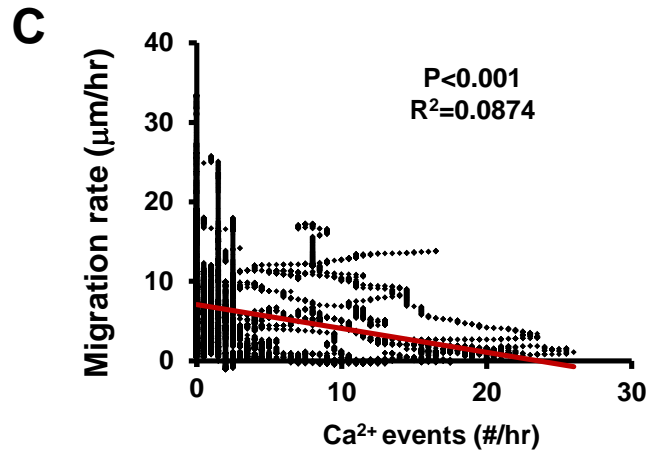
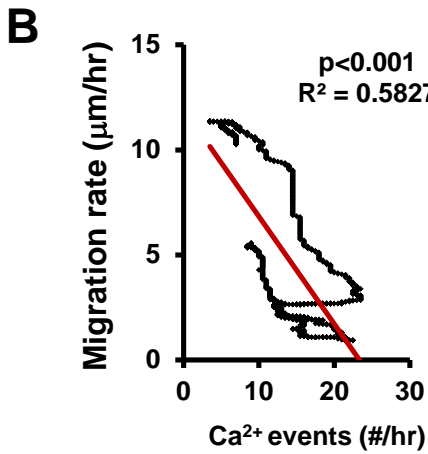
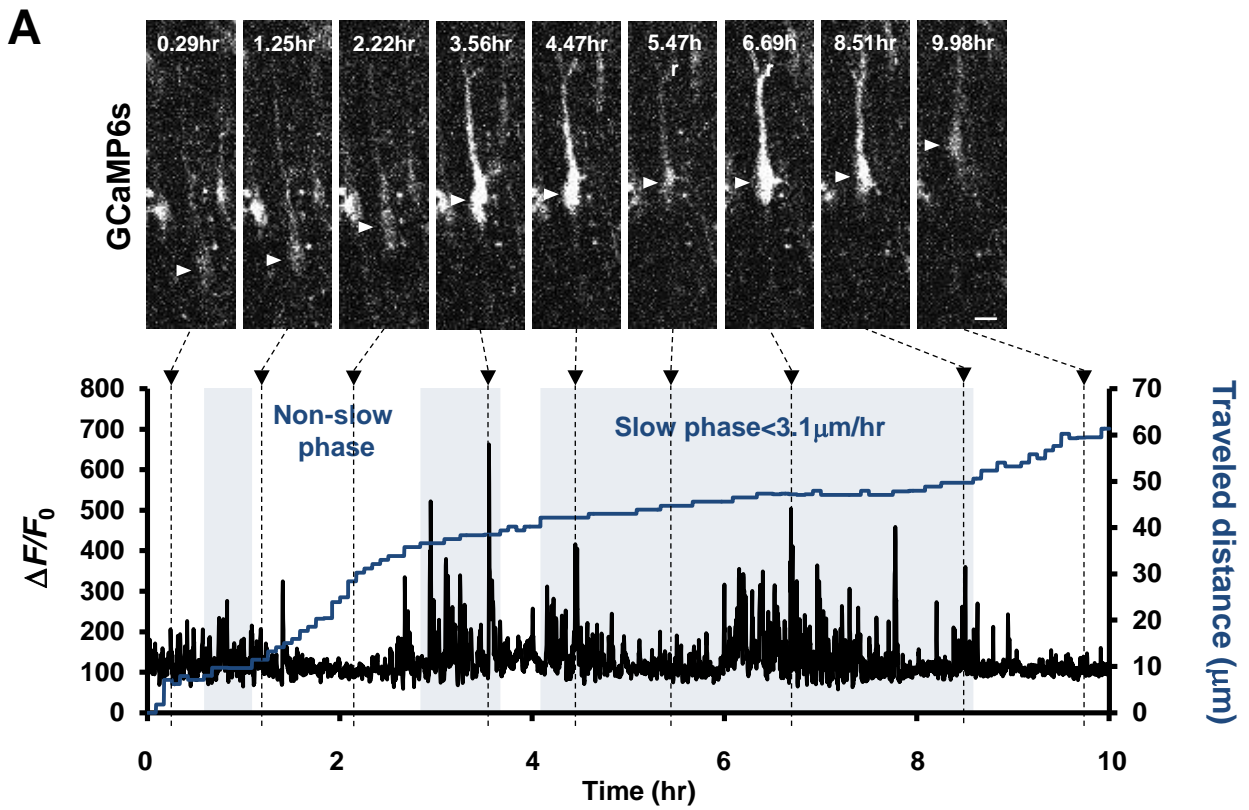


図5 Locomotion様式移動中の細胞内Ca²⁺上昇は一部L-VDCCに依存しL-VDCC活性の薬理的増幅により細胞移動速度が低下した

A, B, C, L-VDCCアクチベーターFPL64176添加前後での細胞内Ca²⁺動態の変化

脳スライスに対しFPL添加を行い、Locomotion中細胞内でのCa²⁺動態を記録した(図A)。その結果FPLの添加により、細胞内Ca²⁺上昇イベントの発生頻度に有意な変化は認められなかった(図B)。一方で、1イベントあたりのCa²⁺上昇幅は有意に増加していた(図C)。(n=26 cells, from 2 slices) (n.s., not significant, by Student t-test)

D, L-VDCC拮抗薬Nimodipine添加による細胞内Ca²⁺上昇イベント数の減少

Nimodipine添加により細胞内Ca²⁺上昇イベントの発生頻度が減少した。この結果とFPL添加実験の結果より、Locomotion中細胞における細胞内Ca²⁺上昇イベントの一部はL-VDCC依存的事であることが示唆された。(n=30 cells, from 2 slices) (**p<0.01, by Student t-test)

E, F, Control溶液の添加前後での細胞内Ca²⁺上昇イベント数・Ca²⁺上昇幅は変化しなかった

Control溶液の添加により、細胞内Ca²⁺上昇イベントの発生頻度に有意な変化は認められなかった(図E)。また1イベントあたりのCa²⁺上昇幅にも有意な変化は認められなかった(図F)。(n=30 cells, from 3 slices) (n.s., not significant, by Student t-test)

G, FPL添加による細胞移動速度の低下

FPL添加前後で同一脳スライス中のCPを移動する細胞を各6時間トラックした(図左)。トラックした細胞の平均移動速度を定量した結果、Vehicle条件では溶媒添加前後で平均移動速度に有意な違いは認められないが、薬剤添加条件ではFPL添加後に平均移動速度が減少していた(図右)。(Vehicle: Before, n=31 cells, After, n=33 cells, from 4 slices, FPL: Before, n=39 cells, After, n=29 cells, from 4 slices, scale bar, 100µm) (**p<0.001, by Two way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison test)

