

博士論文番号：1581016

脳組織形成と神経細胞の移動を担う  
Shootin1b を介した牽引力発生メカニズムの解明

嶺岸 卓徳  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 神経システム生物学研究室  
(稲垣 直之 教授)

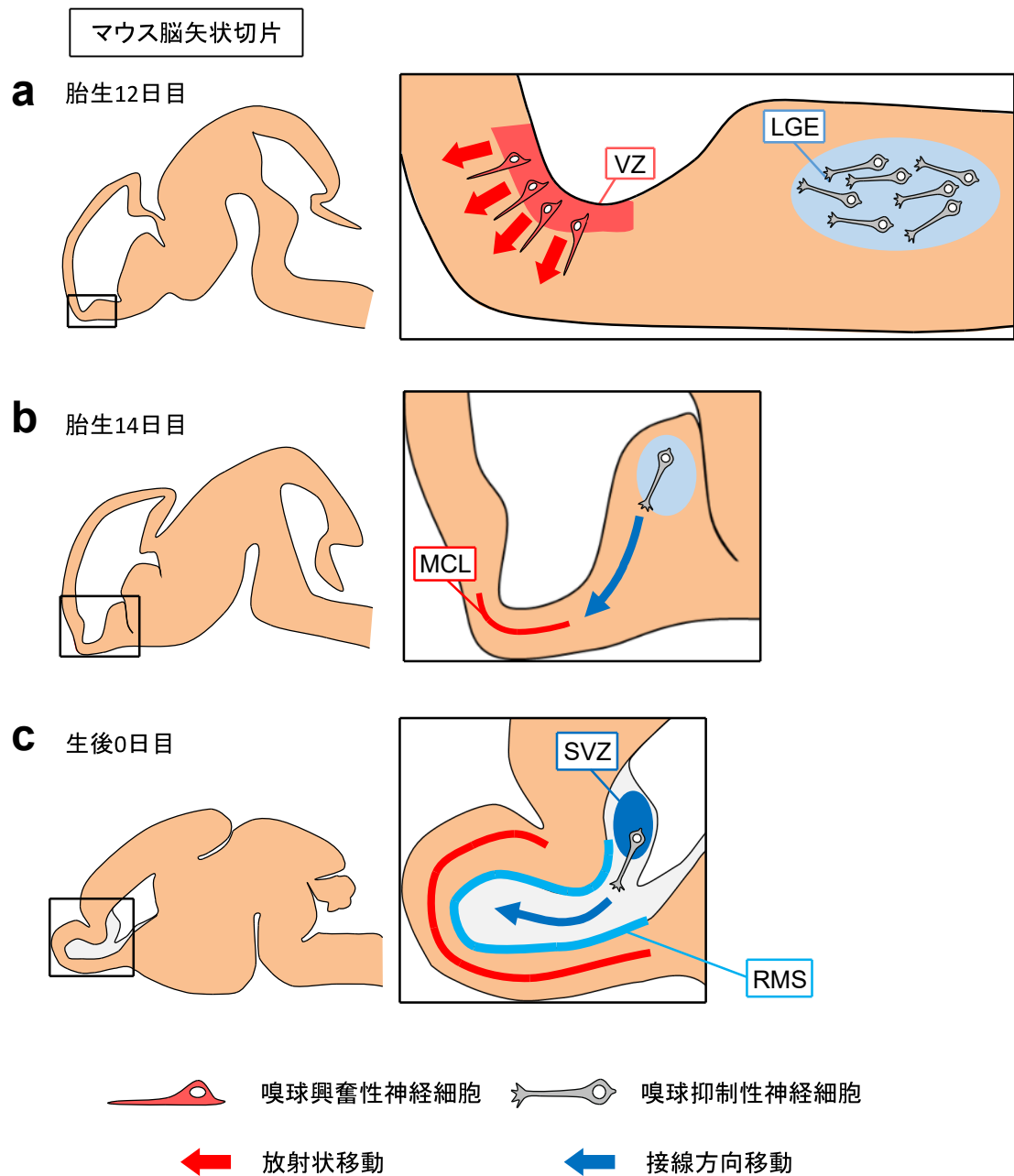
平成 30 年 2 月 13 日提出

## <序論>

細胞移動は、免疫応答や創傷治癒などの生体維持のみならず組織形成も担う重要なプロセスである<sup>1</sup>。中でも脳の形成過程では、異なる領域で誕生した多様な神経細胞が、各々の目的地へ大規模に細胞移動することで個々の脳組織が構築される<sup>2</sup>。また、海馬や嗅球といった脳の一部領域では、神経細胞が一生にわたり新たに産生されて、目的地まで細胞移動を行う<sup>3</sup>。そして、古い神経細胞との世代交代を通して神経ネットワークを可塑的に変化させ、脳機能の恒常性を保つ<sup>4</sup>。そのため、神経細胞の移動障害は脳奇形を含め、てんかんやアルツハイマー病をはじめとする脳疾患の原因となる<sup>5</sup>。

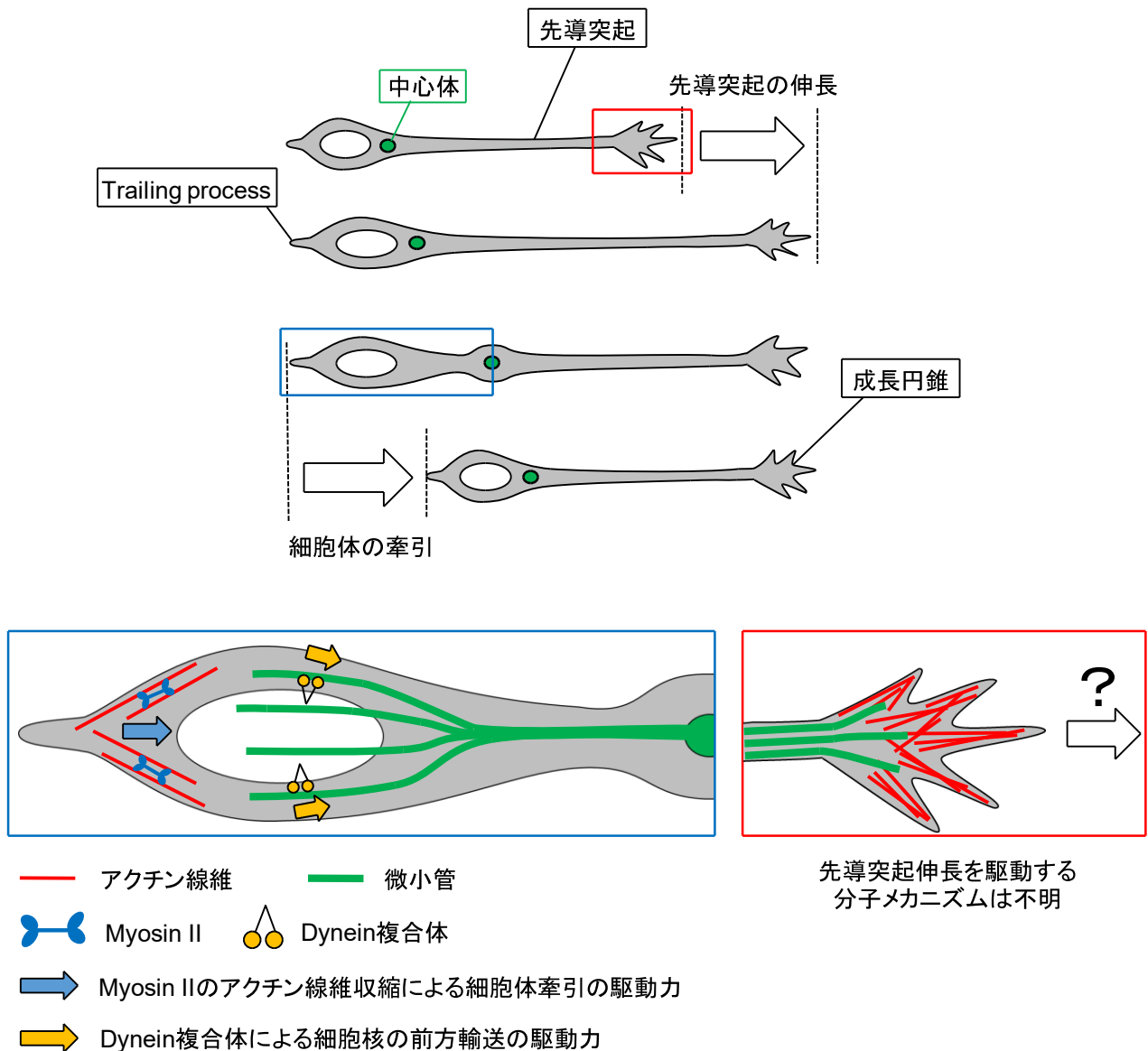
神経細胞は、神経ネットワークにおける働きの違いから興奮性神経細胞と抑制性神経細胞に分類される。興奮性神経細胞は、脳室帯 (Ventricular zone, VZ) で誕生し、脳表面方向に移動する<sup>2</sup>。そして、興奮性神経細胞が種類ごとに異なる位置で停止することにより脳組織内に層構造が形成される<sup>6</sup>。この細胞移動は、脳室に対して垂直方向に行われることから放射状移動と呼ばれる<sup>2</sup>。一方、抑制性神経細胞は、脳室に対して接線方向に進行する接線方向移動を行う<sup>2</sup>。抑制性神経細胞はその後方向転換し、放射状移動を行うことで興奮性神経細胞が構成する目的の層に到達する<sup>2</sup>。嗅覚情報の一次中枢を担う嗅球は、げっ歯類の脳の中でも大きく、層構造が明瞭な脳組織である<sup>7</sup>。嗅球の形成は、胎生11-12日目に産生される僧帽細胞が放射状移動することで始まる (図1a)<sup>7</sup>。僧帽細胞は嗅球興奮性神経細胞の一つであり、嗅球内で僧帽細胞層 (Mitral cell layer, MCL) を形成する<sup>8</sup>。一方、嗅球抑制性神経細胞は胎生12日目より外側基底核原基 (Lateral ganglionic eminence, LGE) で産生される (図1a)<sup>7</sup>。そして、胎生14日目に抑制性神経細胞は嗅球に向けて接線方向移動を開始する (図1b)<sup>9</sup>。外側基底核原基は出生までに脳室下帯 (Subventricular zone, SVZ) に取り込まれ<sup>10</sup>、生後は脳室下帯から嗅球抑制性神経細胞が産生される<sup>11</sup>。生後に産生される嗅球抑制性神経細胞は吻側移動経路 (Rostral migratory stream, RMS) 内を接線方向移動して嗅球に到達する (図1c)<sup>12,13</sup>。この細胞は成体脳においても産生されて吻側移動経路内を移動するため、脳内の細胞移動の解析が容易であり、神経細胞移動の研究によく用いられる<sup>14-17</sup>。

神経細胞は他の細胞種と異なり、先導突起を用いた跳躍運動と呼ばれる特徴的な移動様式を示す<sup>18</sup>。神経細胞は、細胞移動の最初のステップとして成長円錐を前進させることにより先導突起を伸長する (図2)<sup>19</sup>。成長円錐は、ダイナミックに形態を変えるフィロポディアとラメリポディアで構成されており、ガイダンス因子を感知する働きがある<sup>20</sup>。そして、成長円錐が誘引因子と忌避因子に応答して前進、後退することにより、先導突起が適切な方向に伸長する<sup>21</sup>。先導突起が伸長した後、細胞核の前方に位置していた中心体が前方に移動する<sup>19</sup>。続いて、細胞体



**図1. 嗅球形成に関与する神経細胞移動**

(a) 胎生11-12日目に嗅球興奮性神経細胞は嗅球原基の脳室帯 (Ventricular Zone, VZ)で産生され、放射状移動 (赤矢印)を開始する。一方、嗅球抑制性神経細胞は胎生12日目より外側基底核原基 (Lateral ganglionic eminence, LGE)で産生される。(b) 胎生14日目には嗅球興奮性神経細胞により構成される僧帽細胞層 (Mitral cell layer, MCL)が形成される。嗅球抑制性神経細胞は嗅球に向かって接線方向移動 (青矢印)を開始する。(c) 外側基底核原基は脳室下帯 (Subventricular zone, SVZ)に取り込まれ、生後においては脳室下帯で嗅球抑制性神経細胞が産生される。脳室下帯で産生された嗅球抑制性神経細胞は吻側移動経路 (Rostral migratory stream, RMS)を通り嗅球に到達する。



## 図2. 神経細胞の移動様式

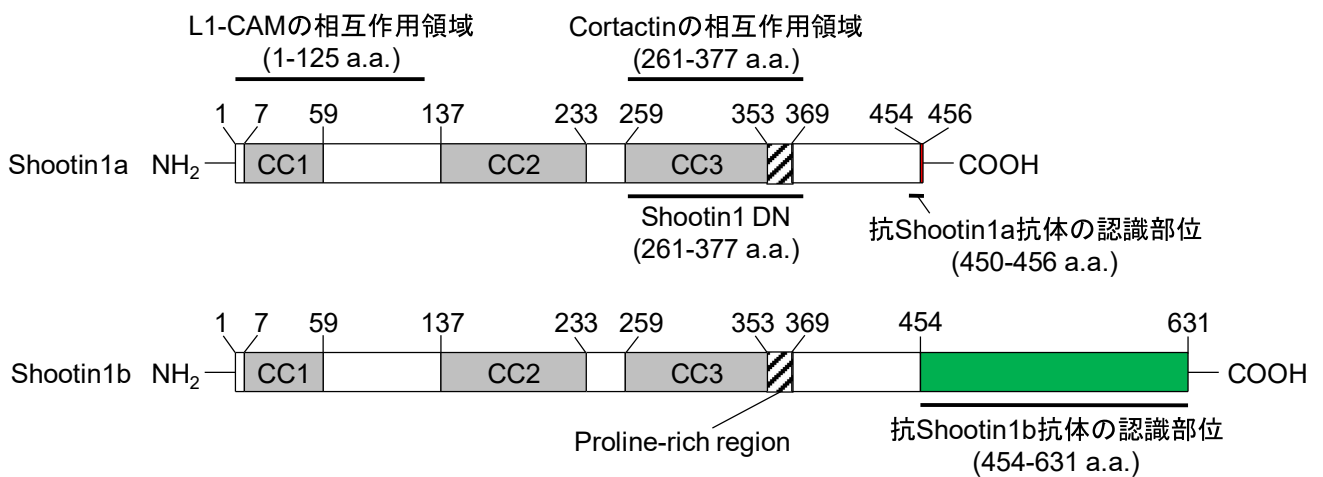
神経細胞は、先導突起の伸長、中心体の前方移動、細胞体の牽引の3つのステップを通して細胞移動する。細胞体の牽引は、微小管を足場としたDynein複合体による細胞核の前方輸送とMyosin IIによるアクチン線維の収縮により駆動される。先導突起先端部の成長円錐にはアクチン線維が豊富に存在し、アクチン線維とその結合タンパク質によるダイナミクスが先導突起伸長に関与すると考えられている。しかし、その先導突起の伸長を駆動する分子メカニズムは不明である。

が、Trailing process と呼ばれる細胞体後方に伸びる短い突起と共に先導突起の方向に牽引される (図 2)<sup>19</sup>。特に、抑制性神経細胞は、先導突起の伸長から細胞体の牽引までのサイクルを繰り返すことにより長距離移動を行うが<sup>2</sup>、先導突起が伸長する時期と細胞体が牽引される時期の間には相関関係がみられないことから、2 つのステップには独立した分子メカニズムが働くと考えられている<sup>19,22</sup>。神経細胞の細胞移動に伴う形態変化には、細胞内の微小管とアクチン線維が重要な役割を果たす<sup>21</sup>。微小管は、細胞体の前方に局在する中心体を重合核として神経細胞内にネットワークを形成する。先導突起内の微小管は束化されており、先導突起の安定化に関与する。一方、細胞体内の微小管は細胞核の周りを覆う<sup>19</sup>。そして、細胞核を囲む微小管を足場にして、Dynein とその結合分子 Lissencephaly 1 の複合体が細胞核を前方に輸送することで細胞体の牽引が起こる<sup>18,23</sup>。また、細胞核の後方にはアクチン線維が存在しており、RhoA 依存的な Myosin II によるアクチン線維の収縮も細胞体の牽引を駆動することが知られている (図 2, 青枠)<sup>24-27</sup>。一方、成長円錐内にはアクチン線維が豊富に存在することから、アクチン線維とその結合タンパク質によるダイナミクスが成長円錐の前進に関与すると考えられている<sup>13</sup>。しかし、成長円錐の前進に必要な分子基盤が明らかにされておらず、先導突起伸長を駆動する分子メカニズムの理解は進んでいない (図 2, 赤枠)<sup>2</sup>。

先導突起と同様に成長円錐を持つ軸索の伸長に関しては、クラッチメカニズム<sup>28</sup>が重要な役割を果たすと考えられている。軸索先端の成長円錐内には、重合端が先導端側に向けたアクチン線維が豊富に存在する<sup>29</sup>。そのため、アクチンモノマーは先導端側で重合し、細胞膜を押し出す力を生み出す。一方、アクチン脱重合がアクチン線維の後方で起こり、細胞内のアクチンモノマーの濃度を一定に保つ。アクチンの重合と脱重合の平衡状態はアクチントレッドミリングと呼ばれ、アクチン線維が持続的に細胞膜を前方に押すことを可能にする<sup>30</sup>。また、成長円錐内では逆行性移動と呼ばれるアクチン線維の求心方向の流動が観察される<sup>29</sup>。逆行性移動は、先導端におけるアクチン重合とアクチン線維の後方における Myosin II の収縮力により駆動される<sup>30</sup>。従って、アクチン重合が細胞膜を押し出す力は、そのままでは逆行性移動により相殺されてしまう。クラッチメカニズムでは、クラッチ分子がアクチン線維と細胞接着分子を連結することで逆行性移動の駆動力を細胞外基質に牽引力として伝達する。その結果、アクチン線維の逆行性移動が抑制され、アクチン重合による細胞膜を押し出す力が優位になる。同時に、Myosin II が細胞外基質に連結したアクチン線維を足場として、周囲のアクチン線維を牽引する。クラッチメカニズムは、アクチン重合と細胞骨格の牽引の二つの要因が成長円錐を前進させることで軸索が伸長することを説明する<sup>28-30</sup>。しかしながら、先導突起伸長のためのクラッチ分子が同定されておらず、クラッチメカニズムが神経細胞移動に関与するかは明らかにされていない。

