

大脳皮質表層における神経細胞微小核の放出メカニズムの解析

浅見 奈都 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鶴田 文憲 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

発生過程の神経細胞は脳室帯で産生され、表層へ移動し、層構造を形成する。これまでに所属研究室では、神経細胞が脳表層へ移動のする際のストレスにより、微小核と呼ばれる小さな核様構造体を形成し、表層近傍で放出されることを見出してきた。また、細胞外に放出された神経細胞由来微小核は、大脳皮質第一層において、脳内の免疫担当細胞であるミクログリアに取り込まれ、ミクログリアの形質を変化させることが示唆されている。それゆえ微小核は、神経細胞とミクログリアにおける新しい細胞間コミュニケーションのメディエーターになることが考えられる。しかし、神経細胞が脳表層で微小核を放出するメカニズムについては明らかとなっていない。そこで本研究では、微小核の細胞外への放出を制御する候補分子の探索を目的とした。

【実験方法】

(1) 免疫組織染色

神経細胞の核膜が特異的に標識されたマウス(NexCre; Sun1-GFP)を、4% PFA/PBS で灌流固定し、脳を摘出後、4% PFA/PBS で一晩浸透させた。その後、30% スクロース/PBS に置換し、30% スクロース/OTC コンパウンド(1:1)で包埋後、クライオスタットで50 μ mの凍結切片を作成した。切片の染色には、神経細胞の核膜を標識するために抗 GFP 抗体 (1:500, Abcam)と、核のマーカである DAPI(1.0 μ g/ml, Dojindo)を用いた。染色画像は THUNDER イメージングシステム (Leica Microsystems)で取得した。

(2) 大脳皮質第一層における微小核の定量

数値解析ソフトウェアである MATLAB (MathWorks)の微小核定量プログラム(Calculating automatic micronuclei distinction: CAMDi)を用いて、大脳皮質第一層における微小核の定量を行った¹⁾。

(3) プラスミド作成

Rab1A, Rab2A, Rab3A, Rab11B, Rab15, Rab35, Syntaxin17, Tcpl はマウスの初代培養神経細胞の cDNA ライブラリーを鋳型とし、Rab1B, Vamp8 はマウスの脳の cDNA ライブラリーを鋳型とし、Atg9A は Atg9A-EGFP プラスミド²⁾を鋳型とし、それぞれ PCR によって DNA 産物を得た。その後、pCAGGS1 ベクター(pCAGGS1-mCherry)を EcoRI で切断し、Rab2A, Rab3A, Rab11B, Rab15, Rab35, Syntaxin17, Vamp8, Atg9A を挿入した。また、Rab1A と Tcpl は pCS4 ベクター(pCS4-mCherry)の Bgl II 切断箇所へ挿入した。

(4) 免疫細胞染色

神経芽細胞腫 Neuro-2a を播種した Transwell (3.0 μ m pore, Corning)の膜を4% PFA/PBSを用いて氷上で固定し、その後PBSで洗浄した。5% BSA/0.4% TritonX-100/PBSで透過処理をした後、一次抗体として抗 RFP 抗体(1:500, Rockland)を添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。核の染色には Hoechst33342 (10 μ g/ml,

Invitrogen)を用いた。染色画像は蛍光顕微鏡(Keyence, BIOREVO BZ-9000 fluorescence microscope)で観察した。

【結果・考察】

まず脳表層において、微小核の放出頻度が高い領域を探索した。生後 14 日目の NexCre; Sun1-GFP マウスの脳切片をブレグマから 50 μ m 間隔で 60 枚切り、染色後、MATLAB の CAMDi を用いて大脳皮質第一層部分の微小核の数の定量を行った。この結果、特に大脳新皮質の体性運動野と体性感覚野付近で多くの微小核が観察された。

次に、微小核の放出メカニズムを明らかにするために、本研究の先行研究のプロテオーム解析で同定した Rab ファミリーや SNARE タンパク質などの発現プラスミドを作成し、Neuro-2a へトランスフェクションした。これらタンパク質が微小核と局在するか解析したところ、予備的ながらも Rab2A と Rab3A が微小核に局在していることが明らかとなった。

これら結果から、RAB2A と RAB3A の微小核への局在が細胞外への放出に関与している可能性が示唆された。RAB2A は細胞内分解機構の一つであるオートファジーにおいて、膜構造である隔離膜の形成に関与していること³⁾や、RAB3A は分泌小胞の細胞膜への融合を制御することが知られている。また近年、オートファゴソームが内容物を分解せず細胞外へ放出する、分泌オートファジーの経路が明らかとなりつつある⁴⁾。以上のことから、神経細胞由来微小核が、Rab タンパク質が関与する分泌オートファジーの経路を介して細胞外に放出され、大脳新皮質におけるミクログリアの成熟の制御を行う可能性が考えられる。

今後は、本研究で作成した他の膜輸送関連タンパク質が微小核に局在しているかについて検証し、微小核放出のメカニズムを明らかにしていく。

また *In utero* electroporation 法を用いて、作成したプラスミドをマウスの生体内に導入し、微小核との局在を *in vivo* で検証する予定である。

【参考文献】

- 1) Yano S, *et al.* A MATLAB-based program for three-dimensional quantitative analysis of micronuclei reveals that neuroinflammation induces micronuclei formation in the brain. (2021). *Sci Rep*, 11(1), 18360
- 2) Imai K, *et al.* Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation. (2016). *J. Cell Sci.* 129, 3781-3791
- 3) Ding X, *et al.* RAB2 regulates the formation of autophagosome and autolysosome in mammalian cells. (2019). *Autophagy*, 15(10), 1774-1786
- 4) Ponpuak M, *et al.* Secretory autophagy. (2015). *Curr Opin Cell Biol*, 35, 106-116