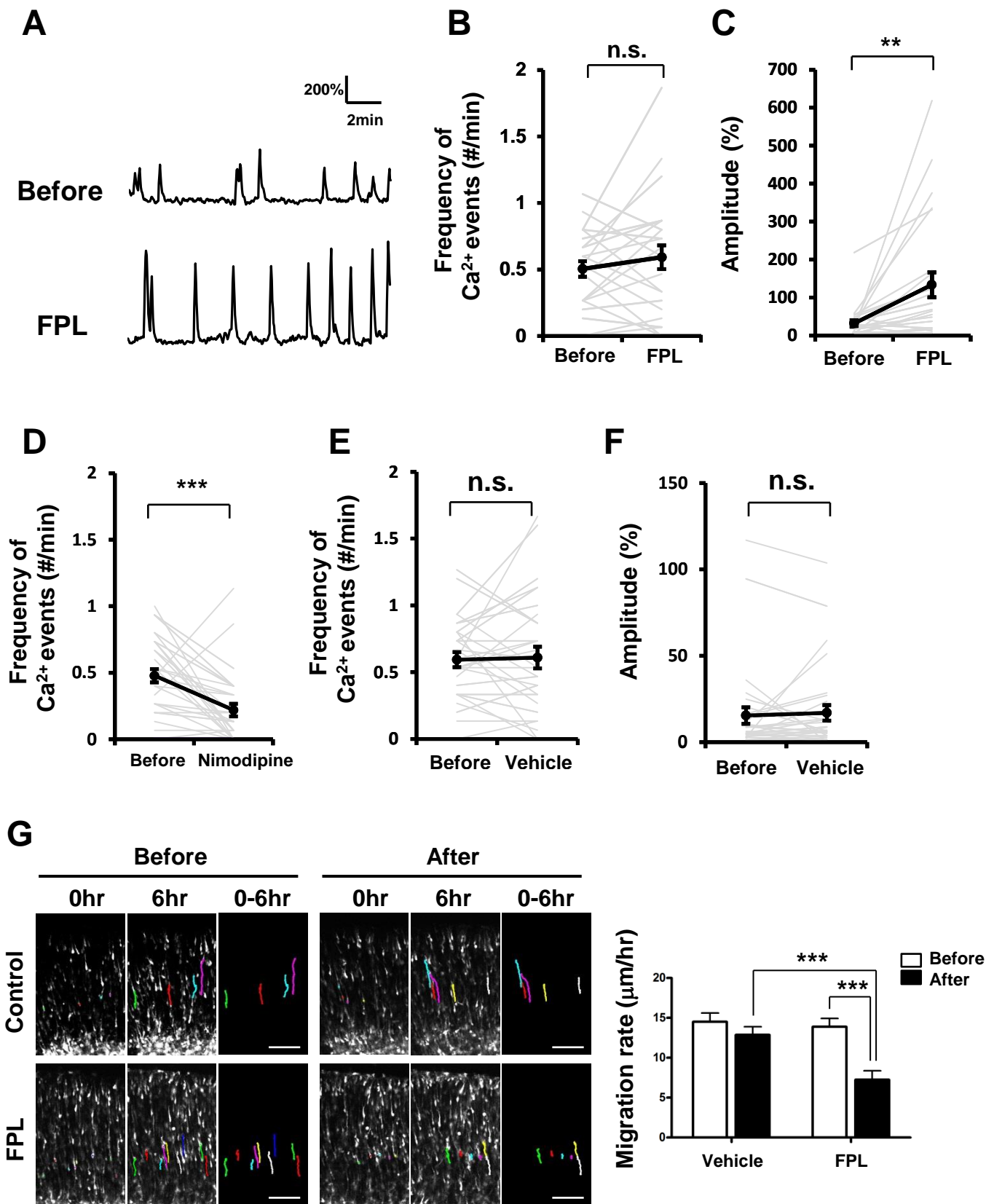


図6 EGTA-AMの添加により、細胞内Ca²⁺上昇イベント数・ベースラインでの細胞内Ca²⁺濃度が共に減少し細胞移動速度が低下した

A, B, EGTA-AM添加前後での細胞内Ca²⁺動態の変化

脳スライスに対しEGTA-AM添加を行い、Locomotion中細胞内でのCa²⁺動態を記録した(図A)。その結果EGTA-AMの添加により、細胞内Ca²⁺上昇イベントの発生頻度が減少していた。(n=25 cells, from 2 slices) (**p<0.001, by Student t-test)

C, EGTA-AM添加によるCa²⁺非上昇時の細胞内Ca²⁺濃度の減少

個々の細胞はP2Aペプチドで繋がれたGCAMP6sとTagRFPを細胞内に等比で共発現している。GCaMP輝度値のベースラインをTagRFPの平均輝度値で除算(標準化)することで、細胞内Ca²⁺濃度のベースラインを概算できる。薬剤添加前に基づきGCaMP輝度値を標準化したところ、EGTA-AM添加後には標準化したGCaMP輝度値のベースラインが有意に低下していた。(n=25 cells, from 2 slices) (**p<0.01, by Student t-test)

D, EGTA-AM添加による細胞移動速度の低下

EGTA-AM添加前後で同一脳スライス中の移動中細胞を各6時間トラックした(図左)。トラックした細胞の平均移動速度を定量した結果、Vehicle条件では溶媒添加前後で平均移動速度に有意な違いは認められないが、薬剤添加条件ではEGTA-AM添加後に平均移動速度が減少していた(図右)。(Vehicle: Before, n=33 cells, After, n=38 cells, from 4 slices, EGTA-AM: Before, n=35 cells, After, n=38 cells, from 4 slices, scale bar, 100μm) (**p<0.001, by Two way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison test)

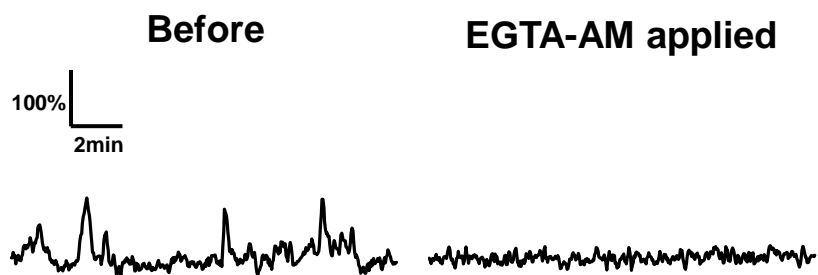
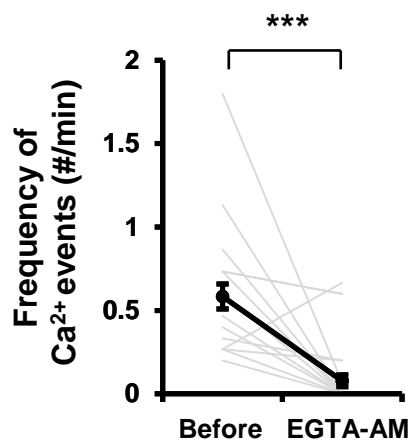
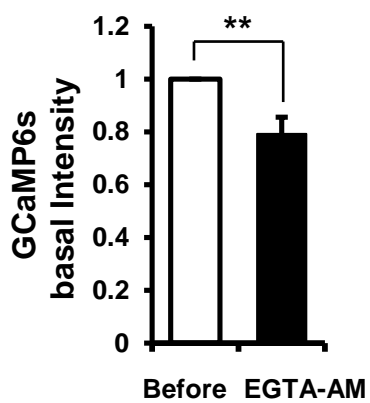
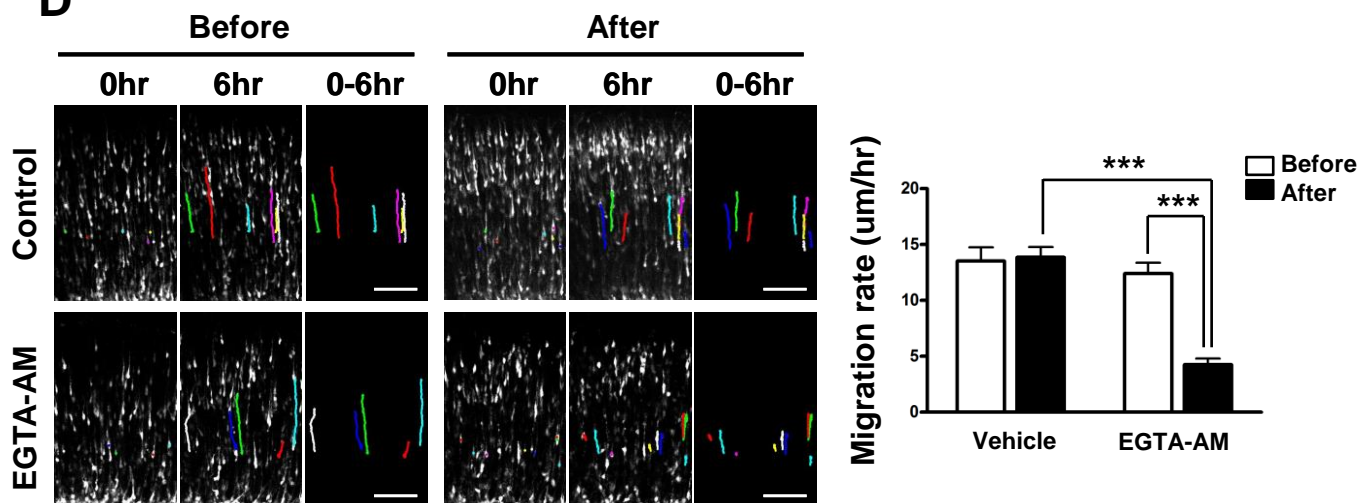
A**B****C****D**