当研究室はこれまでに、神経細胞の軸索伸長に關与するクラッチ分子Shootin1aとそのスプライシングアイソフォームである機能未知なShootin1bを同定した (図3)<sup>31,32</sup>。先行研究においてShootin1遺伝子欠損 (Shootin1 KO)マウスが作製され、その表現型解析が行われたところ、生後0日目のShootin1 KOマウスの35%は嗅球の無形性を示すことがわかった<sup>33</sup>。さらに、Shootin1 KOマウスの脳構造が調べられたところ、嗅球の無形性を示す個体では吻側細胞移動経路が形成されず、脳室下帯に細胞が蓄積することが報告された<sup>34</sup>。また、先行研究により、脳内におけるShootin1a及びShootin1bの発現パターンが調べられた。その結果、Shootin1bが脳室下帯、吻側細胞移動経路、そして嗅球内部に伸びる吻側移動経路に発現するのに対し、Shootin1aはこれらの領域では検出されなかった<sup>34</sup>。以上の結果から、Shootin1が嗅球形成に關与し、Shootin1bが嗅球抑制性神経細胞の移動経路に発現することが示されたが、Shootin1bが嗅球形成に重要な嗅球抑制性神経細胞の細胞移動に關与するかは不明であった。

本研究は、Shootin1bが嗅球抑制性神経細胞で発現し、Shootin1 KO嗅球抑制性神経細胞は細胞移動速度の減少を示すことを明らかにした。嗅球抑制性神経細胞の細胞内におけるShootin1bの動態を解析したところ、Shootin1bは先導突起先端部の成長円錐内に濃縮し、この濃縮は成長円錐の前進と關した。この結果と一致して、Shootin1 KO嗅球抑制性神経細胞は先導突起の伸長阻害を示した。興味深いことに、Shootin1 KOによる先導突起の伸長阻害が細胞体の牽引を抑制することが示された。嗅球介在細胞の細胞移動に關与する力学を解析したところ、成長円錐下で牽引力が持続的に生み出されることがわかった。さらに、この牽引力が成長円錐の前進を駆動し、その発生にShootin1bが關与することが示された。蛍光スペクトル観察による分子動態解析は、成長円錐内のアクチン線維が逆行性移動することを明らかにし、Shootin1bがアクチン結合タンパク質Cortactinを介して逆行性移動するアクチン線維と相互作用することを示した。また、免疫共沈降実験により、Shootin1bが細胞接着分子L1-CAMと相互作用することがわかった。Shootin1とCortactinの相互作用を阻害するShootin1ドミナントネガティブ体を過剰発現した嗅球抑制性神経細胞の成長円錐内では、逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質間の連結が阻害された。また、この連結が阻害された嗅球抑制性神経細胞は、Shootin1 KO細胞と同様に、先導突起の伸長阻害と細胞移動速度の減少を示した。以上のように、本研究は、Shootin1bがCortactin及びL1-CAMとの相互作用を介して逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質を連結するクラッチ分子として働き、成長円錐を駆動する牽引力を生み出して先導突起を伸長させることを見出した。そして、クラッチメカニズムが脳組織形成と神経細胞移動において重要な役割を果たすことを初めて明らかにした。



**図3. Shootin1aのスプライシングアイソフォームShootin1b**

Shootin1a及びShootin1bの一次構造。Shootin1aとShootin1bのアミノ酸配列1-453 a.a.の領域は同一であり、3個のCoiled-coil(CC)とProline-rich領域を持つ。Shootin1aのC末端3アミノ酸(赤)がShootin1bでは178アミノ酸(緑)に置換されている。先行研究により、Shootin1aはアミノ酸配列1-125 a.a.の領域で細胞接着分子L1-CAMと相互作用し、261-377 a.a.の領域でCortactinと相互作用することが報告された。当研究室で作製された抗Shootin1a抗体はShootin1aの450-456 a.a.を認識し、抗Shootin1b抗体はShootin1bの454-631 a.a.を認識する。本研究では、内在性Shootin1bとCortactinの相互作用を阻害するドミナントネガティブ体(Shootin1 DN)としてShootin1 261-377 a.a.を用いた。

## <材料と方法>

### 1. 実験動物

本研究において、実験及びShootin1 KOマウスの系統維持には、日本エスエルシー株式会社と日本クレア株式会社から購入したC57BL/6マウスを用いた。Shootin1 KOマウスは、以下に述べる手順で当研究室により作製された系統である。

最初に、LacZ-neo<sup>r</sup>遺伝子上流と下流が、マウスShootin1遺伝子のExon 1上流4.8 kbp及び下流2.7 kbpの相同配列で挟まれたベクターが作製された。相同配列とLacZ-neo<sup>r</sup>遺伝子を含むDNA鎖は制限酵素処理により切り出され、切り出されたDNA鎖は、エレクトロポレーション法により129マウス由来のES細胞に遺伝子導入された。そして、相同組換えによりShootin1遺伝子のExon 1がLacZ-neo<sup>r</sup>遺伝子に置換されたES細胞は、ネオマイシンを用いた薬剤スクリーニングによって選別された。選別されたES細胞はC57BL/6マウスの胚胞にインジェクションされた。この胚から生まれたキメラマウスがC57BL/6と掛け合わされ、Shootin1 KOマウスの系統が作製された。当研究室は、サザンブロッティングによりShootin1 KOマウスではShootin1遺伝子が組換えられていることを確認し、ウェスタンブロッティングによりShootin1a及びShootin1bの発現が検出されないことを確認した。

本研究では、7回以上バッククロスが行われたHeterozygousマウス同士を交配させ、得られたHomozygousマウスをShootin1 KOマウスとして使用し、同一腹仔の野生型マウスをコントロールとして実験に使用した。但し、図10の実験に関しては、Heterozygousマウス同士を交配させて野生型あるいはShootin1 KOマウスが生まれる確率はそれぞれ25%であり、遺伝子導入に必要な細胞数が得られないため、野生型マウス同士の交配とShootin1 KOマウス同士の交配で生まれた仔マウスを使用した。

Shootin1 KOマウスの脳は個体ごとに異なる表現型を示す。目視で脳構造に異常が見られなかった個体は、抑制性神経細胞の細胞移動においても野生型と顕著な差が見られなかった。そこで、抑制性神経細胞の細胞移動を解析した実験では、脳構造に異常が見られた個体のみを用いた。

### 2. 遺伝子型の決定

マウスの尻尾の先端を5 mm切り出し、50 mM NaOH (Nacalai)水溶液 180 µLに加えてボルテックスを45 sec行った。サンプルを95°Cに温めたブロックインキュベーターに10 min置き、再度ボルテックスを45 sec行った。1 M Tris-HCl (pH 8.0, Nacalai) 20 µLを加え、ボルテックスを10 sec行い、その後、4°C, 17400 G, 10 min遠心した。得られた上清にはマウスのゲノムDNAが含まれており、その後のPCR反



応のDNAテンプレートとして用いた。PCR反応にはKOD FX (Toyobo)を使用し、94°C, 2 minの後、98°C, 10 sec、60°C, 30 sec、68°C, 30 secのサイクルを30回、72°C, 2 minの反応条件で行った。また、PCR反応のプライマーとして、F1 (5'-CAGACTGCTACCCACTACCCCCTAC-3')、R1 (5'-CCTAGAGCTGGACAGCGGATC TGAG-3')、F2 (5'-CCCAGAAAGCGAAGGAACAAAGCTG-3')、R2 (5'-ACCTTGC TCCTTCAAGCTGGTGATG-3') の4種を同時に用いた。このPCR産物は、Shootin1 KOマウスの場合420 bp、野生型マウスでは200 bpの位置にバンドが確認される。PCR産物をアガロースゲル電気泳動した後、アガロースゲルをEtidium bromide (Nacalai)水溶液に浸し、GelDoc-It™ Imaging System (UVP) を用いてDNAバンドを検出した。

### 3. Nissl 染色

生後5日目マウスの全脳を Phosphate Buffered Salin (PBS (Potassium dihydrogen phosphate (Nacalai) 1.5 mM, Disodium phosphate (Nacalai) 81 mM, NaCl (Nacalai) 137 mM, KCl (Nacalai) 2.7 mM), pH 7.4)に回収し、血を洗浄した。その後、全脳をブアン液 (Wako) 10 mL に移し、4°C,一晩転倒混和することで固定した。固定後、70% Methanol (Nacalai)で全脳を10回洗浄した。その後、4°C下で全脳を80% Methanol 10 mL 内6 h, 90% Methanol 10 mL 内一晩, 100% Methanol 10 mL 内6 h, Molecular Sieves 3A 1/8 (Wako)を用いて脱水した100% Methanol 10 mL 内一晩転倒混和することにより、段階的に全脳の脱水を行った。次に、脱水した全脳をクロロホルム (Nacalai) 10 mL に移して室温, 3 h 転倒混和する操作を3回繰り返すことでクロロホルム置換を行った。その後、全脳を予め68°Cで溶かしたパラフィン (Wako)10 mL に移して68°C, 3 h 転倒混和する操作を3回繰り返した後、さらに68°C, 一晩転倒混和することでパラフィン置換した。続いて、パラフィン置換された全脳をパラフィンに包埋し、ミクロトーム (HM340E, Micro-edge Instruments)を用いて厚さ12 µmの矢状切片を作製した。矢状切片は42°C, 一晩伸展した後、Xylene (Nacalai)に室温, 10 min 浸す操作を3回繰り返すことで脱パラフィンを行った。次に、室温で矢状切片を100% Ethanol, 90% Ethanol, 70% Ethanol, MilliQの順番で各10 min 浸すことで段階的に水に置換した後、0.1% Thionine (Wako)に室温, 2 min 浸すことで切片を染色した。染色された矢状切片は、MilliQ, 70% Ethanol, 80% Ethanol, 90% Ethanol, 95% Ethanol, 100% Ethanolの順番で各30 sec 浸すことで段階的に脱水した後、Hemo De (Falma)に室温, 30 sec 浸す操作を2回繰り返し、矢状切片の透徹を行った。その後、Multi Mount480 (Matsunami)を用いて矢状切片を封入した。撮影には正立顕微鏡 (BX43, Olympus), 1.25倍対物レンズを用いた。

#### 4. 免疫組織染色

生後0日目のマウス脳全脳をPBS (pH 7.4, Gibco)に回収し、血を洗浄した。その後、全脳を4% Paraformaldehyde (PFA, Wako) 2 mLに移し、4°C, 3 h振とうすることで固定した。その後、全脳をPBS (pH 7.4) 3 mL内に移して洗浄する操作を3回繰り返した。固定された全脳は30% Sucrose (Nacalai)を含むPBS (pH 7.4) 2 mL内に移し、Sucrose置換を行った。続いて、Tissue Tek® optimal cutting temperature (OCT, Sakura Finetek)と30% Sucrose (Nacalai)を含むPBS (pH 7.4)を2:1の割合で混合した溶液2 mL内に移し、OCT置換を行った。OCT置換された全脳をOCTに包埋した後、クライオスタット (NX70, Thermo Fischer Scientific)を用いて厚さ12 µmの矢状切片を作製した。矢状切片はドライヤーを用いて20 min乾燥させ、Phosphate buffer (PB (Sodium dihydrogen phosphate (Nacalai) 25 mM, Disodium phosphate (Nacalai) 100 mM))内で室温, 5 min振とうした。次に、10 % Normal goat serum (NGS, Nacalai)を含むPBT Buffer (Sodium dihydrogen phosphate (Nacalai) 25 mM, Disodium phosphate (Nacalai) 100 mM, Triton X-100 (Nacalai)) 600 µLを矢状切片に添加し、室温, 2 hブロッキングした。次に、10 % NGSを含むPBT Bufferで2000倍希釈したRabbit anti-Tbr2抗体 (Abcam)を600 µL添加し、4 °C, 一晩一次抗体反応を行った。一次抗体反応後、PBT Buffer内で室温, 5 min振とうする操作を3回繰り返すことで矢状切片を洗浄した。次に1 µg/mL 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)と10 % NGSを含むPBT Bufferで1000倍希釈したAlexa Fluor® 594 donkey anti-rabbit IgG抗体(Thermo Fisher Scientific)を矢状切片に600 µL添加し、4 °C, 一晩二次抗体反応を行った。二次抗体反応後、PBT Buffer内で室温, 5 min振とうする操作を3回繰り返すことで矢状切片を洗浄した。その後、ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific)を用いて矢状切片を封入した。撮影には共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710, Zeiss), 20倍対物レンズを用いた。

#### 5. プラスミドの作製

先行研究により、PCR反応により成体ラット脳のcDNAライブラリー (Clontech Laboratories)から増幅されたShootin1bがpBluescript SK II (+) (Stratagene)にサブクローニングされた<sup>31</sup>。本研究では、このベクターをXho I (Toyobo)で制限酵素処理し、Shootin1bのDNA断片を切り出した。同様に、pmRFP-C1 (Clontech Laboratories), pAcGFP-C1 (Clontech Laboratories)をSal I (Toyobo)、pGEX-6p-1-mycをXho I (Toyobo)で制限酵素処理を行った。次に、アガロース電気泳動を行い、アガロースゲルをEtidium bromide (Nacalai)水溶液に浸した。GelDoc-It™ Imaging System (UVP) を用いて、制限酵素処理されたDNAのバンドの位置を確認し、カッターを用いて目的のDNA断片とプラスミドを含むアガロースゲルを回収した。次に、QIAEX II Gel

Extraction Kit (Qiagen)を用いて、回収したアガロースゲルからDNA断片とプラスミドを抽出した。得られたDNA断片とプラスミドはLigation HighVer.2 (Toyobo)を用いてライゲーション反応を行い、大腸菌DH5aに形質転換して37°C, 一晚培養した。得られた大腸菌のコロニーを培養し、ミニプレップ法により組換えプラスミドを抽出した。続いて、フェノール/クロロホルム法、エタノール沈殿によりプラスミドを精製した。組換えプラスミドのDNA塩基配列は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems)を用いて確認した。また、得られた組換えプラスミドを培養細胞HEK293Tまたは大腸菌BL21 (Codon plus)に導入し、目的タンパク質を発現させた後、ウェスタンブロッティングと蛍光顕微鏡観察を行った。以上の操作からmRFP融合Shootin1bとAcGFP融合Shootin1bの動物細胞発現ベクター、GST-Myc融合Shootin1bの大腸菌発現ベクターが作成できたことを確認した。蛍光スペクトル計測で使用したHaloTag融合Shootin1bの発現ベクターの作製には、pBluescript SK II (+)にサブクローニングされたShootin1bを鋳型として、PCR法により制限酵素サイトSgf I, Pme Iを付加した。使用したプライマーは5'-CCGCTCGAGATGAACAGCTCGGACGAGGAGAAG-3' (Forward) 及び 5'-CCGCTCGAGTCAGCAGTTAGAACTGTCCGTCTC-3' (Reverse)である。増幅したDNA断片と組換え先のプラスミドpFN21A (Promega)はSgf I, Pme I (Promega) で制限酵素処理を行い、その後は上述した手順通りに、組換えプラスミドの塩基配列及び発現確認を行った。その結果、HaloTag融合Shootin1bの動物細胞発現ベクターが作製できたことを確認した。

また、中心体と細胞核の動態解析に用いたCentrin2及びH2Bの蛍光タンパク質融合動物細胞発現ベクターは以下の通りに作製した。まず、PCR反応によりヒト胎児脳のcDNAライブラリー (Clonetech Laboratories)から制限酵素サイトXho I、BamH I を付加したCentrin2と、Xho Iを付加したH2Bを増幅した。プライマーは、Centrin2の増幅には5'-GGACTCGAGGCCACCATGGCCTCCAACCTTTAAGAAGGC-3' (Forward)及び5'-TTTGGATCCCGATAGAGGCTGGTCTTTTTCATG-3' (Reverse)、H2Bの増幅には5'-AAACTCGAGGCCACCATGCCAGAGCCAGCGAAGTCTGCT-3' (Forward)及び5'-GGGCTCGAGCTTAGCGCTGGTGTACTTGGTGAC-3' (Reverse)を使用した。増幅したCentrin2のDNA断片と組換え先のプラスミドpmNeonGreen-N1 (Allele Biotechnology)はXho IとBamH I (Toyobo)で制限酵素処理を行い、H2BのDNA断片と組換え先のプラスミドpmRFP-N1はXho Iで制限酵素処理を行った。その後は上述した手順通りに、組換えプラスミドの塩基配列及び発現確認を行い、mNeonGreen融合Centrin2及びmRFP融合H2Bの動物細胞発現ベクターが作製できたことを確認した。

## 6. コーティング用のL1-Fcの作製

直径10 cmのプラスチックディッシュ (Greiner) 上、10% Fatal Bovine Serum (FBS, Japan Bio Serum)を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) 10 mL内でHEK293T細胞を80%コンフルエントになるまで培養した (37°C, CO<sub>2</sub> 5%)。その後、ディッシュ1枚当たり40 mgのpCAGGS-L1-Fc (Fc融合ヒトL1-CAM細胞外ドメイン)をリン酸カルシウム法により遺伝子導入した。遺伝子導入から24 h後、DMEMでディッシュを洗浄し、FBS-freeのDMEM 10 mLに交換して48 h培養した。その後、培養液を回収し、4°C, 2200 G, 25 min遠心分離した。上清を滅菌フィルター(0.22 µm, Pall)に通してろ過滅菌した後、液体窒素で瞬間冷凍し、-80°Cディープフリーザー内で保存した。L1-Fcをコーティングに使用する際は、4°C冷蔵庫内で溶液を融解して用いた。

## 7. カバースリップ及びガラスボトムディッシュのコーティング

### 7-1. Poly-D-lysine (PDL)

直径13 mmカバースリップ (Matsunami)及びガラス直径14 mmガラスボトムディッシュ (Matsunami) に0.1 mg/mL PDL (Sigma)を添加し、37°C, 3 h以上インキュベートした。その後、PBS (pH 7.4)で洗浄した。

### 7-2. Laminin

PDLコートされたカバースリップ及びガラスボトムディッシュに5 µg/mL Laminin (Wako)を添加し、37°C, 3 h以上インキュベートした。その後、PBS (pH 7.4)で洗浄した。

### 7-3. L1-Fc

PDLコートされたカバースリップ及びガラスボトムディッシュにPBS (pH 7.4)で100倍希釈されたRabbit anti-Fc抗体 (Jackson)を添加し、37°C, 3 h以上インキュベートした。その後、作製されたL1-Fcを添加し、37°C, 一晚インキュベートした。その後、PBS (pH 7.4)で洗浄した。

## 8. 細胞培養

### 8-1. XTC 細胞の培養 (アフリカツメガエル由来繊維芽細胞)

25 cm<sup>2</sup>フラスコ (Greiner)上、10% FBS (Sigma)を含む70% Leibovitz's L-15 medium (L-15, Gibco) 2 mL内でXTC細胞を培養した(28°C, CO<sub>2</sub> 5%)。細胞密度がコンフルエント70-80%になったとき、継代培養を行った。

### 8-2. 脳室下帯由来神経細胞の初代培養

生後5日目マウスの全脳を、4% Glucose (Nacalai)を含むPBS (pH 7.4, Gibco)に回収した。マニーオフサルミックナイフ ストレート15° (Mani)を用いて脳室下帯を

摘出し、0.18% Glucose (Nacalai), 0.1% Bovine serum albumin (BSA, Sigma), 0.0012% DNase I (Sigma), 0.05% Papain (Nacalai)を含むPBS (pH 7.4)に移して37°C, 15 minインキュベートした。その後、沈殿した脳室下帯の組織片を含む溶液1 mLを残して上清を取り除き、0.18% Glucose (Nacalai), 0.1% BSA (Sigma), 0.0012% DNase I (Sigma)を含むPBS (pH 7.4) 4 mLを加えた。ガラスパスツールピペットを用いてピペッティングを行い、37°C, 20 minインキュベートした。その後、700 G, 4°C, 4 min遠心分離し、上清を取り除いた。PBS (pH 7.4) 5 mLを加えて細胞を再懸濁し、細胞数を改良型ノイパウエル血球計算盤 (Minato medical co.)を用いて数えた。得られた細胞数は実験の目的に合わせて希釈した。細胞は続けて遺伝子導入を行うか、またはコーティングを施したカバースリップ及びガラスボトムディッシュに播いた。カバースリップ及びガラスボトムディッシュに播く場合は、700 G, 4°C, 4 min遠心分離して細胞を回収し、上清を除いて、細胞密度 $1\sim 2 \times 10^5$  cellsとなるように10% FBS (Sigma)を含むNeurobasal medium (Gibco)を添加し、再懸濁した。細胞懸濁液はカバースリップ及びガラスボトムディッシュに播き、3 h培養した (37°C, CO<sub>2</sub> 5%)。その後、2% B-27 supplement (Gibco), 1 mM Glutamine (Nacalai)を含むNeurobasal medium (Gibco)にMediumを交換し、1.5~2日間培養した。

### 8-3. 脳室下帯組織片の培養

生後5日目のマウスの脳を、L-15 (Gibco)内に回収した。マニーオフサルミックナイフ ストレート15° (Mani)を用いて脳室下帯を摘出し、直径100~150 µmのブロック状にカットした。室温, 700 G, 30 sec遠心分離した後、上清を除き、Matrigel (Corning)とL-15の混合液 (3:1) 50 µLを添加して穏やかにピペッティングを行った。脳室下帯のブロックを含むMatrigel溶液は、Migration Assayにはガラス直径14 mmのガラスボトムディッシュ (Matsunami)、Traction force microscopyにはL1-Fcコートされたアクリルアミドゲルに添加し、37°C, 30 minインキュベートすることでMatrigelを重合させた。その後、2% B-27 supplement (Gibco), 1 mM Glutamine (Nacalai)を含むNeurobasal medium (Gibco) 2 mLを添加して培養した (37°C, CO<sub>2</sub> 5%)。

## 9. 遺伝子導入

### 9-1. XTC細胞への遺伝子導入

XTC細胞の遺伝子導入にはリポフェクション法を用いた。細胞数を改良型ノイパウエル血球計算盤 (Minato medical co.)で数えたXTC細胞を6ウェルプレート (Greiner)に $2 \times 10^5$  cells播き、70%コンフルエントになるまで数日間培養した (28°C, CO<sub>2</sub> 5%)。L-15 (Gibco) 100 µL内に、導入するプラスミドの重量に対して3倍量のX-tream Gene Transfection (Roche)を添加して軽くタッピングを行った。次にプラ

スミドを添加して軽くタッピングを行い、室温, 15 minインキュベートした。その後、Mediumに混合液を滴下し、軽く6ウェルプレートを振とうした。遺伝子導入から24 h後、Mediumを交換した。

## 9-2. 神経細胞への遺伝子導入

神経細胞の遺伝子導入にはエレクトロポレーション法を用いた。材料と方法8-2に示した方法でPBS (pH 7.4, Gibco)に再懸濁し、細胞数を数えた神経細胞を700 G, 4°C, 4 min遠心分離することで回収した。上清を除き、細胞数 $1.0 \times 10^6$  cellsに対してMouse Neuron Nucleofactor Kit (Lonza) のMouse Neuron Nucleofactor Solution 75  $\mu$ L, Supplement 25  $\mu$ Lを添加し、再懸濁した。プラスミドは細胞数 $1.0 \times 10^6$  cellsあたり合計1~6  $\mu$ gを加え、よくピペティングを行った。細胞懸濁液は専用のキュベットに移し、Nucleofactor装置 (Lonza)のプログラム“O-005”により遺伝子導入を行った。

蛍光スペックル計測を行う場合は、 $1 \sim 2 \times 10^5$  cellsとなるように10% FBS (Sigma)入りのNeurobasal medium (Gibco)をキュベットに添加し、再懸濁した。細胞懸濁液はL1-Fcコートされたガラスボトムディッシュに播き、3 h培養した (37°C, CO<sub>2</sub> 5%)。その後、2% B-27 supplement (Gibco), 1 mM Glutamine (Nacalai)を含むNeurobasal mediumにMediumを交換し、1.5~2日間培養した。

Migration assayあるいは神経細胞移動におけるShootin1bのダイナミクス解析を行う場合は、10% FBS (Japan Bio Serum), 2% B-27 supplement, 1 mM Glutamineを含むNeurobasal medium 1mLをキュベットに添加し、再懸濁した。細胞懸濁液は1.5 mLチューブに移し、400 G, 4°C, 5 min遠心分離した後、上清を除き、10% FBS, 2% B-27 supplement, 1 mM Glutamineを含むNeurobasal medium 10  $\mu$ Lで再懸濁した。細胞懸濁液は、ガラス直径14 mmガラスボトムディッシュ (Matsunami)のふたの裏にのせた。ガラスボトムディッシュにはL-15 (Gibco)1mLを加え、細胞懸濁液をのせたふたを被せて5~7 h細胞を再凝集させた(37°C, CO<sub>2</sub> 5%)。その後、ガラスボトムディッシュに加えていたL-15 1 mLを用いて細胞塊を回収し、400 G, 4°C, 5 min遠心分離した。上清を除き、Matrigel (Corning)とL-15の混合液 (3:1)を 20  $\mu$ Lを添加した。細胞塊を含むMatrigel溶液は直径14 mmのガラスボトムディッシュに添加し、37°C, 30 minインキュベートすることでMatrigelを重合させた。その後、2% B-27 supplement, 1 mM Glutamineを含むNeurobasal medium (Gibco) 2 mLを添加して培養した。

## 10. 免疫細胞染色

Lamininコートされたカバースリップ (Matsunami)またはガラスボトムディッシュ (Matsunami)上で培養された細胞はMediumを吸い取り、4% Paraformaldehyde

(Wako)を含むKreb's Buffer (20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid-NaOH (HEPES-NaOH, pH 7.0), 236 mM NaCl, 9.4 mM KCl, 2.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.4 mM MgSO<sub>4</sub>, 8.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Glucose, 0.8 mM Sucrose) 500  $\mu$ Lを添加して氷上10~15 min静置して細胞を固定した。固定後、固定液を吸い取り、PBS (pH 7.4)で洗浄した。PBSを吸い取り、氷冷した0.05% Triton X-100 (Nacalai)を含むPBS (pH 7.4) 500  $\mu$ Lを加えて氷上で15 min静置して透過処理を行った。透過処理後、0.05% Triton X-100を含むPBS (pH 7.4) 500  $\mu$ Lを吸い取り、10% FBS (Japan Bio Serum)を含むPBS (pH 7.4) 500  $\mu$ Lを加えて室温、1 h静置し、ブロッキングを行った。ブロッキング後、溶液を吸い取り、10% FBSを含むPBS (pH 7.4)で目的の濃度に希釈した一次抗体を加え、4°Cで一晩抗体反応させた。一次抗体反応後、抗体を含む溶液は氷冷PBS (pH 7.4)で洗浄した。次にPBS (pH 7.4)で目的の濃度に希釈した二次抗体を加え、遮光して室温、1 h抗体反応させた。二次抗体反応後、抗体を含む溶液はPBS (pH 7.4)で洗浄した。カバースリップ用いた免疫染色の場合、洗浄したカバースリップをスライドガラス (Matsunami)に移し、50% Glycerol (Nacalai)を含むPBS (pH 7.4)をカバースリップに滴下した。上からカバーガラス (Matsunami)を被せ、トップコートで密閉することでカバースリップを封入した。ガラスボトムディッシュを用いた免疫染色の場合、洗浄したガラスボトムディッシュに50% Glycerolを含むPBS (pH 7.4) 2 mLを加えて封入した。

アクチン線維を染色する場合は、4% Paraformaldehydeを含むPBS (pH 7.4) 500  $\mu$ Lを添加して37°C, 10 min静置して細胞を固定した。固定後、固定液を吸い取り、PBS (pH 7.4)で洗浄した。PBSを吸い取り、氷冷した0.05% Triton X-100を含むPBS (pH 7.4) 500  $\mu$ Lを加えて氷上で15 min静置して透過処理を行った。透過処理後、0.05% Triton X-100を含むPBS (pH 7.4) 500  $\mu$ Lを吸い取り、5% BSA (Nacalai)を含むPBS (pH 7.4) 500  $\mu$ Lを加えて室温、1 h静置し、ブロッキングを行った。ブロッキング後、溶液を吸い取り、5% BSAを含むPBS (pH 7.4)で目的の濃度に希釈した一次抗体を加え、4°C、一晩抗体反応させた。一次抗体反応後、抗体を含む溶液は氷冷PBS (pH 7.4)で洗浄した。次にPBS (pH 7.4)で目的の濃度に希釈した二次抗体を加え、遮光して室温で1 h抗体反応させた。二次抗体反応後、抗体を含む溶液はPBS (pH 7.4)で洗浄した。次にPBS (pH 7.4)で100倍希釈したAlexa Fluor 594 Phalloidin (Molecular Probe)。試料の観察には、カメラ(AxioCam MRm, Zeiss)を装備した落射型蛍光顕微鏡(Axio Plan2, Zeiss), x63油浸対物レンズを用いた。図13cの観察には、EMCCDカメラ(iXon DU-897E-CS0, Andor)を装備した全反射顕微鏡(IX81, Olympus), x100油浸対物レンズを用いた。取得した画像はPhotoshop element 13 (Adobe)を用いて編集した。免疫細胞染色に用いた抗体名、免疫動物、メーカー、希釈倍率は以下の通りである。

## 一次抗体

抗体名	免疫動物と種類	メーカー	希釈倍率
Anti-shootin1a	Rabbit, Polyclonal	当研究室にて作製	x10000
Anti-shootin1b	Rabbit, Polyclonal	当研究室にて作製	x20000
Anti-doublecortin	Goat, Polyclonal	Santacruz	x1000
Anti-tuj-1	Mouse, Monoclonal	Biolegend	x1000
Anti-cortactin	Mouse, Monoclonal	Millipore	x500
Anti-L1	Goat, Polyclonal	Santacruz	x1000

## 二次抗体

抗体名	メーカー	希釈倍率
Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit IgG	Molecular Probe	x1000
Alexa Fluor® 594 donkey anti-rabbit IgG	Molecular Probe	x1000
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG	Molecular Probe	x1000
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG	Molecular Probe	x1000
Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG	Molecular Probe	x1000

## 11. 脳ライセートの調整

胎生19日目ラットまたは胎生18日目マウスの全脳を回収し、氷冷PBS (pH 7.4)で血液成分などを洗浄した。洗浄された脳をホモジナイザーに移し、脳重量の3倍量のHomogenate Buffer (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM Ethylene Glycol Tetraacetic Acid (EGTA), 1 mM Dithiothreitol (DTT), 2 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 µg/mL Leupeptin, 5 mM NaF, 10 mM β-glycerophosphate, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)を加え、4°Cで脳組織を破碎した。700 G, 4°C, 10 min遠心分離を2回行い、上清を回収して細胞核画分および未破碎細胞を取り除いた。次に100000 G, 4°C, 30 min超遠心することで細胞質成分を含む可溶性画分と細胞膜成分を含む不溶性画分に分離した。可溶性画分は別の1.5 mLチューブに移した。マウス脳ライセートはウェスタンブロッティングによる抗Shootin1a, 1b抗体の特異性の検査に用いた。ラット脳ライセートはShootin1bとCortactinの免疫共沈降実験に用いた。不溶性画分は回収した可溶性画分と同量の1.0% Triton X-100 (Nacalai)を含むLysis Bufferを添加し、ピペッティングを行った。その後、氷上で30 minインキュベートし、100000 G, 4°C, 30 min超遠心した。上清はL1-CAMをBaitとしたShootin1との免疫共沈降実験に用いた。このときの不溶性画分は回収した上清と同量の1.5% Octil glucoside (Sigma)を含むLysis Bufferを添加し、ピペッティングを行った。その後、氷上で30 minインキュベートし、100000 G, 4°C, 30 min超遠心し



た。上清はShootin1bをBaitとしたL1-CAMとの免疫共沈降実験に用いた。

## 12. 共免疫沈降

調整したラット脳ライセートを滅菌フィルター (0.45  $\mu\text{m}$ , Pall)に通してろ過した後、1.5 mLチューブに500  $\mu\text{L}$ ずつ分注した。次に抗体を加え、ローターを用いて4°C, 一晚転倒混和を行った。抗体反応後、Homogenate Buffer (pH7.5)で平衡化されたProtein G-sepharose 4B (GE healthcare) 20  $\mu\text{L}$ を加え、ローターを用いて4°C, 1 h転倒混和を行った。その後、3000 rpm, 4°C, 1 min遠心分離し、上清を吸い取って、Wash Buffer (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1% Triton X-100)を1 mL加えて穏やかに転倒混和してProtein G-sepharose 4Bを洗浄する操作を3回繰り返した。その後、上清を吸い取り、2xSDS Sample Bufferを25  $\mu\text{L}$ 加えて攪拌し、95°C, 5 minインキュベートした。得られたサンプルはウェスタンブロッティングに用いた。

## 13. タンパク質の精製

目的タンパク質の遺伝子が組み込まれたpGEXベクターをBL21 (codon plus)に形質転換し、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicilinを含むLBプレート上で37°C, 一晚培養した。生えてきたシングルコロニーを50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicilinを含むLB溶液 2 mLに播種し、150 rpm, 37°C, 一晚振とうして前培養を行った。次に、前培養液を50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicilinを含むLB溶液1 Lに加え、200 rpm, 37°C振とうしてOD値が0.4~0.6になるまで本培養を行った。OD値が目的の値に到達した後、Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Nacalai)を終濃度0.1 mMとなるように加え、160 rpm, 19°C, 一晚振とうすることで、GST融合目的タンパク質の発現を誘導した。その後、2900 G, 4°C, 15 min遠心分離し、上清を取り除き、氷冷PBS (pH 7.4)に再懸濁して50 mLチューブに大腸菌を移した。再度2900 G, 4°C, 15 min遠心分離し、上清を取り除き、氷冷TED Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Leupeptin)を菌重量の3倍量加え、再懸濁した。大腸菌を氷上で超音波破碎し、その破碎液を100000 G, 4°C, 1 h超遠心した。その後、上清を滅菌フィルター (0.45  $\mu\text{m}$ , Pall)に通してろ過し、pH試験紙を用いてpH 8.0に調整した。この溶液にTED Buffer (pH 8.0)で平衡化したGlutathion sepharose 4B (GE healthcare) 1 mLを加えて、ローターを用いて4°Cで2 h転倒混和を行った。その後、180 G, 4°C, 1 min遠心分離し、上清を吸い取って、500 mM NaClを含む氷冷TED Buffer (pH 8.0) 10 mL加えて穏やかに転倒混和してGlutathion sepharose 4Bを洗浄する操作を3回繰り返した。その後、180 G, 4°C, 1 min遠心分離し、上清を吸い取り、PreScission Cleavage Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1

mM DTT) 10 mL加えて穏やかに転倒混和する操作を2回繰り返して Glutathion sepharose 4Bを平衡化した。上清を除き、40 unit PreScission Protease (GE healthcare) を含むPreScission Cleavage Buffer (pH 7.5) 1 mLを加え、ローターを用いて4°C, 一晚転倒混和させることで、Glutathion sepharose 4B に結合したGSTから目的タンパク質を切断した。その後、180 G, 4°C, 1 min遠心分離し、目的タンパク質を含む上清を回収した。回収したタンパク質溶液はMini Dialysis Kit (GE healthcare)を用いてTED Buffer (pH 8.0) 3 L内4°C, 4 h以上透析する操作を3回繰り返した。その後、タンパク質溶液はAmicon Ultra (Millipore)を用いて限外ろ過を行い、目的タンパク質を濃縮した。タンパク質濃縮後、Bradford法により回収したタンパク質の濃度を測定した。その後、タンパク質を液体窒素で瞬間冷凍し、-80°Cディープフリーザー内で保存した。得られた精製タンパク質は*in vitro* binding assayに使用し、実験を行う直前に氷上で融解した。