図7 FPL添加・EGTA-AM添加の各々で移動中細胞の核形態が変化した

A, FPL添加によりLocomotion中細胞の核が球体形に近づいた

E14.5で核マーカーのmTruquoise2-NLSと細胞体マーカーのmEGFPを導入し、E17.5で脳スライスを作成後、FPLの添加実験を行った。移動中細胞内の核を楕円と見なし長軸・短軸の長さを算出し、その比を計算した結果(長軸長/短軸長)、FPL添加に伴い比の値が減少した。すなわちFPL添加に伴い核が球体形に近づいた。(Control, n=95 cells, 3 slices, FPL, n=107 cells, 3 slices, scale bar, 50 μ m, 10 μ m) (**p<0.001, by Welch t test)

B, EGTA-AM添加によりLocomotion中細胞の核はより縦長の紡錘体形となった

図Aでの実験と同じく脳スライスを作成した後、EGTA-AM添加実験を行った。EGTA-AM添加に伴い移動中細胞内の核の長軸・短軸長の比は大きくなり、核はより縦長の紡錘体形となった。(Control, n=68 cells, 3 slices, FPL, n=76 cells, 3 slices, scale bar, 50 μ m, 10 μ m) (**p<0.001, by Welch t test)

C, EGTA-AM添加によりLocomotion中細胞の細胞体は縦長の紡錘体形のまま維持された

EGTA-AM添加によるLocomotion中細胞の細胞形態への影響を観察した。なお観察は、図4のEGTA-AM添加に伴う移動速度への影響検討に用いたサンプルに対し行った。矢頭で示したControl条件のLocomotion中細胞は、移動に伴い細胞体の形が縦長の紡錘体形を示す時間帯(2hr、4hr)と球体形を示す時間帯(3hr、6hr)が交互に現れる。一方EGTA-AM添加条件のLocomotion中細胞は細胞形態の変化に乏しく、イメージング中に一貫して縦長の紡錘体形を維持するものが見られた。(Scale bar, 20 μ m)

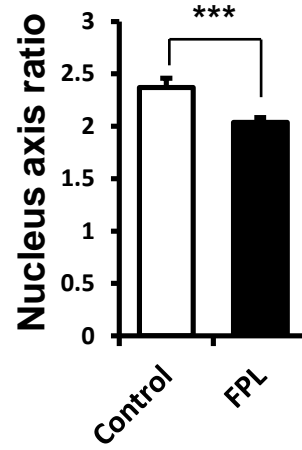
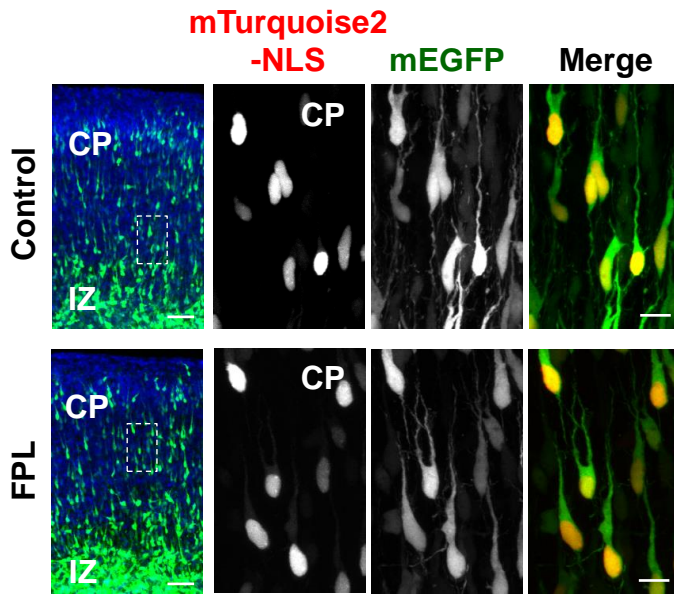
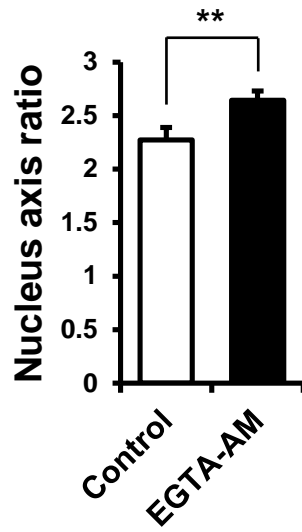
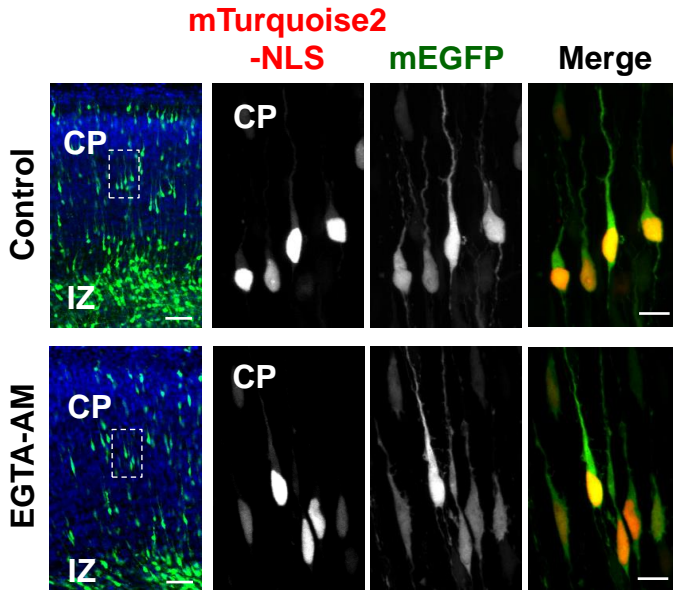
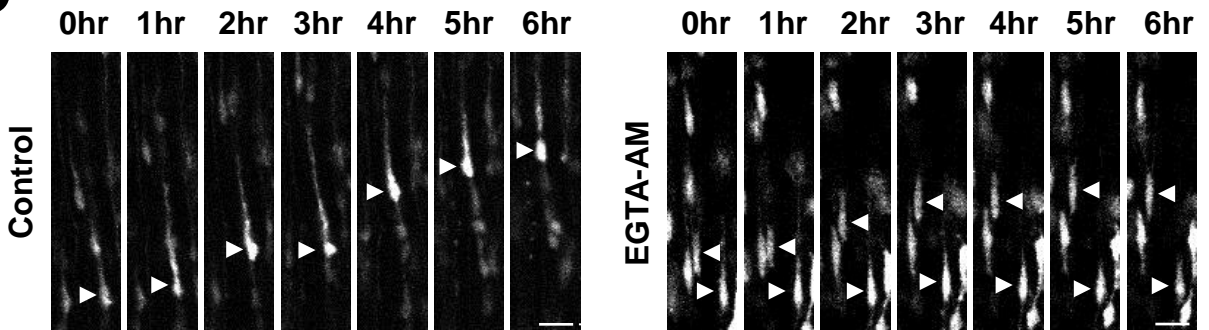
A**B****C**

図8 Locomotion様式で移動中の大脳皮質幼若期II/III層錐体細胞においてCaMKI α 発現が認められた

A, CaMKI α 抗体の特異性検討

E17.5のWTマウスに対し抗CaMKI α IHCを行った結果、幼若期大脳皮質でCaMKI α シグナルが観察された(図A左)。一方でCaMKI α general KOマウスに対し抗CaMKI α IHCを行った結果、CaMKI α シグナルはバックグラウンドと同程度にしか観察されなかった(図A右)。(Scale bar, 100 μ m)

B, Locomotion様式で移動中の細胞におけるCaMKI α 発現の検討

E14.5のWTマウスに対しIUEを行い移動中細胞特異的にGFPを発現させ、E17.5で脳切片を作成した後に抗CaMKI α IHCを行った。図B上段におけるMerge像内の点線枠内を拡大したものが図B下段のCell11、Cell12であるが、これらの細胞において特にLeading process部で強いCaMKI α 発現が観察された。(Scale bar, 100 μ m, 10 μ m, 5 μ m)

D, CaMKI α 強制発現時のIHCシグナル確認

E14.5のWTマウスに対しIUEを行い移動中細胞特異的にCaMKI α とGFPを共発現させ、E17.5で脳切片を作成し抗CaMKI α IHCを行った。その結果、移動中細胞において特にLeading process部で強いCaMKI α 発現が観察された。(Scale bar, 100 μ m, 10 μ m)

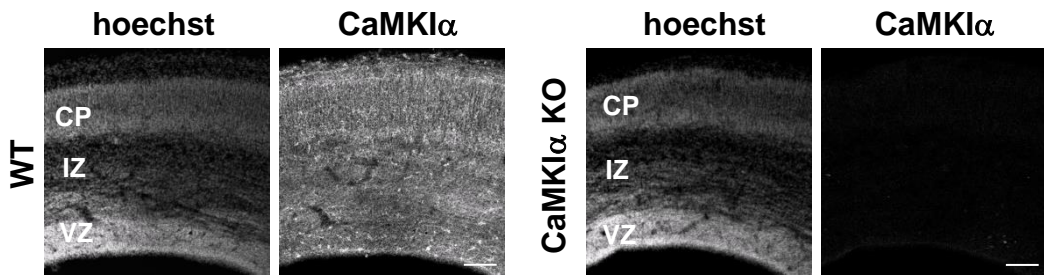
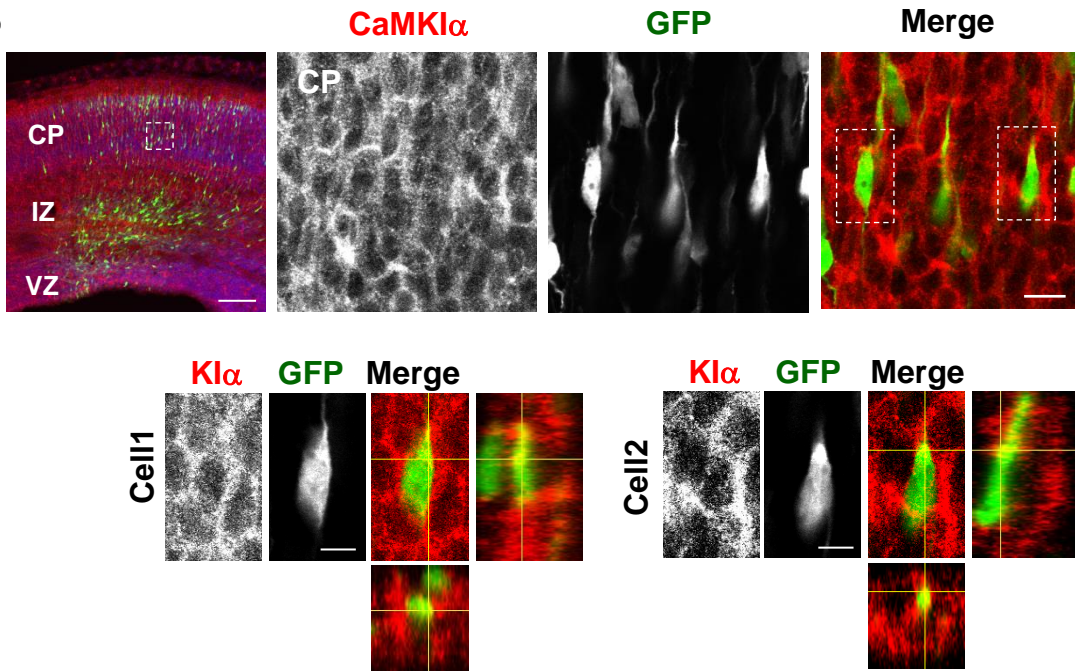
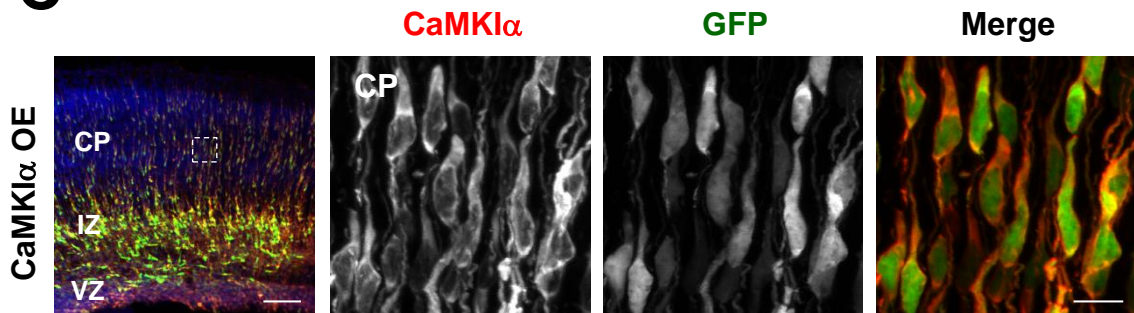
A**B****C**

図9 移動中細胞特異的CaMKI α cKOにより放射状移動が障害された

A, CaMKI α floxマウスの作成

本研究では新たにCaMKI α flox (*Camk1^{f/f}*) マウスを作成した。完成形のマウスラインは12個あるエクソンの内、開始コドンが含まれるエクソン2をLoxP配列で挟むよう設計した。ESスクリーニングを目的として挿入されたNeomycinはFlippaseを発現するマウスラインと掛けあわせ除去した。

B, CaMKI α cKO成功可否のPCRによる検討

作成したCaMKI α floxマウスに対してIUEによりE14.5でCre組換え酵素を導入し、E17.5で脳を可溶化し祖抽出したゲノムをテンプレートとしてPCRを行った。プライマー位置は図Aの赤矢頭で示され、Cre酵素依存的なゲノム組換えに成功し、組換えによる短いPCRバンドが出現した。