#### 14. *in vitro* binding assay

Anti-Myc tag mAb magnetic beads (MBL) 25  $\mu$ Lに氷冷TED Buffer (pH 8.0) 1 mLを加え、転倒混和することでMagnetic beadsを平衡化した。Beads Separations (Invitrogen)を用いて磁力によりMagnetic beadsを1.5 mLチューブの壁面に吸着させながら上清を吸い取り、100 nM Myc融合精製タンパク質を含む氷冷TED Buffer (pH 8.0) 500  $\mu$ Lを加え、ローターを用いて4°C, 1 h転倒混和を行った。その後、Beads Separationsを用いてMagnetic beadsをチューブの壁面に吸着させながら上清を吸い取り、0.1% Nonidet P40 (NP-40, Nacalai)を含む氷冷TED Buffer (pH 8.0) 1 mLを加えて転倒混和することでMagnetic beadsを洗浄する操作を3回行った。洗浄後、上清を吸い取り、Preyとなる100 nM精製タンパク質を含む氷冷TED Buffer (pH 8.0) 500  $\mu$ Lを加え、ローターを用いて4°C, 1 h転倒混和を行った。その後、Beads Separationsを用いてMagnetic beadsをチューブの壁面に吸着させながら上清を吸い取り、0.1% NP-40 (Nacalai)を含む氷冷TED Buffer (pH 8.0) 1 mLを加えて転倒混和することでMagnetic beadsを洗浄する操作を3回行った。洗浄後、Beads Separationsを用いてMagnetic beadsをチューブの壁面に吸着させながら上清を吸い取り、2xSDS Sample Buffer 25  $\mu$ L加えて攪拌し、95°C, 5 minインキュベートした。得られたサンプルはウェスタンブロットティングに用いた。

#### 15. ウェスタンブロットティング

サンプルをポリアクリルアミドゲル(濃度8~15%)にローディングし、SDS-PAGEを行った後、ゲルをTransfer Buffer (200 mM Glycin, 100 mM Tris, 5% MeOH)に浸し、室温, 15 min振とうすることで平衡化した。その後、Trans Blot SD Semidry

Transfer Cell (Biorad)を用いてPVDF膜 (Millipore)に2 mA/cm<sup>2</sup>の電流を流し、タンパク質を転写した。転写後、PVDF膜を3%スキムミルク (Morinaga)を含むTBST Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)に浸し、室温, 1 h振とうすることでブロッキングした。ブロッキング後、3%スキムミルクを含むTBST Bufferで希釈した一次抗体にPVDF膜を浸し、4°C, 一晚抗体反応させた。抗体反応後、PVDF膜をTBST Bufferに浸して室温, 8 min振とうする操作を3回繰り返し、PVDF膜を洗浄した。次に、TBST Bufferで希釈した二次抗体にPVDF膜を浸し、室温, 1 h抗体反応させた。抗体反応後、PVDF膜をTBST Bufferに浸して室温, 8 min振とうする操作を3回繰り返し、PVDF膜を洗浄した。洗浄したPVDF膜をECL (GE healthcare)に浸し、その後X線フィルム (Fuji film)にタンパク質のシグナルを感光させて検出した。ウェスタンブロッティングに用いた抗体名、免疫動物、メーカー、希釈倍率は以下の通りである。

#### 一次抗体

抗体名	免疫動物と種類	メーカー	希釈倍率
Anti-shootin1	Rabbit, Polyclonal	当研究室にて作製	x500
Anti-shootin1a	Rabbit, Polyclonal	当研究室にて作製	x10000
Anti-shootin1b	Rabbit, Polyclonal	当研究室にて作製	x20000
Anti-myc-tag	Rabbit, Polyclonal	MBL	x2000
Anti-cortactin	Mouse, Monoclonal	Millipore	x1000
Anti-L1	Goat, Polyclonal	Santacruz	x1000
Anti-actin	Mouse, Monoclonal	Millipore	x10000

#### 二次抗体

抗体名	メーカー	希釈倍率
Goat anti-rabbit IgG HRP	Molecular Probe	x2000
Goat anti-mouse IgG HRP	Molecular Probe	x5000
Donkylt anti-goat IgG HRP	Molecular Probe	x2000

## 16. Migration assay

### 16-1. 野生型及びShootin1 KO神経細胞の細胞移動解析

材料と実験8-3の手順通りに脳室下帯組織片を培養してから16~34 h後に観察を開始した。観察前にMediumを2% B-27 supplement (Gibco), 1 mM Glutamine (Nacalai)を含むL-15 (Gibco) 2 mLに交換した。そして、予め37°Cに設定された顕微鏡のステージに装備されているインキュベーター内にガラスボトムディッシュを置いた。

撮影はEMCCDカメラiXon DU888 (Andor)を装備した倒立型顕微鏡IX81 (Olympus), 40倍対物レンズを用いた。画像は2 min間隔で180 min撮影した。取得した動画の定量解析にはImage J (NIH)を使用した。

#### 16-2. Shootin1ドミナントネガティブ体を発現させた神経細胞の細胞移動解析

材料と実験9-2の手順通りに過剰発現ベクターと蛍光タンパク質 (EGFP)発現ベクターを神経細胞に遺伝子導入してから 24~34 h後に観察を開始した。観察対象にはEGFP発現陽性の細胞を選んだ。観察前にMediumを2% B-27 supplement (Gibco), 1 mM Glutamine (Nacalai)を含むL-15 (Gibco) 2 mLに交換した。そして、予め37° Cに設定された顕微鏡のステージに装備されているインキュベーター内にガラスボトムディッシュを置いた。撮影にはEMCCDカメラ(iXon DU888, Andor)を装備した倒立型顕微鏡 (IX81, Olympus), 40倍対物レンズを用いた。画像は2 min間隔で180 min撮影した。それぞれのタイムポイントではZ軸方向に2 μm間隔で変えた3枚の画像を撮影した。取得した動画はZ軸方向の画像を重ね合わせ、Image Jを用いて定量解析した。

#### 17. 神経細胞移動におけるShootin1bの動態解析

材料と実験9-2の手順通りにmRFP融合Shootin1bとAcGFPの発現ベクターを神経細胞に遺伝子導入してから 24~34 h後に観察を開始した。観察前にMediumを2% B-27 supplement (Gibco), 1 mM Glutamine (Nacalai)を含むL-15 (Gibco) 2 mLに交換した。そして、予め37° Cに設定された顕微鏡のステージに装備されているインキュベーター内にガラスボトムディッシュを置いた。撮影にはEMCCDカメラ(iXon DU888, Andor)を装備した倒立型顕微鏡 (IX81, Olympus), 40倍対物レンズを用いた。画像は2 min間隔で120 min撮影した。それぞれのタイムポイントではZ軸方向に2 μm間隔で変えた3枚の画像を撮影した。取得した動画はZ軸方向の画像を重ね合わせ、Image J (NIH)を用いて定量解析した。

#### 18. 神経細胞移動における中心体と細胞核の動態解析

材料と実験9-2の手順通りにmRFP融合H2BとmNeonGreen融合Centrin2の発現ベクターを神経細胞に遺伝子導入してから 24~34 h後に観察を開始した。観察前にMediumを2% B-27 supplement (Gibco), 1 mM Glutamine (Nacalai)を含むL-15 (Gibco) 2 mLに交換した。そして、予め37° Cに設定された顕微鏡のステージに装備されているインキュベーター内にガラスボトムディッシュを置いた。撮影にはEMCCDカメラ(iXon DU888, Andor)を装備した倒立型顕微鏡 (IX81, Olympus), 40倍対物レンズを用いた。画像は4 min間隔で120 min撮影した。それぞれのタイムポイントではZ軸方向に2 μm間隔で変えた3枚の画像を撮影した。取得した動画

はZ軸方向の画像を重ね合わせ、Image J (NIH)を用いて定量解析した。

## 19. データの平滑化

図10cの先端突起の長さ及び図11bの中心体と細胞核間の距離のデータに関しては、ノイズによる変動を抑えるために平滑化を行った。 $t$ を時間、 $x(t)$ を時間 $t$ における先端突起の長さあるいは中心体-細胞核間の距離とした場合、平滑化後の値 $\bar{x}(t)$ は以下の計算式により算出した。

$$\bar{x}(t) = \frac{1}{5} \sum_{k=-2}^2 x(t+k)$$

## 20. 蛍光スペckル観察

### 20-1. XTC細胞の蛍光スペckル観察

mRFP融合ActinとAcGFP融合Shootin1bの発現ベクターを共発現したXTC細胞を蛍光スペckルの観察に用いた。培養フラスコ内で培養されているXTC細胞をTrypsin/EDTA (Sigma)を用いて回収し、PDLコートされたガラスボトムディッシュにまき、37°C, 30 minインキュベートすることで細胞をガラス面に接着させた。細胞がガラス面に接着後、MediumをL-15 (Gibco) 2 mLに交換した。そして、予め37°Cに設定された顕微鏡のステージに装備されているインキュベーター内にガラスボトムディッシュを置いた。撮影にはCMOSカメラORCA-Flash4.0 V2 (Hamamatsu)を装備した倒立型顕微鏡 (Axio observer Z.1, Zeiss), 100倍油浸対物レンズを用いた。画像は5 sec間隔で250 sec撮影した。アクチン重合阻害剤添加の実験では、観察開始から250 secの時点でCytochalasin D (Millipore)を終濃度1  $\mu$ Mとなるように添加し、観察を続けた。取得した動画の定量解析にはImage J (NIH)を使用した。

### 20-2. 神経細胞における蛍光スペckル観察

神経細胞の先端突起先端における逆行性移動の観察では、HaloTag融合アクチン、HaloTag融合Shootin1b, HaloTag融合Cortactinの発現ベクターをそれぞれ単独に遺伝子導入してから 24~34 h後に観察を開始した。Shootin1ドミナントネガティブ体を過剰発現させた細胞における逆行性移動の観察では、HaloTag融合アクチンと過剰発現ベクターを神経細胞に遺伝子導入してから24~34 h後に観察を開始した。HaloTag融合タンパク質の逆行性移動を観察する場合は、MediumにHaloTag TMR ligand (Promega)を終濃度2.5  $\mu$ Mとなるように添加し、37°C, 1 hインキュベートした。観察前にMediumを2% B-27 supplement (Gibco), 1 mM Glutamine (Nacalai)を含むL-15 (Gibco) 2 mLに交換し、予め37°Cに設定された顕微鏡のステージに装備されているインキュベーター内にガラスボトムディッシュを置いた。撮影にはCMOSカメラORCA-Flash4.0 V2 (Hamamatsu)を装備した倒立型顕微鏡 Axio

observer Z.1 (Zeiss), 100倍油浸対物レンズ を用いた。画像は3 sec間隔で150 sec撮影した。取得した動画はImage J (NIH)を用いて編集した。

## 21. Traction force microscopy

### 21-1. 蛍光ビーズを埋め込んだアクリルアミドゲルの作製

直径27 mmのガラスボトムディッシュ (Matsunami)に100 mM NaOH 800  $\mu$ Lを加え、室温, 15 min静置した。次に、3-Aminopropyltrimethoxysilane (Sigma) 50  $\mu$ Lを添加し、室温, 15 min静置した。その後、MilliQでガラスボトムディッシュを洗浄し、乾燥させた後、0.5% Glutaraldehyde (Sigma) 250  $\mu$ Lを加え、室温, 30 min静置することで、ガラスとアクリルアミドゲルの接着を強固にする活性化処理を施した。その後、MilliQでガラスボトムディッシュを洗浄した。次に、3.75% Acrylamide (Nacalai), 0.03% N', N'-Methylenebisacrylamide (Nacalai), 0.08% 0.2  $\mu$ m Fluorescent microsphere 580/605 (Molecular probe)を含む500  $\mu$ Lのアクリルアミド溶液を調整し、デシケーターで脱気した。10% Ammonium Persulfate (APS (Plus-one)) 1  $\mu$ Lと Tetramethylethylenediamine (TEMED, Nacalai) 1  $\mu$ Lをアクリルアミド溶液に加え、よくピペッティングした後、直径18 mmのカバースリップ (Matsunami)にアクリルアミド溶液25.2  $\mu$ Lを滴下した。滴下した溶液の上に活性化処理を施したガラスボトムディッシュを被せることで、アクリルアミド溶液がカバースリップ全体に広がり、ガラスボトムディッシュを逆さまの状態に1 h静置して溶液を重合させることにより、厚さ100  $\mu$ mのアクリルアミドゲルを作製した。その後、ガラスボトムディッシュにMilliQを加え、カバースリップをニードルとピンセットを用いてアクリルアミドから引きはがした。次に、1 mM Sulfo-SAMPAH 70  $\mu$ Lをゲルに滴下し、ガラスボトムディッシュをUVランプから15 cmの距離に5 min置き、アクリルアミドゲルにコーティングを施せるよう活性化処理した。活性化処理後、PBS (pH 7.4)でアクリルアミドゲル表面を洗浄し、材料と実験5の手順通りにL1-Fcコートをした。

### 21-2. Traction forceの計測

L1-Fcコートしたアクリルアミドゲル上で材料と実験8-3の手順通りに脳室下帯組織片を培養してから16~23 h後に観察を開始した。観察前にMediumを2% B-27 supplement (Gibco), 1 mM Glutamine (Nacalai)を含むL-15 (Gibco) 2 mLに交換した。そして、予め37°Cに設定された顕微鏡のステージに装備されているインキュベーター内にガラスボトムディッシュを置き、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710, Zeiss)、63倍水浸対物レンズ を使用して30 sec間隔で25 min撮影した。

## 22. 移植した嗅球抑制性神経細胞の細胞移動解析

### 22-1. マウス脳室下帯への細胞移植

生後2-5日目マウスの全脳をL-15 (Gibco)に回収した。マニーオフサルミックナイフ ストレート15° (Mani)を用いて脳室下帯を摘出し、室温、30 sec遠心分離した後、上清を吸い取り、予め37°Cに温めておいたTrypsine/EDTA 200  $\mu$ Lを加え、室温、10 minインキュベートした。室温、30 sec遠心分離を行い、上清を吸い取った後、10% FBSとDNase Iを含むDMEM 200  $\mu$ Lを加え、40回ピペッティングを行い、組織片の細胞を分散した。得られた細胞懸濁液は滅菌フィルター (20  $\mu$ m)に通した。その後、細胞懸濁液を室温、30 sec遠心分離して上清を吸い取り、DNase Iを含むDMEM 200  $\mu$ Lを加え再懸濁する操作を2回繰り返した。その後、室温、30 sec遠心分離して上清を吸い取り、PKH Linker Kit (Sigma)のDiluent C 200  $\mu$ Lに再懸濁して30 sec遠心分離した。上清を吸い取り、1  $\mu$ M PKH-26あるいはPKH-67を含むDiluent C 200  $\mu$ Lに再懸濁して室温、5 minインキュベートした。その後、FBS 400  $\mu$ Lを加えて蛍光標識反応を止めた。そして、室温、30 sec遠心分離して上清を吸い取り、DNase Iを含むDMEM 200  $\mu$ Lを加え再懸濁する操作を2回繰り返した。その後、室温、30 sec遠心分離して上清を吸い取り、2% B-27 supplement (Gibco), 1 mM Glutamine (Nacalai)を含むL-15 (Gibco) 6~10  $\mu$ Lに再懸濁した。次に、麻酔下の生後8日目ICR仔マウスの頭蓋骨にドリルで穴を開けた。細胞懸濁液2  $\mu$ Lを直径50  $\mu$ mのガラスマイクロピペットに移し、頭蓋骨に開けた穴に刺して、油圧ポンプを用いて細胞懸濁液を脳室下帯に射出した。射出後、頭部を縫合し、仔マウスを37°Cに温めたホットプレートに置いて、麻酔から目覚めさせた。その後、仔マウスを母親マウスの元に戻し、2日間飼育した。

### 22-2. 固定サンプルにおける神経細胞移動の解析

細胞移植された仔マウスを麻酔で眠らせた後、PBSを心臓から灌流して血液を抜き、続いて4% Paraformaldehydeを灌流して固定した。その後、仔マウスの頭部を切断し、頭蓋骨を切開して脳を露出させながら、4% Paraformaldehydeで室温、一晩、後固定した。固定後、脳を取り出し、ビブラトーム (VT1200 S, Leica)を用いて厚さ50  $\mu$ mの矢状切片を作製した。撮影には共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Zeiss), 20倍対物レンズを用いた。取得した画像の定量解析にはImage J (NIH)を使用した。

### 22-3. タイムラプス観察による神経細胞移動の解析

Millicell insert (Millipore)を2% B-27 supplement, 1 mM Glutamineを含むNeurobasal medium (Gibco) 2 mLが入ったガラスボトムディッシュ内に置きインキュベートした(37°C, CO<sub>2</sub> 5%)。次に、細胞移植された仔マウスの脳を取り出し、4% Low melting アガロースゲルに埋めた。その後、ビブラトーム (VT1200 S, Leica)を用いて厚さ

200  $\mu\text{m}$ の矢状切片を作製した。得られた矢状切片をMillicell insert (Millipore)にのせた。観察には共焦点レーザー顕微鏡(LSM710, Zeiss), 20倍対物レンズを用いた。37°C, 5% CO<sub>2</sub>下で矢状切片を培養しながら、画像を6 min間隔で8~14 h撮影した。それぞれのタイムポイントではZ軸方向に8~10  $\mu\text{m}$ 間隔で変えた10枚の画像を撮影した。取得した動画の定量解析にはImage J (NIH)を使用した。

### 23. 有意差検定

有意差検定にはExcel (Microsoft)を用いた。最初にf-testを行い、比較するデータ群の分散が等しいかどうかを調べた。f-testの結果、等分散であった場合はStudent's *t*-test、不等分散であった場合はWelch's *t*-testにより有意差検定を行った。



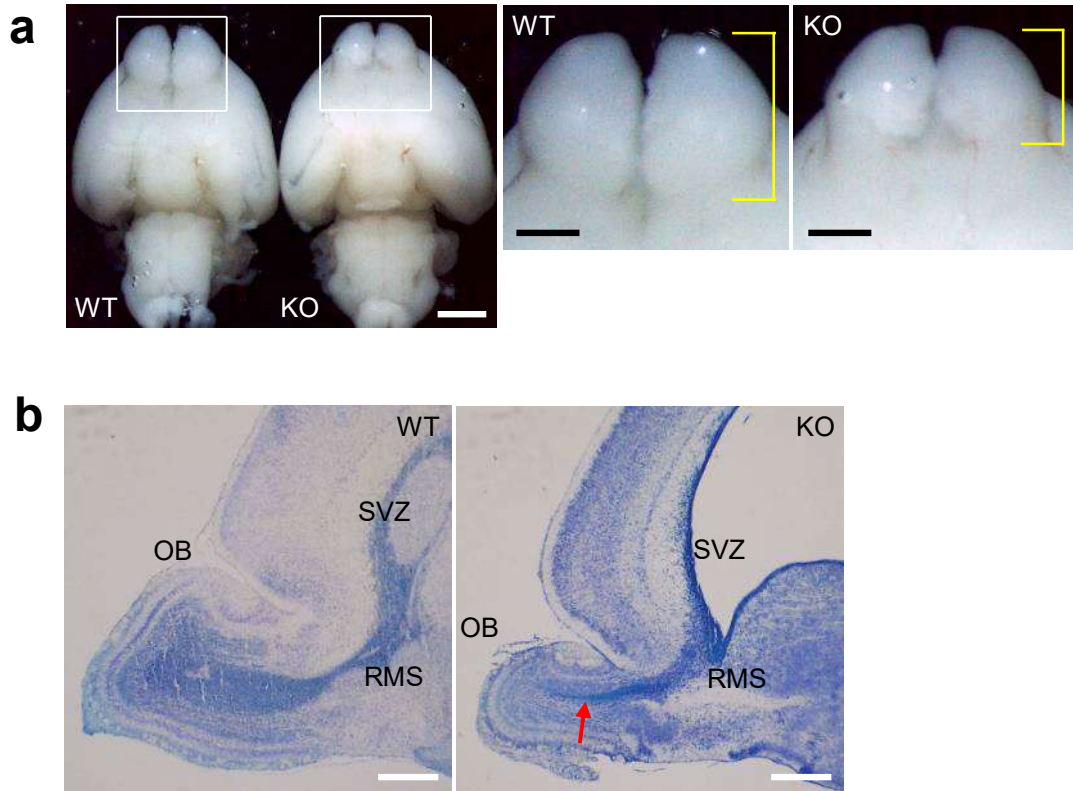
## <結果>

### **Shootin1 の欠損は嗅球の形成不全と嗅球神経細胞の異所的な分布を引き起こす**

脳形成におけるShootin1の機能を解析するために、当研究室はShootin1遺伝子欠損 (Shootin1 KO)マウスを作製した。先行研究において、生後0日目Shootin1 KOマウスの35%は嗅球の無形性を示すことが報告された<sup>33</sup>。一方、Shootin1 KOマウスの65%は、生後0日目において正常な嗅球の形態を示したが<sup>33</sup>、本研究では新たに、生後5日目の嗅球の無形性を示す個体を除いた20%は、野生型と比較して嗅球が小さいことを見出した (図4a, n = 60 pups)。今後、本稿では嗅球の無形性を示す個体を表現型Severe、嗅球の大きさ減少を示す個体を表現型Mildと呼ぶ。Nissl染色による生後0日目Shootin1 KOマウスの脳構造解析により、表現型Severeは吻側細胞移動経路の無形性と脳室下帯に異常な細胞の蓄積を示すことが報告された<sup>34</sup>。一方、表現型Mildは嗅球内の吻側移動経路で細胞数の減少を示した (図4b, 矢印)。次に、僧帽細胞マーカー抗Tbr2抗体を用いてShootin1 KOマウスにおける僧帽細胞層を調べた<sup>35</sup>。僧帽細胞は丸く大きい細胞核が特徴である (図5a, 黄枠内の矢頭)<sup>35</sup>。表現型Severeは、この特徴を示すTbr2陽性細胞が僧帽細胞層を形成せず (図5a, 矢印)、また、異所的な凝集を示した (図5a, 星印)。一方、表現型Mildは軽度な僧帽細胞層の形成不全を示した (図5b, 矢印)。これらの結果は、Shootin1が嗅球形成と嗅球神経細胞の細胞移動に関与する可能性を示唆している。

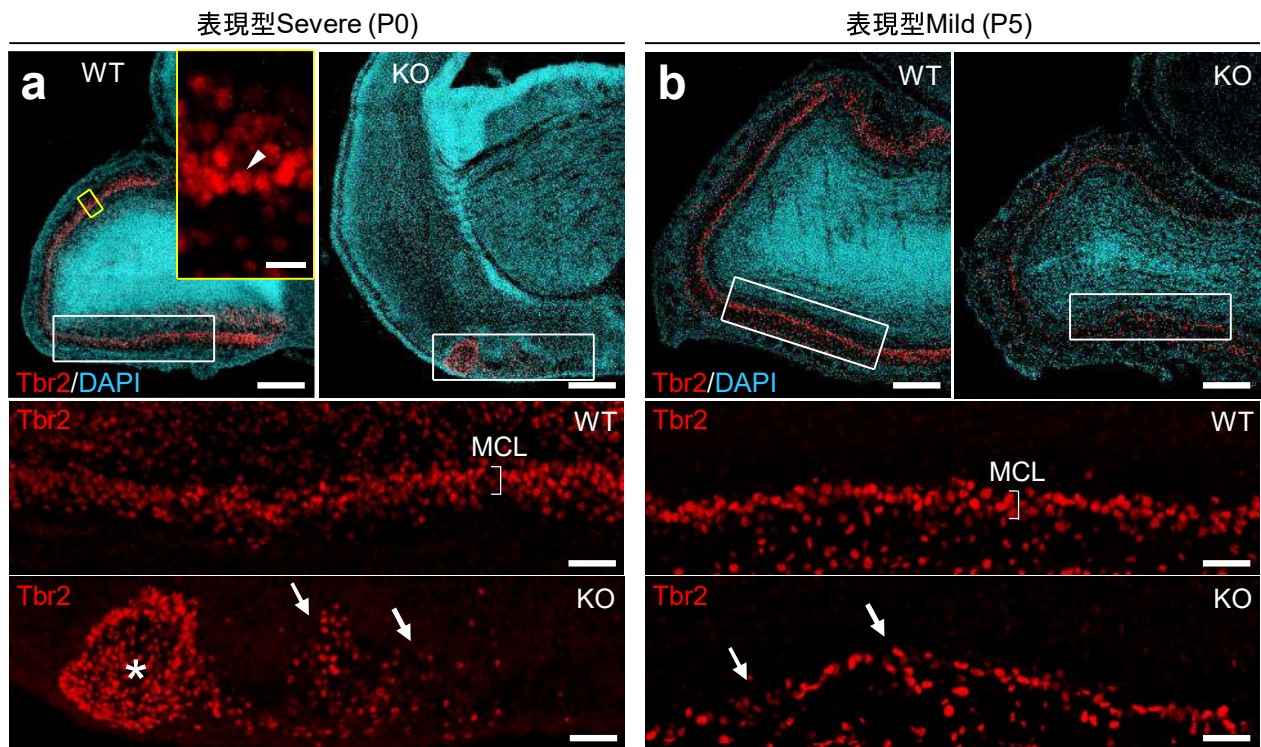
### **Shootin1b は嗅球抑制性神経細胞の先導突起先端部の成長円錐に濃縮する**

Shootin1遺伝子はShootin1aとそのスプライシングアイソフォームであるShootin1bを発現する<sup>31</sup>。これまでに、当研究室はそれぞれのタンパク質を認識する抗Shootin1a抗体及び抗Shootin1b抗体を作製した (図3)。本研究では、これらの抗体の特異性を確かめるために、胎生18日目マウス脳ライセートを用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、抗Shootin1a抗体、抗Shootin1b抗体はそれぞれShootin1a (~60 kDa)、Shootin1b (~87 kDa)を特異的に認識することがわかった (図6a)。これらの抗体を用いて脳内におけるShootin1a及びShootin1bの発現パターンが解析されたところ、Shootin1bは脳室下帯、吻側細胞移動経路および嗅球内部に伸びる吻側移動経路内で検出された<sup>34</sup>。一方、Shootin1aの発現は僧帽細胞層を含む嗅球の外側領域で検出されたが、嗅球抑制性神経細胞の移動経路内では検出されなかった<sup>34</sup>。この結果と一致して、生後5日目マウスの脳室下帯から採取した嗅球抑制性神経細胞マーカーDoublecortin陽性細胞内においてShootin1bの発現が検出されたが (図6b, 上)、Shootin1aの発現は検出できなかった (図6b, 下)。次



**図4. 表現型Mildを示すShootin1 KOマウスの嗅球及びその構造**

(a) 生後5日目における野生型 (Wild type; WT)及びShootin1 KO (KO)マウス脳の下面図 (左)。Bar, 2 mm。白枠で囲まれる領域は拡大図として右に示される。括弧は嗅球の大きさを示す。Bars, 1 mm。  
 (b) 生後5日目における野生型 (WT)及びShootin1 KO (KO)マウスの矢状脳切片のNissl染色。嗅球 (Olfactory bulb; OB)、吻側移動経路 (RMS)、脳室下帯 (SVZ)。矢印は野生型と比較して細胞数が減少した嗅球内のRMS領域を示す。Bars, 400  $\mu$ m。



### 図5. Shootin1 KOマウスにおける僧帽細胞層

(a) 僧帽細胞マーカーの抗Tbr2抗体 (赤)及びDAPI (シアン)を用いた生後0日目 (Postnatal day 0, P0)における野生型 (WT)及び表現型Severeを示すShootin1 KO (KO)マウスの矢状脳切片の免疫組織染色。Bars, 200  $\mu$ m。黄枠は拡大図として野生型の染色画像の右上に示される。矢頭は僧帽細胞の特徴である大きく丸い核を持つTbr2陽性細胞を示す。Bar, 20  $\mu$ m。白枠で囲まれる領域は拡大図として下に示される。括弧は僧帽細胞層 (MCL)を示す。矢印は僧帽細胞層の形成不全、星印は異所的な僧帽細胞の凝集を示す。Bars, 50  $\mu$ m。(b) 抗Tbr2抗体 (赤)及びDAPI (シアン)を用いた生後5日目 (P5)における野生型 (WT)及び表現型Mildを示すShootin1 KO (KO)マウスの矢状脳切片の免疫組織染色。Bars, 200  $\mu$ m。白枠で囲まれる領域は拡大図として下に示される。括弧は僧帽細胞層 (MCL)を示す。矢印は軽度な僧帽細胞層の形成不全を示す。

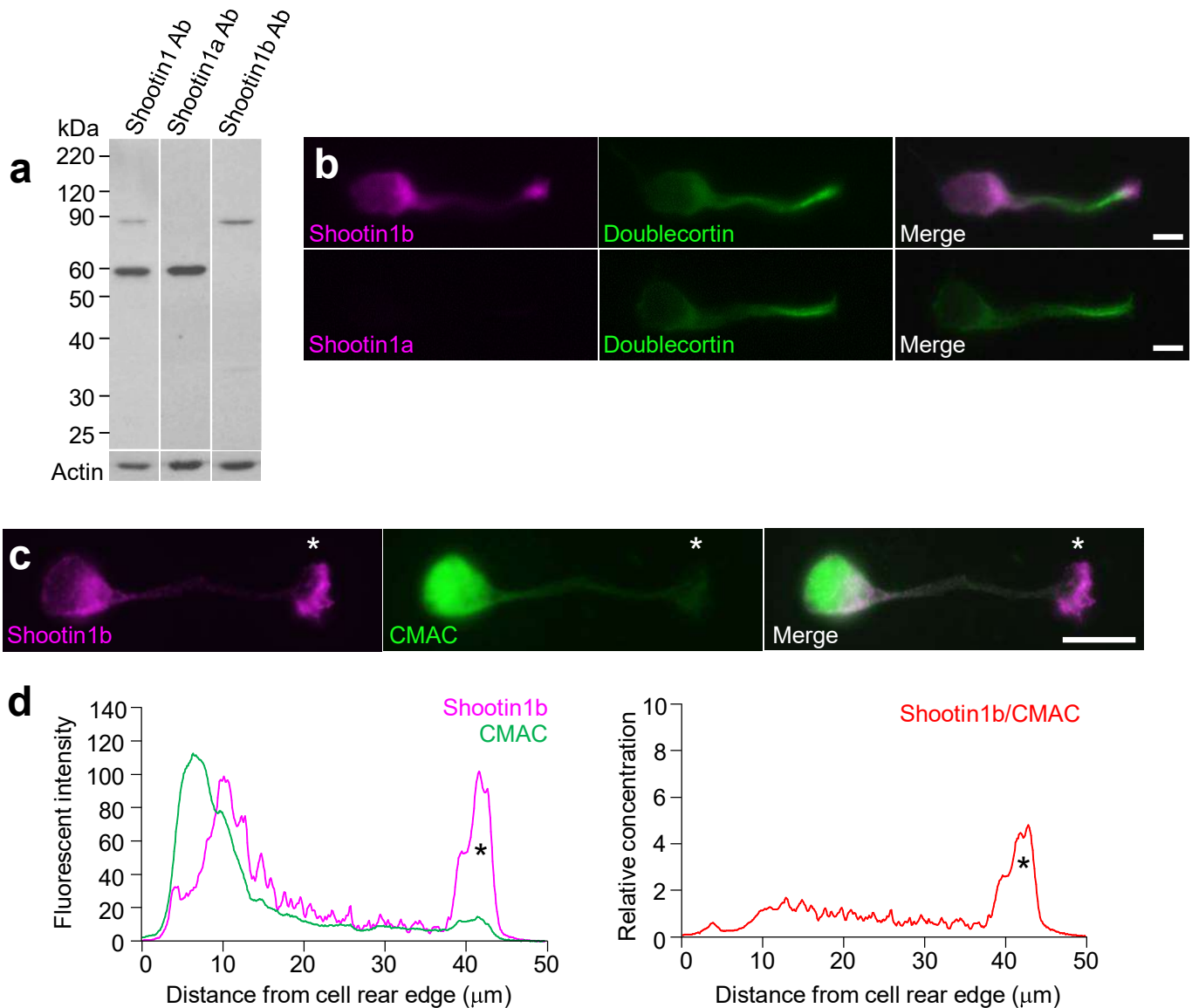


図6. 嗅球抑制性神経細胞におけるShootin1の発現

(a)胎生18日目マウス脳ライセートを用いたウエスタンブロッティングによる抗Shootin1a抗体 (中央レーン)、抗Shootin1b抗体 (右レーン)の特異性の確認。抗Actin抗体はローディングコントロールとして用いた (下)。抗Shootin1抗体 (左レーン)はShootin1a (~60 kDa)とShootin1b (~87 kDa)を認識する。(b) 抗Shootin1b抗体 (マゼンタ, 上)、抗Shootin1a抗体 (マゼンタ, 下)及び嗅球抑制性神経細胞マーカー抗Doublecortin抗体 (緑)を用いた生後5日目野生型マウス脳室下帯由来の嗅球抑制性神経細胞の培養2日目 (2 days *in vitro*; DIV2)における免疫細胞染色。Bars, 10  $\mu\text{m}$ 。(c) 抗Shootin1b抗体 (マゼンタ)、及びボリュームマーカーCMAC (緑)を用いた生後5日目野生型マウス脳室下帯由来の嗅球抑制性神経細胞のDIV2における免疫細胞染色。Bars, 10  $\mu\text{m}$ 。星印は成長円錐を示す。(d) (c)で示される細胞の細胞体後端から成長円錐先端までのShootin1b (マゼンタ)及びCMAC (緑)の蛍光輝度のラインスキャン (左)。CMAC (緑)の蛍光輝度に対するShootin1bの蛍光輝度の比率より (Shootin1b/CMAC)、嗅球抑制性神経細胞内における内在性Shootin1bの相対濃度を求めた (右)。星印は成長円錐の位置を示す。

に、嗅球抑制性神経細胞内におけるShootin1bの局在部位を調べた。この実験では、先導突起と細胞体における細胞の厚さの違いを補正するため、チオール反応性蛍光プローブのCMAC (7-amino-4-chloromethylcoumarin)をボリュームマーカースとして用いた。CMACと抗Shootin1b抗体を用いて免疫細胞染色を行い (図6c)、細胞後端から成長円錐先端まで細胞の中心を通る線上のCMAC及びShootin1bの蛍光輝度を計測した (図6d, 左)。CMACとShootin1bの蛍光強度の比より (Shootin1b/CMAC)、Shootin1bの相対濃度を算出した (図6d, 右)。その結果、Shootin1bの相対濃度は細胞体から先導突起にかけてほぼ一定であったが、先導突起の先端部の成長円錐<sup>20</sup>でピークが検出された (図6d, 星印)。これらの結果は、Shootin1bが嗅球抑制性神経細胞で発現し、先導突起先端部の成長円錐に濃縮することを示している。

### Shootin1b は嗅球形成に重要な嗅球抑制性神経細胞の細胞移動に関与する

生後において嗅球抑制性神経細胞は、脳室下帯で生まれ、吻側移動経路内を細胞移動して嗅球に到達する<sup>12</sup>。脳内における細胞移動の解析が容易であるため、脳室下帯由来の嗅球抑制性神経細胞は神経細胞移動の研究によく用いられる<sup>14-17</sup>。本研究は、神経細胞移動におけるShootin1bの機能を調べるために、脳内におけるShootin1 KO嗅球抑制性神経細胞の細胞移動の解析を行った。具体的には、生後2-5日目の野生型及びShootin1 KOマウスの脳室下帯より嗅球抑制性神経細胞を採取し、細胞膜を蛍光標識するPKH-26とPKH-67を用いて野生型 (図7, 上段, マゼンタ)及びShootin1 KO (図7, 上段, 緑)嗅球抑制性神経細胞をそれぞれ異なる色に染めた。蛍光染色した細胞は、生後7-8日目の野生型マウスの脳室下帯に移植した。移植2日後、脳の矢状切片を作製し、脳内の蛍光標識された嗅球抑制性神経細胞の細胞移動を観察した。最初に、Hoechstで細胞核を染色した固定矢状脳切片を用いて、蛍光標識された嗅球抑制性神経細胞の吻側移動経路-嗅球間の分布を調べた (図8a)。Hoechst染色の濃淡から脳室下帯から嗅球までの領域をOB outer (嗅球外部), OB-RMS (嗅球-吻側細胞移動経路), RMSa (吻側移動経路前部), RMSp (吻側移動経路後部)の4領域に分け、各領域における蛍光標識された神経細胞の割合を求めた。その結果、OB outer (WT,  $22.1 \pm 1.3\%$ ; KO,  $13.5 \pm 0.6\%$ ,  $P < 0.01$ )及びOB-RMS (WT,  $35.9 \pm 3.3\%$ ; KO,  $29.8 \pm 3.5\%$ ,  $P < 0.02$ )では野生型細胞の割合が多く、RMSa (WT,  $32.0 \pm 4.0\%$ ; KO,  $41.9 \pm 4.6\%$ ,  $P < 0.01$ )及びRMSp (WT,  $10.0 \pm 1.6\%$ ; KO,  $14.9 \pm 1.3\%$ ,  $P < 0.05$ )ではShootin1 KO細胞の割合が多かった。即ち、嗅球に到達したShootin1 KO嗅球抑制性神経細胞の割合は野生型と比べて有意に減少することがわかった (図8b, WT,  $n = 1656$  cells; KO,  $n = 1627$  cells)。本研究ではさらに、吻側移動経路内における野生型及びShootin1 KO嗅球抑制性神経細胞の細胞移動をタイムラプス