C, 移動中細胞特異的CaMKI α cKOによる放射状移動の障害

E14.5のCaMKI α floxマウスに対しIUEを行いCre酵素を発現させ、E17.5で解剖し脳切片の作成を行った。その結果コントロール条件と比べ、Cre酵素を発現させた群では放射状移動に障害が起きることが示された。(*Camk1^{f/f}-Cre(-)*, n=812 cells, 7 slices, *Camk1^{f/f}-Cre(+)*, n=688 cells, 6 slices, scale bar, 100 μ m) (*p<0.05, by Student t-test)

D, WTマウスに対するCre酵素発現では放射状移動の障害が起きなかった

Cre酵素はターゲット配列非特異的な組換えを起こすことが既に知られており、(図C)で得られた実験結果がそうしたアーティファクトであるか検討した。E14.5のWTマウスに対しIUEを行いCre酵素を発現させ、E17.5で解剖し脳切片の作成を行った。その結果、放射状移動への障害は確認されなかった。(WT-Cre(-), n=729 cells, 6 slices, WT-Cre(+), n=848 cells, 6 slices, scale bar, 100 μ m) (n.s., not significant, by Student t-test)

E, 移動中細胞特異的CaMKI α cKOによるLeading processの異常伸長

CaMKI α cKOによる細胞形態異常の検討としてLeading process長の検討を行った。実験には図Cに用いたものと同じ脳切片を用い、CPをLocomotion様式で移動中の神経細胞を観察した。その結果、CaMKI α cKOサンプルでLeading processの伸長が認められた。(Cre(-), n=32 cells, 3 slices, Cre(+), n=26 cells, 3 slices, scale bar, 5 μ m) (*p<0.05, by Student t-test)

F, 移動中細胞特異的CaMKI α cKOによる核・中心体間距離の短縮

CaMKI α cKOによる細胞小器官への影響を検討する目的で、核・中心体間距離の長さを測定した。実験はE14.5のCaMKI α floxマウスに対しIUEを行い、Cre酵素に加え中心体マーカーを導入し、E17.5で解剖し脳切片の作成を行った。切片に対しヘキスト染色による核の可視化操作を行った後、Locomotion様式移動中細胞の核・中心体間距離の測定を行った。その結果、CaMKI α cKOサンプルで核・中心体間距離の短縮が認められた。(*Camk1^{f/f}-Cre(-)*, n=364 cells, 7 embryos, *Camk1^{f/f}-Cre(+)*, n=265 cells, 7 embryos) (*p<0.05, by Student t-test)

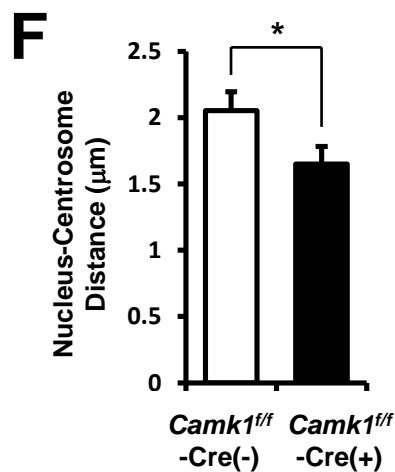
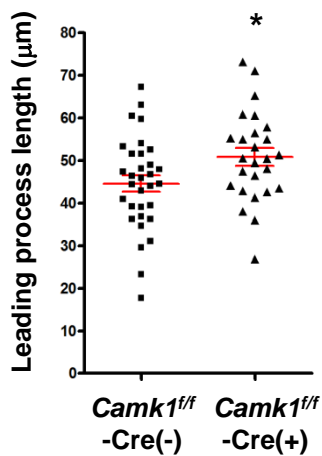
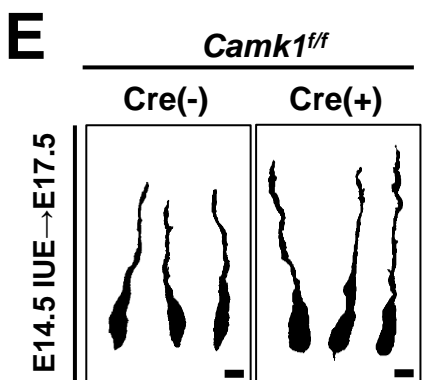
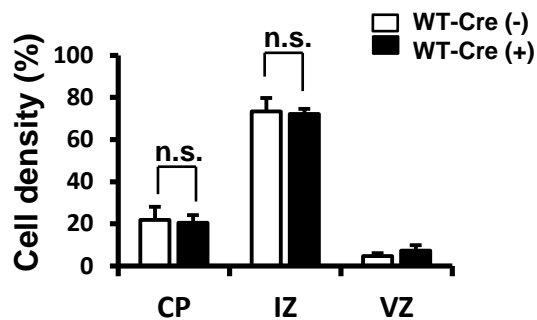
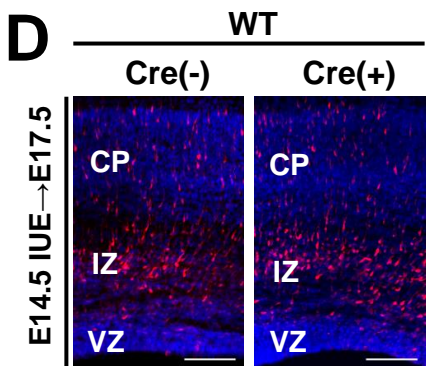
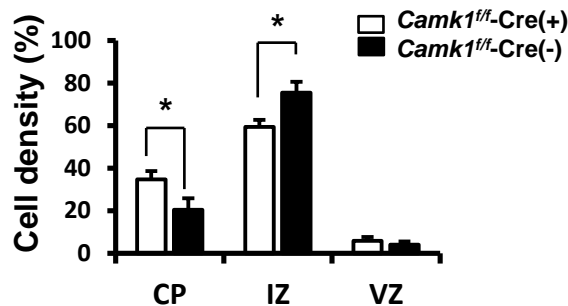
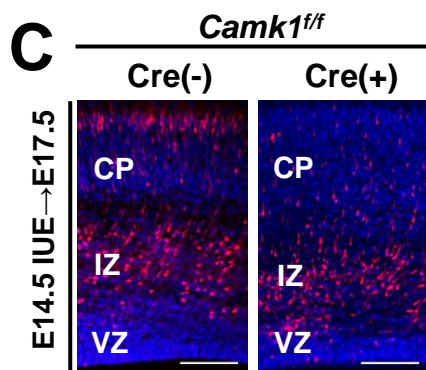
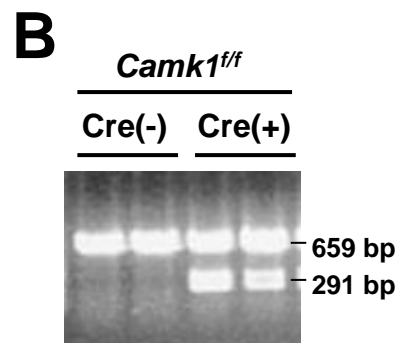
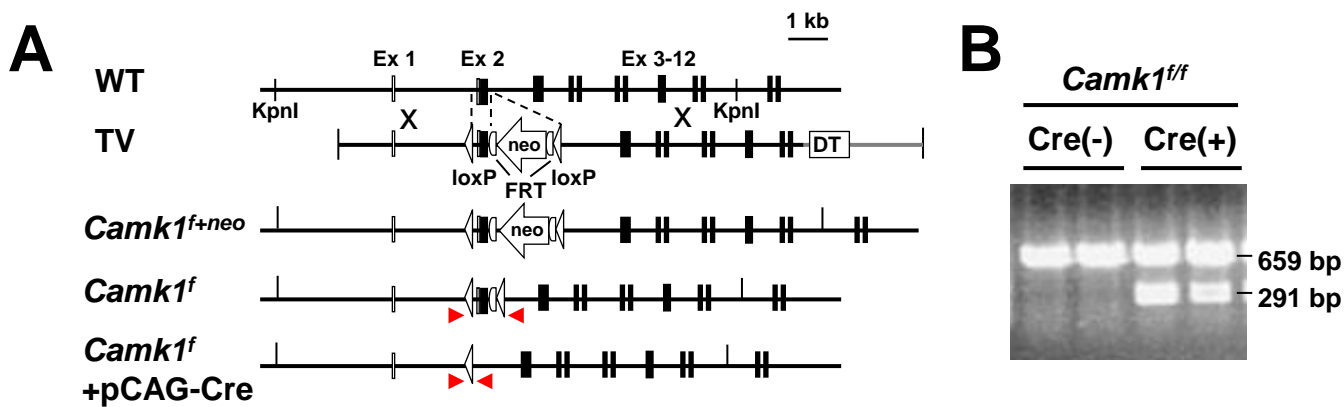