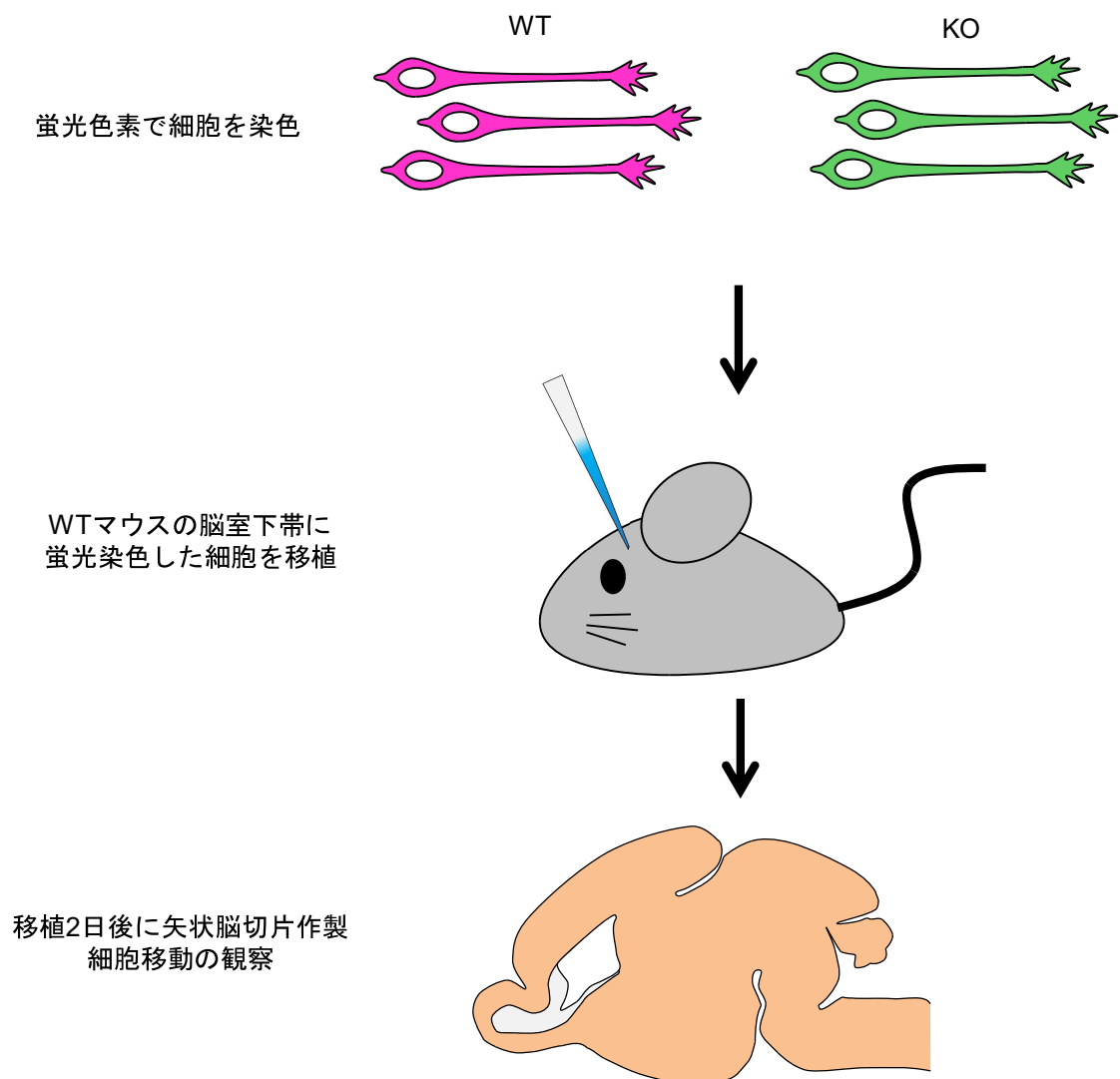


図7. 脳内の神経細胞移動を解析するために行った移植実験の概略図

最初に、生後2-5日目のマウス脳室下帯より嗅球抑制性神経細胞を採取し、長鎖脂肪酸を持つ蛍光色素 (PKH)を用いて野生型 (WT, マゼンタ)とShootin1 KO (KO, 緑) 嗅球抑制性神経細胞の細胞膜を染色した。蛍光染色した細胞は、生後7-8日目の野生型マウスの脳室下帯に移植した。移植2日後、移植されたマウスの矢状脳切片を作製し、神経細胞移動を解析した。

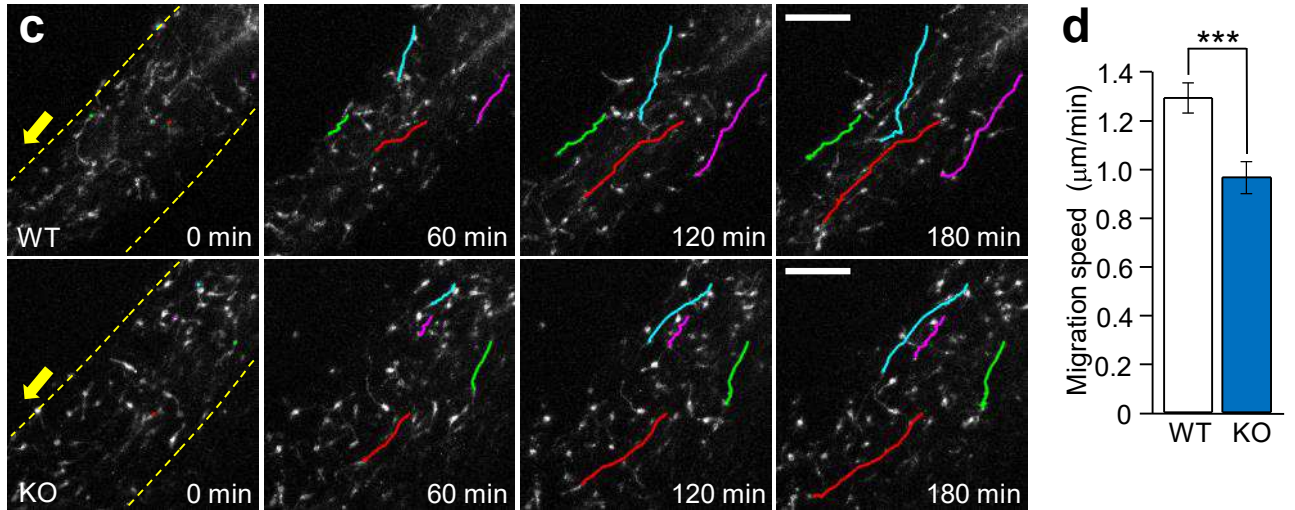
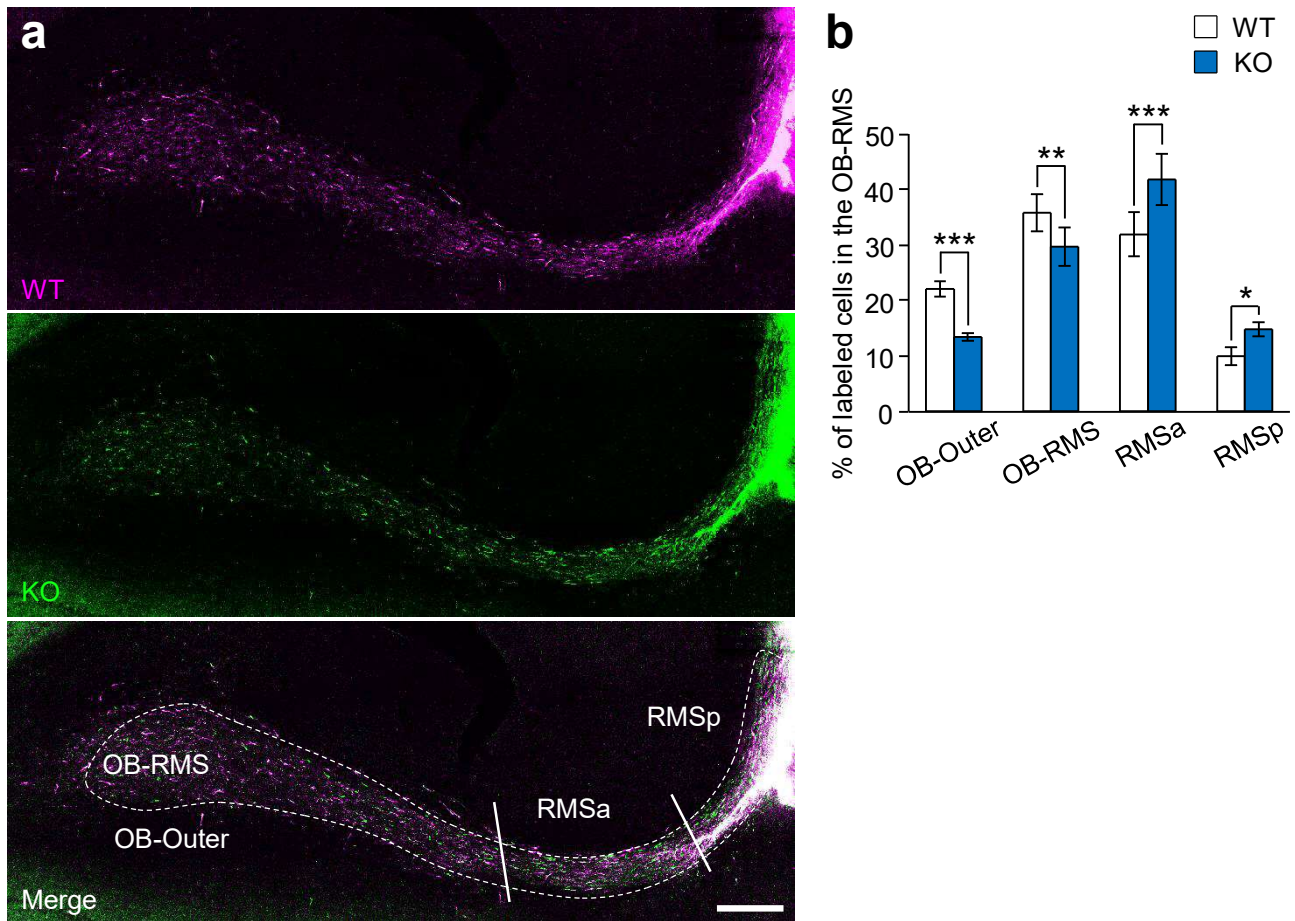


図8. 野生型マウスの脳内に移植されたShootin1 KO嗅球抑制性神経細胞の細胞移動の解析

(a) 固定された同一個体の矢状脳切片内における野生型 (WT, マゼンタ) 及びShootin1 KO (KO, 緑) 嗅球抑制性神経細胞の細胞移動の解析。嗅球抑制性神経細胞が分布する領域を吻側移動経路後部 (RMSp)、吻側移動経路前部 (RMSa)、嗅球-吻側移動経路 (OB-RMS)、嗅球外部 (OB-outer) に分類した。Bars, 400  $\mu$ m。 (b) 吻側移動経路と嗅球内における蛍光標識された野生型 (WT) 及びShootin1 KO (KO) 嗅球抑制性神経細胞の分布の定量解析。蛍光標識された細胞の数を(a)で分類される領域内で数え、各領域に分布する細胞の割合を算出した。WT, n = 1656 cells; KO, n = 1627 cells。データはMean  $\pm$  SEMで示される。\* P < 0.05, \*\* P < 0.02, \*\*\* P < 0.01。 (c) 異なる個体に移植された野生型 (WT) 及びShootin1 KO (KO) 嗅球抑制性神経細胞の吻側移動経路内における細胞移動のタイムラプス観察。撮影は8 min間隔で8-14 h行った。パネル内の数字は分数を示す。嗅球抑制性神経細胞の移動経路は線 (赤, マゼンタ, 緑, シアン) で示される。矢印は嗅球の方向、破線は吻側移動経路を示す。Bars, 100  $\mu$ m。 (d) 移植された野生型 (WT, マゼンタ) 及びShootin1 KO (KO, 緑) 嗅球抑制性神経細胞の吻側移動経路内における細胞移動速度の定量解析。WT, n = 37 cells; KO, n = 27 cells。データはMean  $\pm$  SEMで示される。\*\*\* P < 0.01。

観察した (図8c)。細胞移動速度を計測したところ、Shootin1 KO嗅球抑制性神経細胞の移動速度が野生型と比べて有意に減少した (図8d, WT,  $1.28 \pm 0.06 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $n = 31$  cells; KO,  $0.96 \pm 0.06 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $n = 27$  cells,  $P < 0.01$ )。以上の結果より、Shootin1bが嗅球形成に重要な嗅球抑制性神経細胞の細胞移動に関与することが示された。

### Shootin1bが成長円錐の前進を促進し、先導突起を伸長させることで細胞移動を推進する

抑制性神経細胞は先導突起の伸長、中心体の前方移動、細胞体の牽引のサイクルを繰り返して細胞移動する。Shootin1bが細胞移動のどのステップに関与するかを調べるために、培養嗅球抑制性神経細胞を用いたmRFP融合Shootin1bのライブイメージングを行った。mRFP融合Shootin1bの蛍光輝度とボリュームマーカールAcGFPの蛍光輝度の比より神経細胞内のShootin1bの相対濃度を算出し、疑似カラーで表した (図9a)。Shootin1bは成長円錐内で濃縮と消失を繰り返し、それに伴って成長円錐が前進、後退することがわかった (図9a')。続いて、Shootin1bの相対濃度に対する成長円錐の前進速度を定量したところ、先導突起の先端におけるShootin1bの相対濃度と成長円錐の前進速度には相関関係がみられた (図9b,c,  $n = 8$  cells)。この結果は、Shootin1bの成長円錐内における濃縮が成長円錐の前進を促進し、先導突起を伸長させることを示唆している。

次に、Shootin1 KOによる移動障害をより詳細に検証するため、*in vitro*環境下における嗅球抑制性神経細胞の細胞移動をライブイメージングにより解析した。野生型及びShootin1 KO嗅球抑制性神経細胞は共にマトリゲル内で先導突起の伸長と細胞体の牽引を繰り返す跳躍運動を示したが (図10a)、*in vivo*の結果と一致して (図8d)、Shootin1 KO嗅球抑制性神経細胞の移動速度は有意に減少した (図10b, WT,  $0.35 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $n = 31$  cells; KO,  $0.22 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $n = 38$  cells,  $P < 0.01$ )。また、成長円錐の移動、細胞体の牽引、細胞移動に伴う先導突起の長さ変化に関して解析を行った (図10c)。Shootin1 KO嗅球抑制性神経細胞では、先導突起の平均長さ (図10d, WT,  $38.2 \pm 2.4 \mu\text{m}$ ; KO,  $31.0 \pm 1.3 \mu\text{m}$ ,  $P < 0.02$ )と成長円錐の前進速度 (図10e, WT,  $1.25 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ ; KO,  $0.92 \pm 0.04 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P < 0.01$ )が減少した。これらの結果は、Shootin1bが成長円錐の前進を促進する結果 (図9b)と一致する。興味深いことに、Shootin1 KO嗅球抑制性神経細胞では成長円錐の後退速度の減少も見られた (図10f, WT,  $1.15 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ ; KO,  $0.89 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P < 0.01$ )。先導突起の長さは、成長円錐の前進による伸長 (図10g, 下, 青矢頭から赤矢頭)と成長円錐の後退及び細胞体の牽引による退縮 (図10g, 下, 赤矢頭から青矢頭)によって周期的に変化する (図10g)。先導突起の伸縮頻度 (赤矢頭及び青矢頭の個数)は、野生型及びShootin1 KO嗅球抑制性神経細胞の間で顕著な差は見られなかったが