図10 移動中細胞特異的CaMKI α KDにより移動速度が減少した

A, B, C, CaMKI α KDによるLocomotion様式移動中細胞の移動速度減少

E14.5のWTマウスに対しIUEによるCaMKI α KDベクターの導入を行い、E17.0で脳スライスを作成をした後にCaMKI α KDによるLocomotion様式移動への影響を観察した。CPを移動する細胞を12時間観察した結果、CaMKI α KDベクターを導入した条件群では移動速度の低下した細胞が見られた(図A)。なお図Aにおける矢頭は同一細胞の経時的位置変化を示す。また各細胞から得られた経時的移動速度の増減を疑似カラー化したところ、CaMKI α KD条件群で移動速度の減少傾向が見られ(図B)、平均移動速度を定量した結果CaMKI α KD群で平均移動速度の有意な減少が認められた(図C)。(Control, n=33 cells, 4 slices, CaMKI α KD, n=36 cells, 5 slices, scale bar, 20 μ m) (**p<0.001, by Student t-test)

D, E, CaMKI α KDによる跳躍運動回数の減少

更に図A-Cで用いたサンプルを解析し、平均移動速度の低下が移動のこういった質的要因に基づくかを検討した。Locomotion様式移動中の細胞は一過的に移動速度が増大する跳躍運動を繰り返す。時速30mm/hrを閾値とし、閾値以上の移動速度を示した際に跳躍運動が起きたと定義した(図D、*印)。跳躍運動の回数をcontrol群、CaMKI α KD群で比較した結果、CaMKI α KD群で跳躍運動回数の有意な減少が見られた(図E)。(Control, n=33 cells, 4 slices, CaMKI α KD, n=36 cells, 5 slices) (**p<0.001, by Student t-test)

F, 移動中細胞特異的CaMKI α KDによるLeading processの異常伸長

CaMKI α KDによる細胞形態異常の検討としてLeading process長を定量した。E14.5のWTマウスに対しIUEによるコントロールベクター・CaMKI α KDベクターの導入を行い、E17.5で脳切片を作成し移動中細胞のLeading process長を定量した結果、CaMKI α KD条件群でLeading processの伸長が認められた。(Control, n=41 cells, 3 slices, CaMKI α KD, n=34 cells, 3 slices) (**p<0.01, by Student t-test)

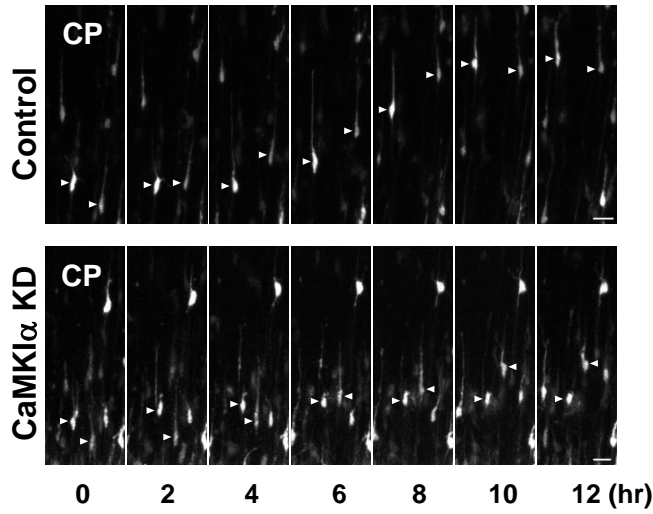
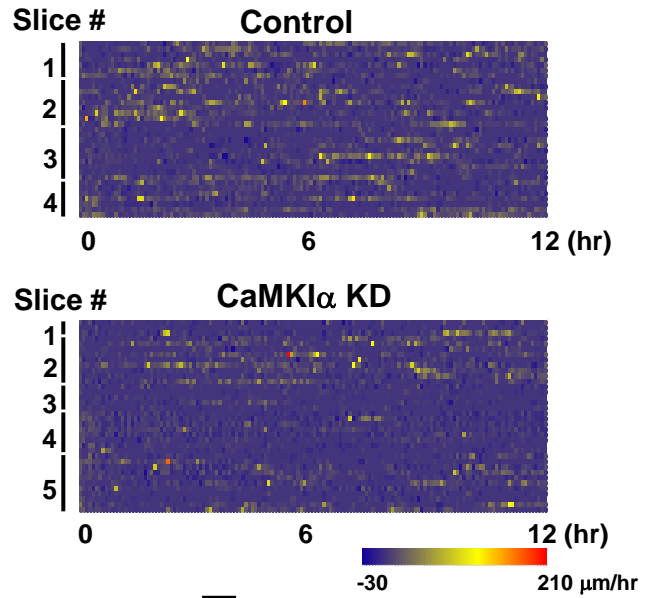
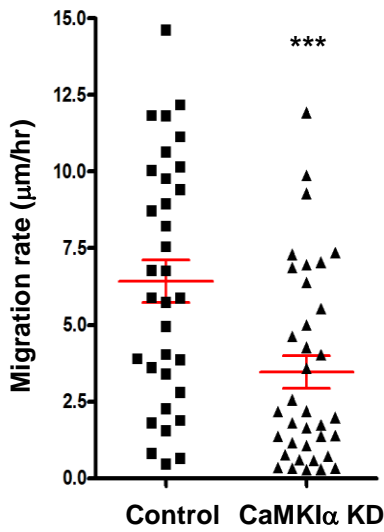
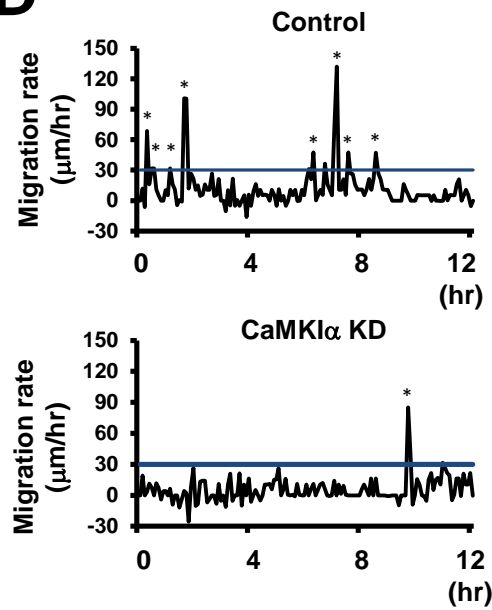
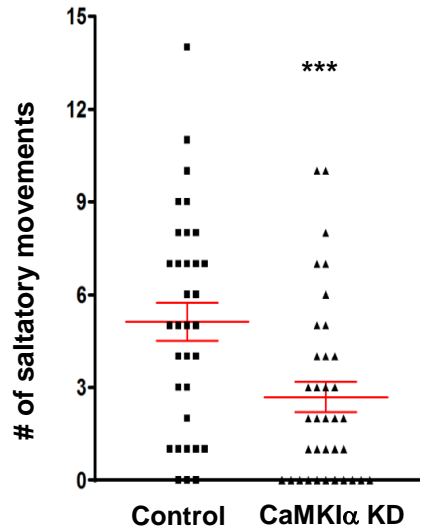
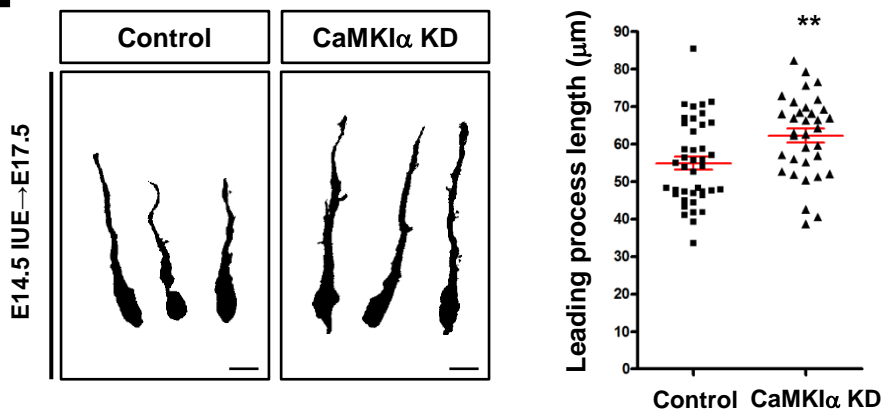
A**B****C****D****E****F**