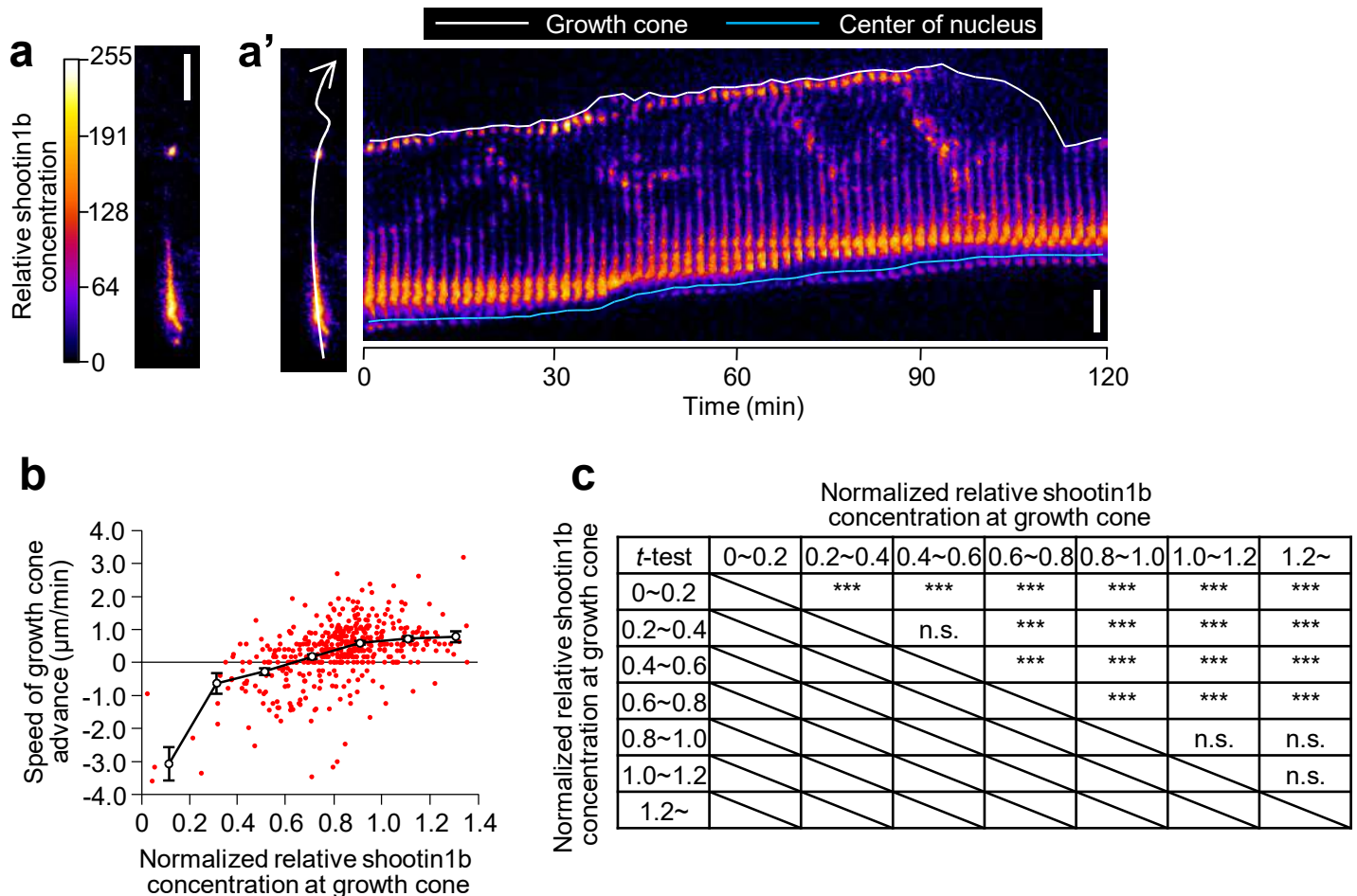


図9. 成長円錐内におけるShootin1bの相対濃度と成長円錐の前進速度の関係性

(a) mRFP融合Shootin1bとボリュームマーカ―AcGFPを共発現させた生後5日目マウス脳室下帯由来嗅球抑制性神経細胞の細胞移動のタイムラプス観察。撮影は2 min間隔で2 h行った。疑似カラー(fire)はAcGFPの蛍光輝度に対するmRFP融合Shootin1bの蛍光輝度の比率を表す(左)。Bar, 20  $\mu\text{m}$ 。(a') (a)で示される細胞の移動経路(左, 矢印)に沿ってキモグラフを作成した(右)。キモグラフにおける白線は成長円錐、シアン線は細胞核の中心の位置を示す。Bar, 20  $\mu\text{m}$ 。(b) 成長円錐におけるShootin1bの相対濃度に対する成長円錐の前進速度のプロット(赤)。各細胞におけるShootin1bの相対濃度を統一するため、細胞体における相対濃度の平均値を基準に成長円錐における相対濃度を標準化した。Shootin1bの相対濃度を0.2毎の画分に分け、その画分内で成長円錐の前進速度の平均値と標準誤差を算出した(白)。n = 8 cells。(c) Shootin1bの相対濃度の各画分に対して、成長円錐の前進速度の有意差検定(*t*-test)を総当たりで行った。\*\*\*  $P < 0.01$ , n.s., no significant difference.

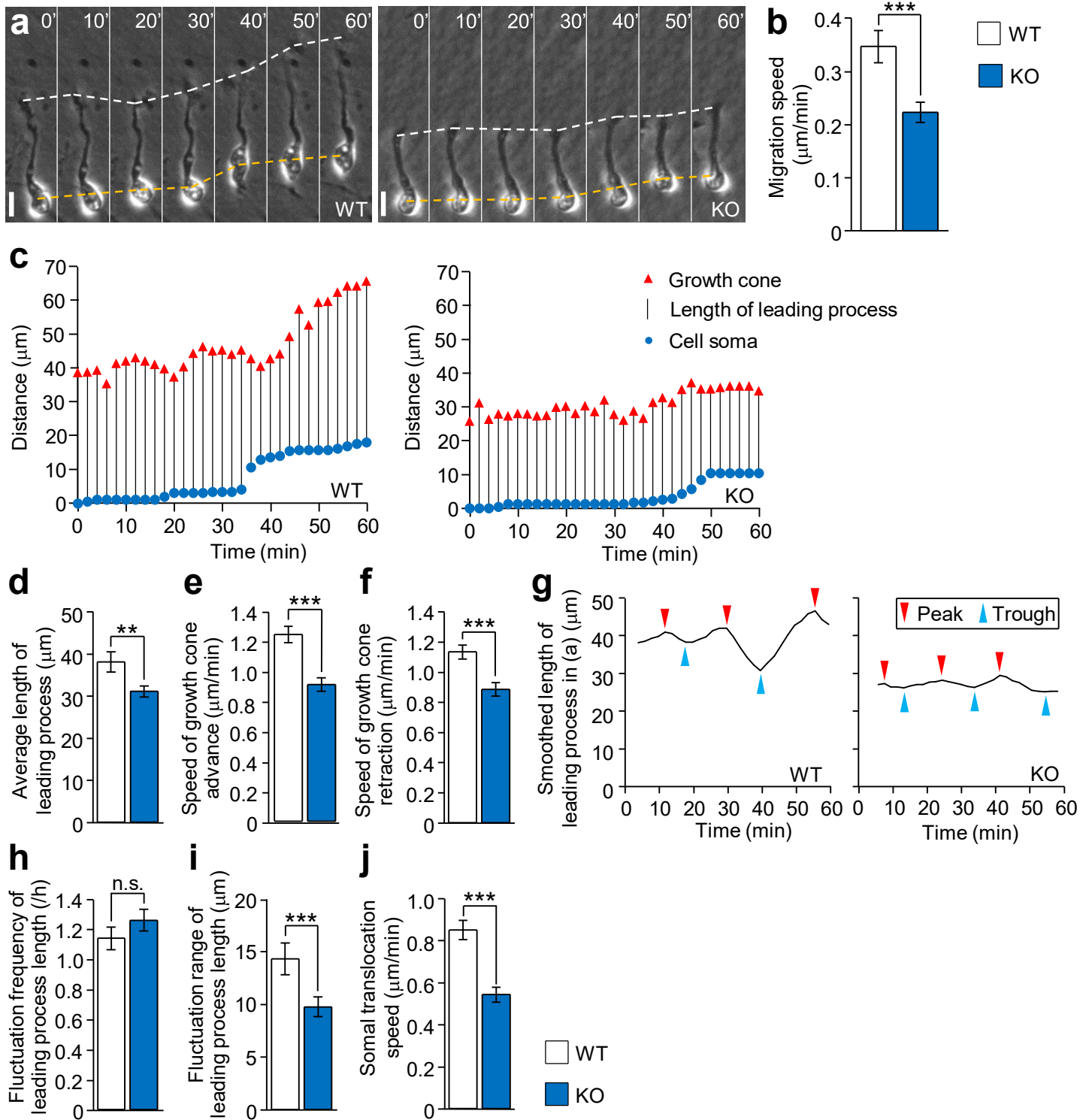


図10. マトリゲル内におけるShootin1 KO嗅球抑制性神経細胞の細胞移動の解析

(a) マトリゲル内における生後5日目マウス脳室下帯由来の野生型 (WT)及びShootin1 KO (KO)嗅球抑制性神経細胞の細胞移動のタイムラプス観察。撮影は2 min間隔で3 h行った。パネル内の数字は分数を示す。Bars, 10  $\mu\text{m}$ 。白破線は成長円錐、黄破線は細胞体の中心を示す。(b) 野生型 (WT)及びShootin1 KO (KO)嗅球抑制性神経細胞の細胞移動速度の定量解析。(c) (a)で示される野生型 (WT)及びShootin1 KO (KO)嗅球抑制性神経細胞における時間に対する成長円錐の位置(赤)、先端突起の長さ(黒線)、細胞体の位置(青)の時間に対するプロット。(d-f) 野生型 (WT)及びShootin1 KO (KO)嗅球抑制性神経細胞における先端突起の平均長さ(d)、成長円錐の前進速度(e)及び後退速度(f)。(g) (a)で示される野生型 (WT)及びShootin1 KO (KO)嗅球抑制性神経細胞の時間に対する平滑化を施した先端突起の長さのプロット。先端突起の長さは、連続する5フレーム間の平均値を算出することで平滑化した。周期的な先端突起の長さ変化における極大値を赤矢頭、極小値を青矢頭で示す。(h-j) 周期的な先端突起の長さ変化における極大値と極小値より求めた先端突起の伸縮頻度(h)、及び突起長の伸縮幅(i)、細胞体の牽引速度(j)。WT, n = 31 cells; KO, n = 38 cells。データはMean  $\pm$  SEMで示される。 \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.01, n.s., no significant difference.

(図10h, WT,  $1.11 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ ; KO,  $1.25 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ ,  $P = 0.18$ )、突起長の伸縮幅 (赤矢頭-青矢頭間の距離)はShootin1 KO嗅球抑制性神経細胞で減少した (図10i, WT,  $14.2 \pm 1.6 \mu\text{m}$ ; KO,  $9.7 \pm 0.9 \mu\text{m}$ ,  $P < 0.01$ )。さらに、Shootin1 KO嗅球抑制性神経細胞は、細胞体の牽引速度の減少も示した (図10j, WT,  $0.84 \pm 0.04 \mu\text{m}/\text{min}$ ; KO,  $0.54 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P < 0.01$ )。この結果は、Shootin1 KOによる先導突起の伸長阻害が細胞体の牽引を抑制したことを示唆している。

続いて、中心体マーカーCentrin2と細胞核マーカーH2Bを共発現させた細胞移動する野生型及びShootin1 KO嗅球抑制性神経細胞における中心体と細胞核の動態を解析した。野生型及びShootin1 KO嗅球抑制性神経細胞は共に中心体と細胞核間距離のダイナミックな変化を示し (図11a,b)、中心体と細胞核間の平均距離 (図11c, WT,  $3.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ,  $n = 9 \text{ cells}$ , KO,  $2.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ,  $n = 9 \text{ cells}$ ,  $P = 0.48$ )、中心体と細胞核間距離の伸縮頻度 (図11d, WT,  $1.1 \pm 0.2 \text{ h}^{-1}$ , KO,  $1.2 \pm 0.2 \text{ h}^{-1}$ ,  $P = 0.78$ )及び伸縮幅 (図11e, WT,  $2.5 \pm 1.1 \mu\text{m}$ , KO,  $1.9 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ,  $P = 0.64$ )において顕著な差は見られなかった。一方、図10jの結果と一致して、細胞核の牽引速度はShootin1 KO嗅球抑制性神経細胞において有意に減少した (図11f, WT,  $0.40 \pm 0.06 \mu\text{m}/\text{min}$ , KO,  $0.22 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P < 0.05$ )。以上の結果から、Shootin1bが成長円錐の前進を促進し、先導突起を伸長させることで細胞移動を推進することが示唆された。

### Shootin1b は成長円錐の前進を駆動する牽引力の発生に関与する

先導突起の伸長と神経細胞移動に関与する力学的メカニズムを調べるため、嗅球抑制性神経細胞の細胞移動時に発生する力を牽引力顕微鏡法により解析した。この実験では、直径 200 nm の蛍光ビーズを埋めたアクリルアミドゲルに接着し、周りをマトリゲルで覆われた状態で細胞移動する嗅球抑制性神経細胞をタイムラプス観察した (図 12a, 左)。この実験では、細胞外基質に対して牽引力が発生すると、ゲルが歪み、牽引力が発生した領域直下の蛍光ビーズが動く (図 12a, 右)<sup>36</sup>。牽引力顕微鏡法は、蛍光ビーズの動きを解析することで牽引力の大きさと方向を定量できる。図 12b は、細胞移動する野生型嗅球抑制性神経細胞の下で発生した牽引力を示す。成長円錐下では、進行方向とは逆向きの牽引力が持続的に発生した (図 12b, ①,①')。細胞体前方では、蛍光ビーズが元の位置より求心方向に位置していたが (図 12b, ②)、細胞体の牽引に伴いビーズが遠心方向に動いた (図 12, ②', 赤矢印)。これは、細胞体の重さでゲルが歪んだことによりビーズが求心方向に引かれ、細胞体の前方移動に伴いゲルが押し広げられた結果、ビーズが遠心方向に動いたと考えられる。また、Trailing process 下においても、求心方向に牽引力が検出された (図 12b, ③,③')。Shootin1b が成長円錐の前進を促進するため (図 9b)、野生型及び Shootin1 KO 嗅球抑制性神経細胞の成長円錐下における牽引力を

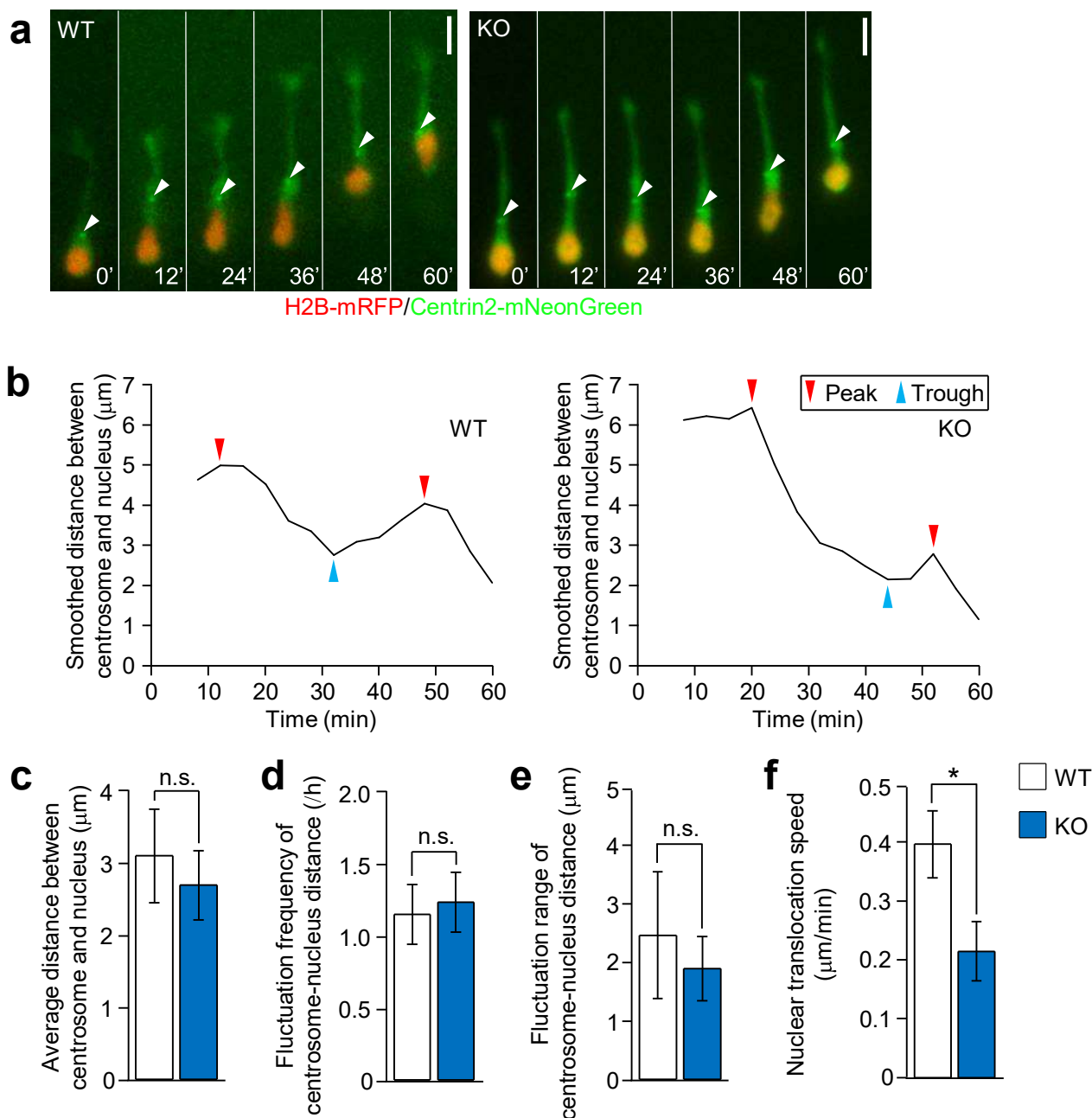
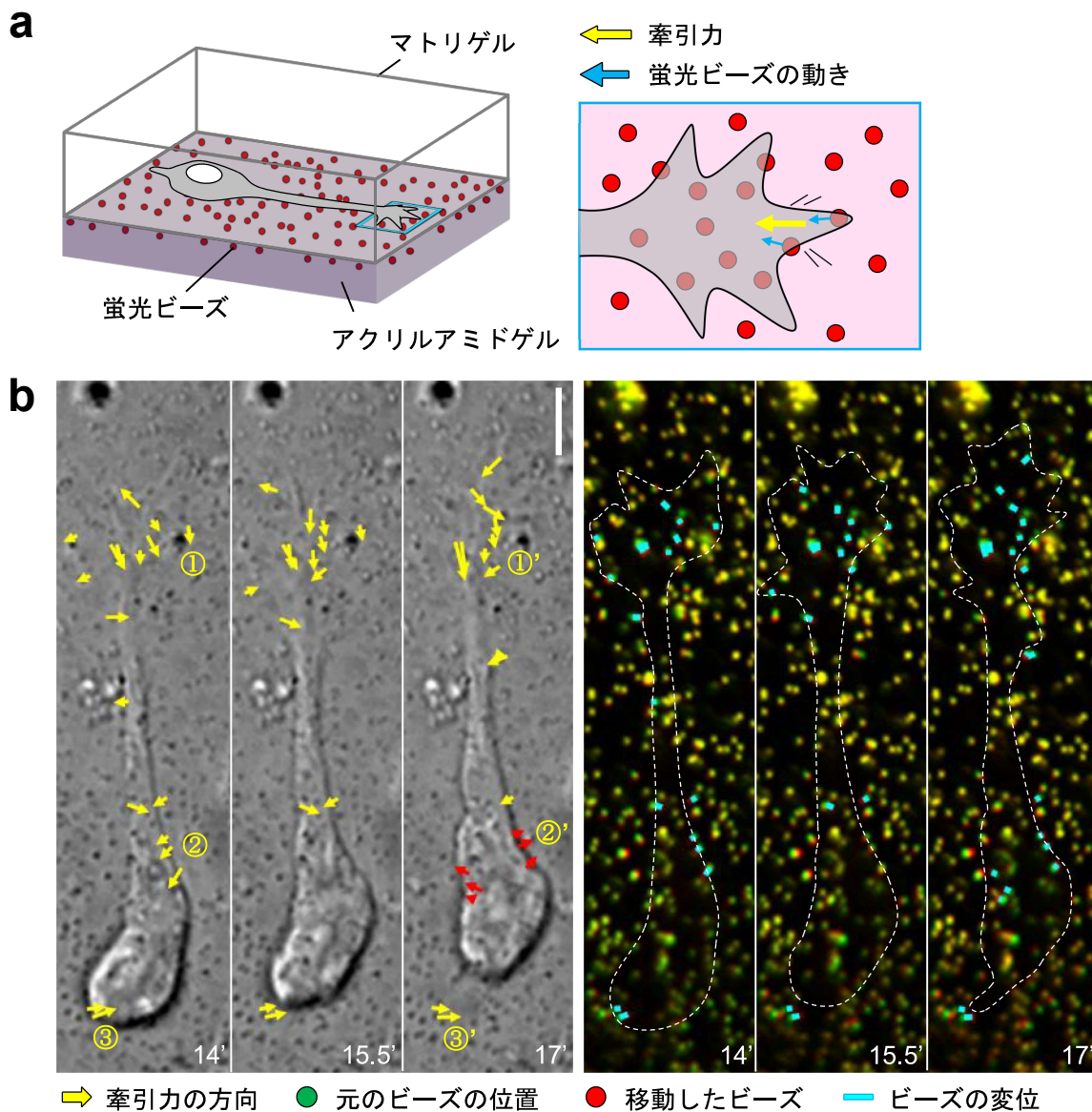