図11 CaMKI α CAの強制発現によりLocomotion様式移動中の細胞移動速度が低下した

A, Tet-Onシステムを用いたCaMKI α CAの強制発現によりLocomotion中細胞の移動速度が低下した

Dox添加に伴うCaMKI α CA強制発現誘導の前後で、同一脳スライス中のCPを移動する細胞を各6時間トラックした(図左)。トラックした細胞の平均移動速度を定量した結果、Control条件ではDox添加前後で平均移動速度に有意な違いは認められないが、CaMKI α CA強制発現条件ではDox添加後に平均移動速度が減少していた(図右)。(Control-Before, n=34 cells, Control-After, n=34 cells, from 4 slices, CaMKI α CA -Before, n=31 cells, CaMKI α CA -After, n=35 cells, from 4 slices, Scale bar 100 μ m) (**p<0.01, by Two way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison test)

B, CaMKI α CA強制発現による移動中細胞の形態変化

図Aの実験に用いた脳スライスをライブイメージング後にPFA固定し、細胞形態を観察した。図左の点線枠内を拡大したものが右の各図であるが、CaMKI α CAを強制発現した移動中細胞は球体形を為すことが分かった。(Scale bar, 100 μ m, 30 μ m)

C, CaMKI α CA強制発現による核形態の変化

CaMKI α CA強制発現に伴う核形態への影響を検討した。写真はCPを移動中の細胞を撮像したものであるが、CaMKI α CA強制発現によって球体形を示すLocomotion中細胞が見られた。(Scale bar, 20 μ m)

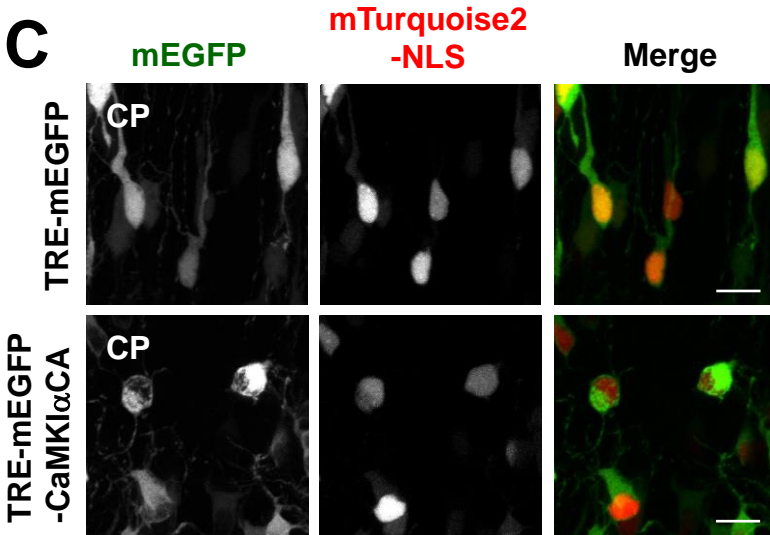
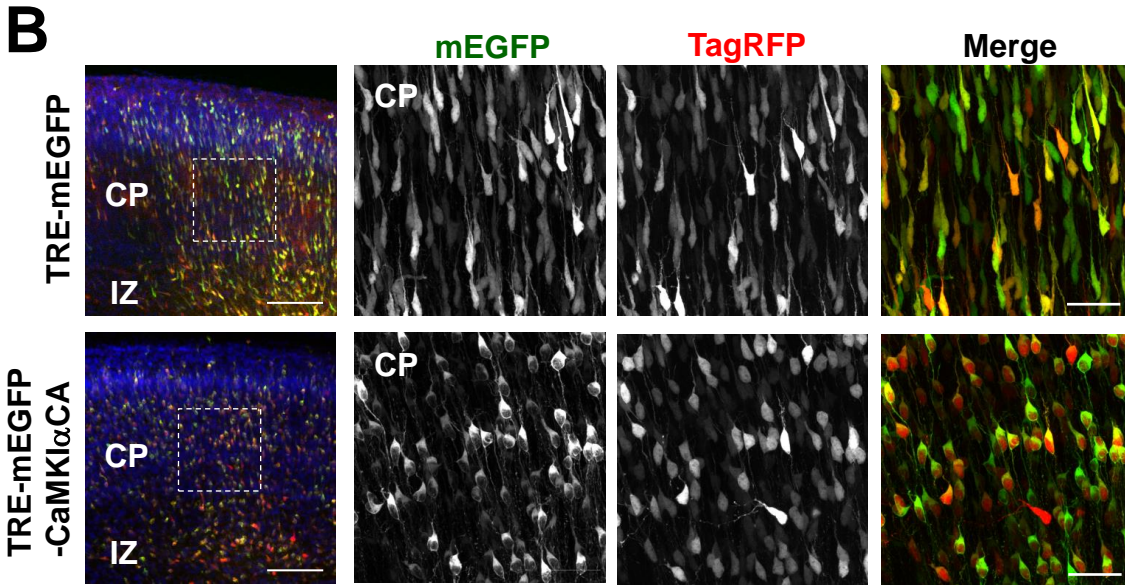
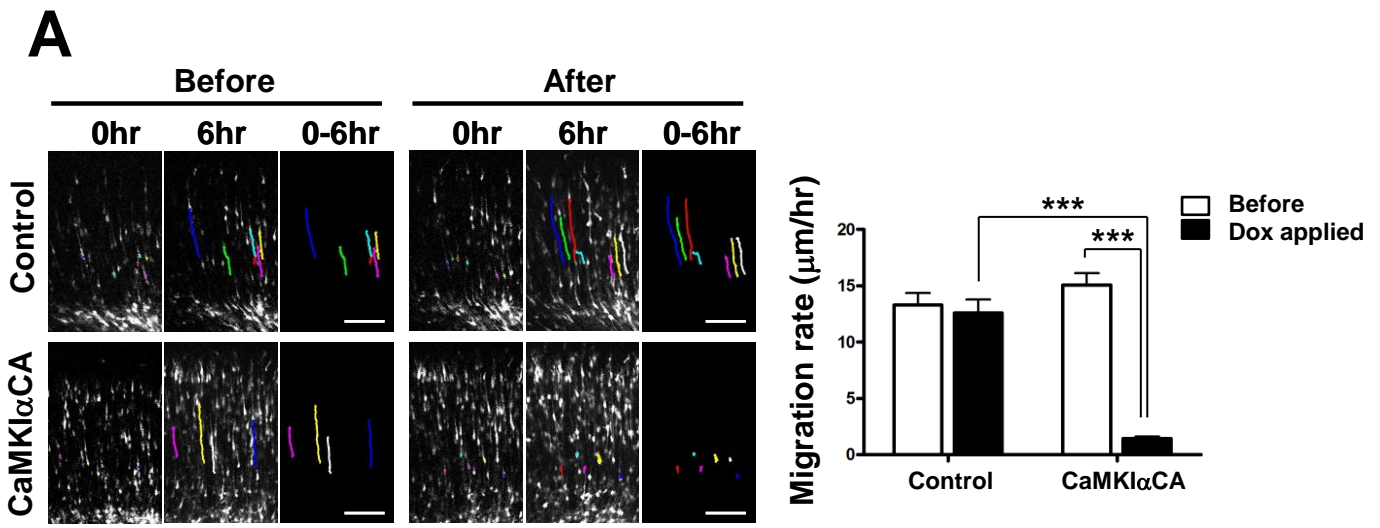


図12 研究結果から想定される細胞内Ca²⁺シグナリング依存的なLocomotion様式移動の制御機構

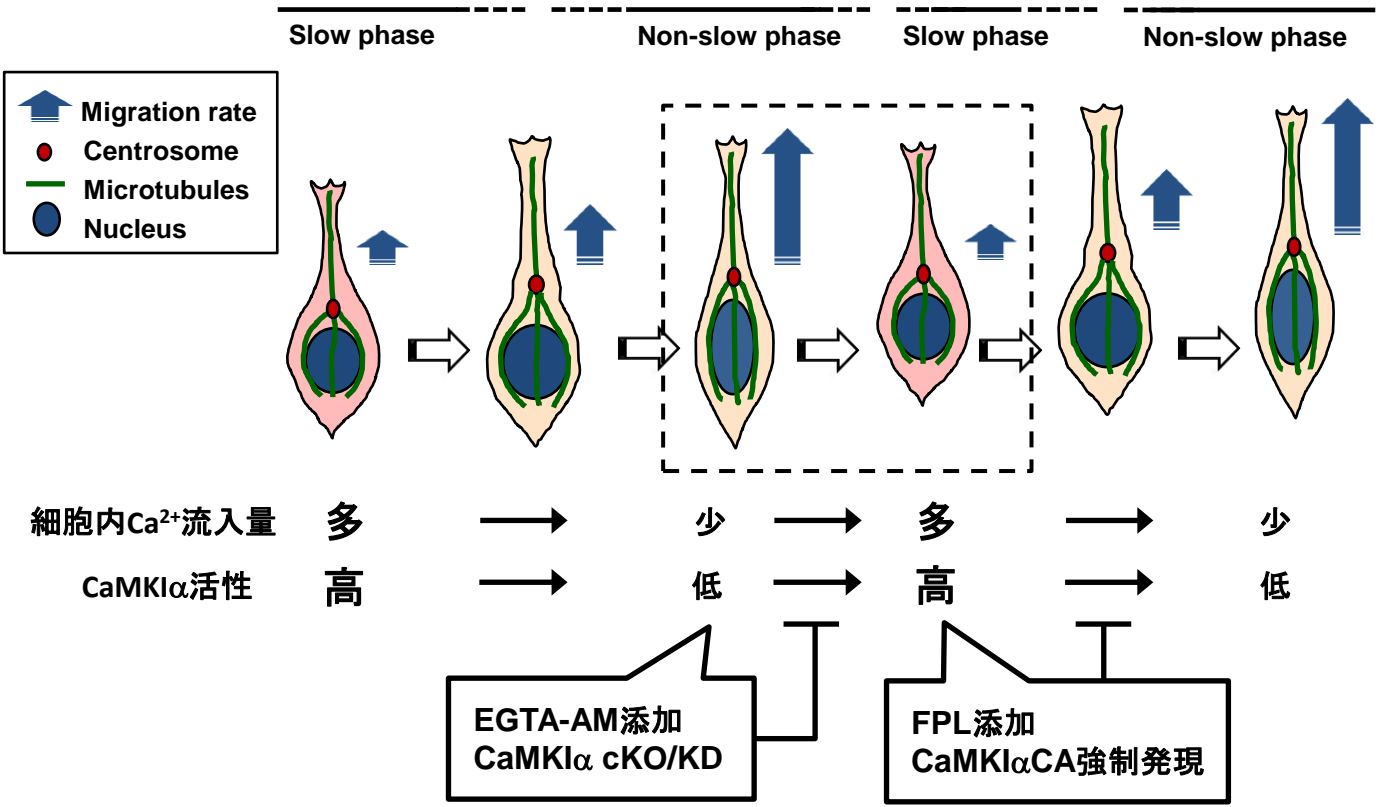
A, Locomotion中細胞の移動速度と細胞内Ca²⁺流入量の相関

本研究は、脳スライスを用いた実験系としては初めて、移動中の神経細胞における周期的な移動速度の変化と細胞内Ca²⁺流入量との相関を記述することに成功した。この相関はSlow phaseでは細胞内Ca²⁺流入量が多く、Non-slow phaseでは細胞内Ca²⁺流入量が少ないというものであった。

またEGTA-AM添加・CaMKIa cKO/KDによってLocomotion様式移動は抑制され、細胞小器官・細胞形態の観察によりNon-slow phaseの特徴を強く示すことが分かった。これは細胞内へのCa²⁺流入とCaMKIa活性の抑制によって、Locomotion様式移動がNon-slow phaseで停止し、次のphaseへ移行できなくなることを示唆する。一方でFPL添加・CaMKIaCAの強制発現によってもLocomotion様式移動は抑制されるが、この際には細胞小器官・細胞形態の観察からSlow phaseの特徴が強く現れることが分かった。これは細胞内へのCa²⁺流入とCa²⁺活性の亢進によって、Locomotion様式移動がSlow phaseで停止し、次のphaseへ移行できなくなることを示唆する。

以上より各操作によりLocomotion様式移動は抑制されるが、操作によってLocomotion様式は異なる移動過程で停止していることが考えられる。このことと、移動速度の増減に応じて細胞内へのCa²⁺流入量が増減することを合わせて考えると、移動中細胞内へのCa²⁺流入量の周期的増減に応じてCaMKIa活性が周期的に変化し、Locomotion様式移動を促進することが考えられる。

A



本研究により得られた実験結果

- ・Locomotion様式移動は周期的な細胞移動速度の増減に伴い細胞内Ca²⁺流入量を変化させた。
- ・薬理的・遺伝学的各操作によりLocomotion様式移動は抑制され、細胞形態と細胞内小器官は特定移動過程の特徴を示した。

実験結果に基づく考察

- ・薬理的・遺伝学的各操作によりLocomotion様式移動が特定の段階で停止していた。
- ・移動中細胞内へのCa²⁺流入量の周期的増減に応じて、CaMKIα活性が周期的に変化しLocomotion様式移動を促進することが考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心な御指導と温かい励ましをいただきました、指導教官の尾藤晴彦教授に心から感謝いたします。

実際の研究を遂行するにあたり、所属当初より細かな実験操作から、具体的な研究のアドバイスまで熱心に多くの御指導を頂きました竹本-木村さやか講師に深く感謝いたします。

また2013年度をもって京都大学大学院・医学研究科・メディカルイノベーションセンターに栄転されました奥野浩行特定准教授にも多くのご指導をいただき感謝いたします。

最後に、研究生生活全般を支えてくださり、所属当初から温かい励ましとご指導を頂きました、尾藤研究室の在籍メンバー・卒業生の皆様に深く感謝いたします。