図11. マトリゲル内を細胞移動するShootin1 KO嗅球抑制性神経細胞内の中心体及び細胞核の動態解析

(a) mNeonGreen融合Centrin2とmRFP融合H2Bを共発現したマトリゲル内における生後5日目マウス脳室下帯由来の野生型 (WT)及びShootin1 KO (KO)嗅球抑制性神経細胞の細胞移動のタイムラプス観察。撮影は4 min間隔で3 h行った。パネル内の数字は分数を示す。Bars, 10 μm。Centrin2は中心体、H2Bは細胞核のマーカースとして用いた。矢頭は中心体を示す。(b) (a)で示される野生型 (WT)及びShootin1 KO (KO)嗅球抑制性神経細胞における時間に対する中心体と細胞核間の距離。中心体と細胞核間の距離は、各時間フレームの変動を平滑化するために、連続する5フレーム間の平均値をプロットした。周期的な中心体と細胞核間の距離変化における極大値を赤矢頭、極小値を青矢頭で示す。(c-f) 野生型 (WT)及びShootin1 KO (KO)嗅球抑制性神経細胞における中心体と細胞核間の平均距離 (c)、周期的な中心体と細胞核間の距離変化における極大値と極小値より求めた中心体と細胞核間距離の伸縮頻度 (d)及び伸縮幅 (e)、細胞核の牽引速度 (f)。WT, n = 9 cells; KO, n = 9 cells。データはMean ± SEMで示される。\* P < 0.05, n.s., no significant difference。



**図12. 嗅球抑制性神経細胞の細胞移動時に発生する牽引力の解析**

(a) 牽引力顕微鏡法の概略図。蛍光ビーズを埋め込んだアクリルアミドゲルに接着し、周りをマトリゲルで覆われた状態で細胞移動する嗅球抑制性神経細胞の牽引力を測定した (左)。細胞が牽引力を生み出すと (黄矢印)、アクリルアミドゲルが歪み (黒線)、牽引力が発生した領域の直下にある蛍光ビーズが動く (シアン矢印)。蛍光ビーズの移動距離と移動方向を計測することで牽引力の大きさと方向を推定することができる。(b) 生後5日目マウス脳室下帯由来の嗅球抑制性神経細胞の細胞移動時に発生する牽引力のタイムラプス観察。撮影は30 sec 間隔で24.5 min 行った。パネルの右下に示される数字は分数を表す。矢印の長さは牽引力の大きさ、矢印の向きは牽引力が働く方向を示す (左)。元のビーズの位置は緑色、移動したビーズは赤色、細胞の形態は破線で示される (右)。タイムラプス観察中に動いたビーズの変位をシアン線で示した。Bar, 5  $\mu\text{m}$ 。

比較した (図 13a)。その結果、Shootin1 KO 嗅球抑制性神経細胞は牽引力の有意な減少を示した (図 13b, WT,  $9.7 \pm 1.8$  pN/mm<sup>2</sup>, n = 13 cells; KO,  $4.5 \pm 0.7$  pN/mm<sup>2</sup>, P < 0.02)。一方、牽引力の方向は野生型及び Shootin1 KO 嗅球抑制性神経細胞間で顕著な差は見られなかった (図 13c, WT,  $21.5 \pm 10.6^\circ$ ; KO,  $14.7 \pm 13.0^\circ$ , P = 0.68)。興味深いことに、野生型、Shootin1 KO 細胞の両者において、成長円錐下の牽引力の大きさと成長円錐の前進速度の相関関係が見られた (図 13d)。以上の結果は、Shootin1b が成長円錐の前進を駆動する牽引力の発生に関与することを示している。

### Shootin1b はクラッチ分子として逆行性移動するアクチン線維を細胞外基質に連結する

次に、成長円錐の前進に必要なShootin1bを介した牽引力発生の分子メカニズムを調べた。図14に示されるように、Shootin1bは嗅球抑制性神経細胞の成長円錐においてアクチン線維 (図14a)、Cortactin (図14b)、L1-CAM (図14c)と共局在した。先行研究により、軸索の成長円錐に存在するShootin1aがCortactin及びL1-CAMと相互作用し、クラッチ分子として逆行性移動するアクチン線維を細胞外基質に連結軸索伸長に必要な牽引力を生み出すことが報告されている<sup>37,38</sup>。Shootin1aがCortactin及びL1-CAMと相互作用する領域は、Shootin1bにも存在する (図3)<sup>31</sup>。胎生19日目ラット脳のライセートを用いた免疫共沈降により、Shootin1bがCortactin及びL1-CAMと相互作用することが示された (図15a,b)。また、精製タンパク質を用いた*in vitro* binding assayにより、Shootin1bがCortactin及びL1-CAMに直接相互作用することが示された (図15c,d)。

続いて、Shootin1bがアクチン線維を細胞外基質に連結するクラッチ分子として働く可能性を検証した。最初に、HaloTag融合アクチン、HaloTag融合Cortactin、HaloTag融合Shootin1bをそれぞれ発現する嗅球抑制性神経細胞の蛍光スペckル観察<sup>37</sup>を行い、嗅球抑制性神経細胞の成長円錐内における分子動態を調べた。HaloTag融合アクチンとHaloTag融合Cortactinの蛍光スペckルは、神経軸索で見られるように<sup>29,38</sup>、嗅球抑制性神経細胞の成長円錐内で逆行性移動を示した (図16a,b)。これらタンパク質と同様に、HaloTag融合Shootin1bも成長円錐内で逆行性移動を示した (図16c)。この結果は、Shootin1bがCortactinを介して逆行性移動するアクチン線維と相互作用する可能性を示唆している。続いて、Shootin1bが逆行性移動するアクチン線維と相互作用する可能性を検証するため、蛍光スペckルの解析が容易なXTC細胞を用いてmRFP融合アクチンとAcGFP融合Shootin1bの同一細胞内における逆行性移動速度の比較を行った。その結果、mRFP融合アクチンとAcGFP融合Shootin1bはほぼ同じ速度で逆行性移動することがわかった (図17a,b,

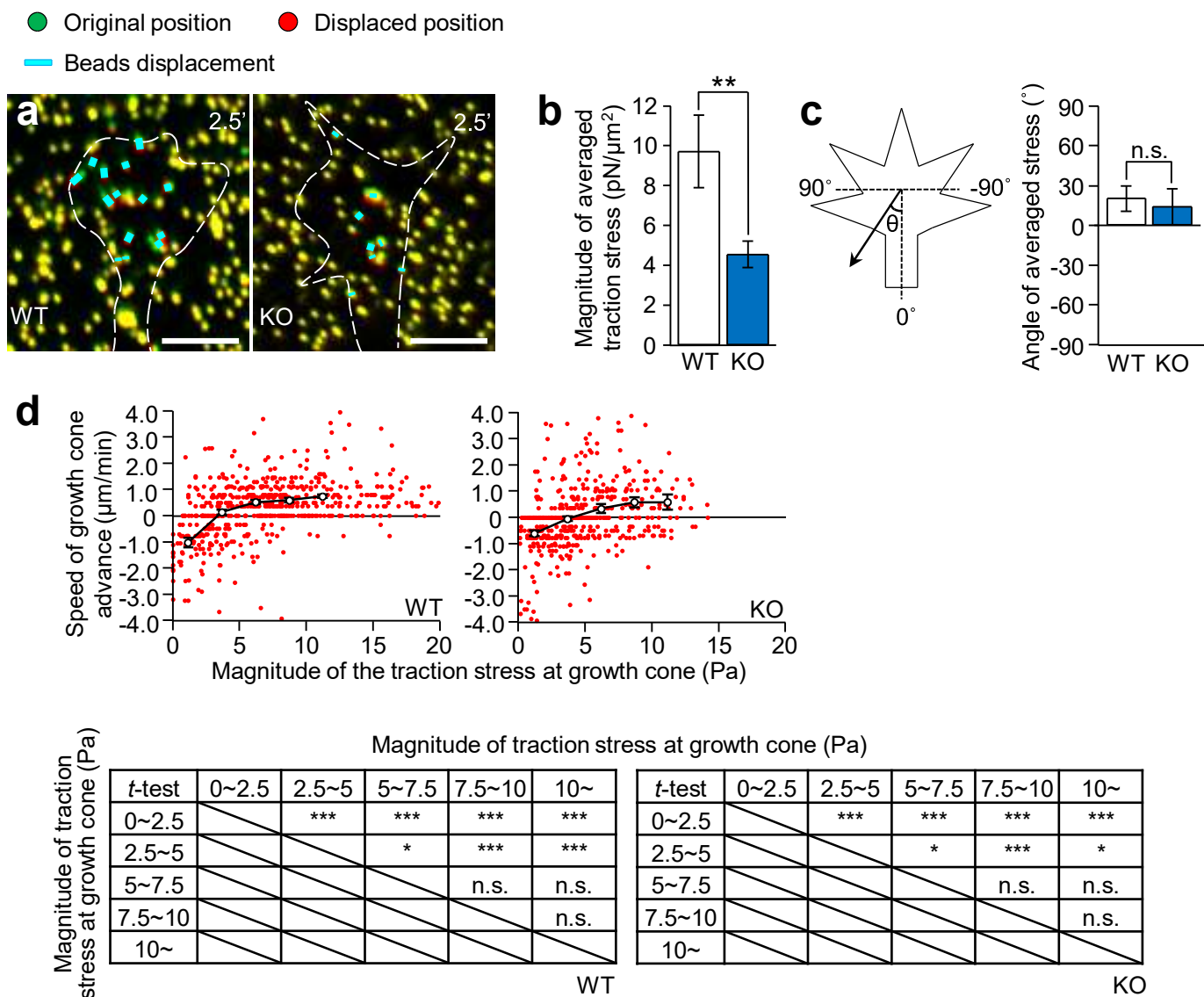
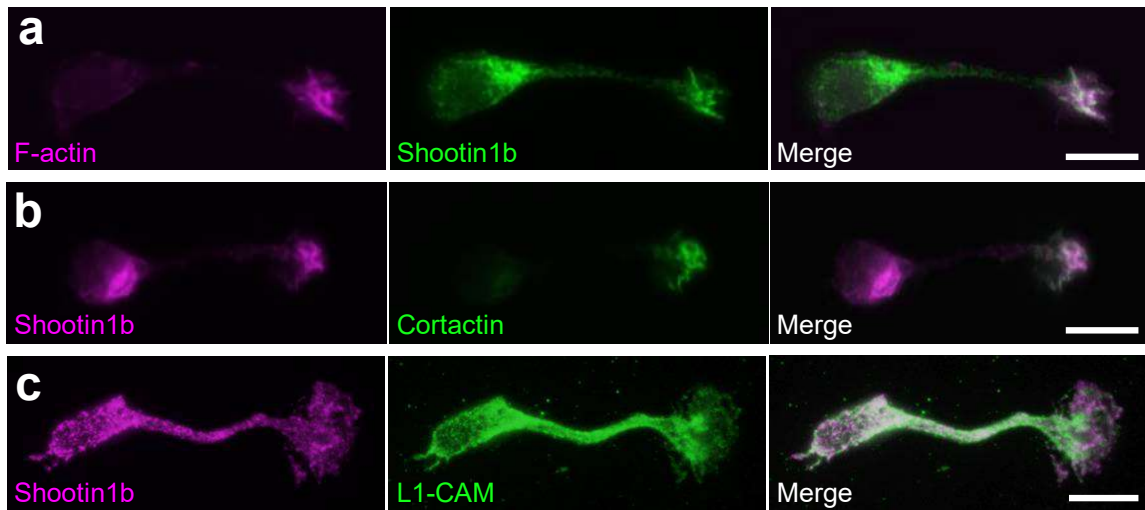


図13. 嗅球抑制性神経細胞の成長円錐下で発生する牽引力の解析

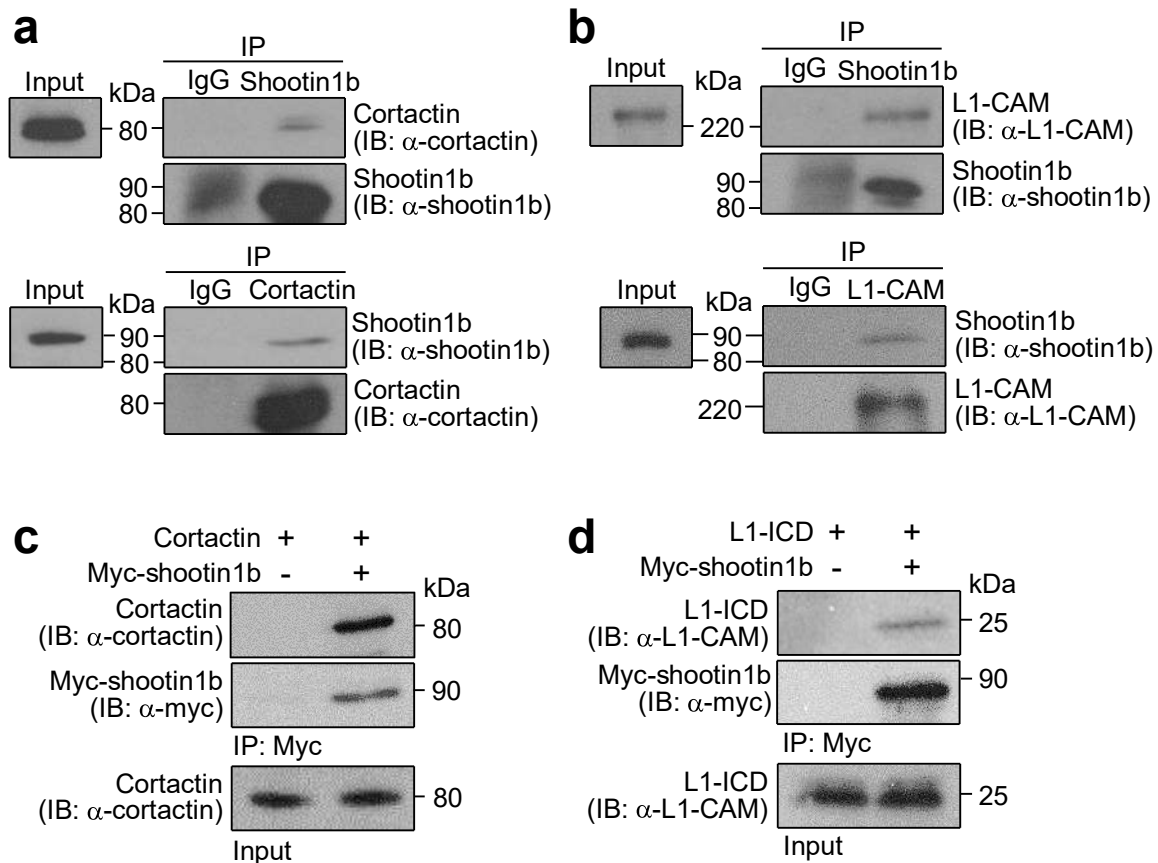
(a) 生後5日目マウス脳室下帯由来の野生型 (WT)及びShootin1 KO (KO)嗅球抑制性神経細胞の成長円錐下で発生した牽引力のタイムラプス観察。撮影は30 sec間隔で24.5 min行った。パネル内の数字は分数を示す。元のビーズの位置は緑色、移動したビーズは赤色、細胞の形態は破線で示される(右)。タイムラプス観察中に動いたビーズの変位をシアン線で示した。Bars, 5  $\mu\text{m}$ 。(b) 野生型 (WT)及びShootin1 KO (KO)嗅球抑制性神経細胞の成長円錐下で発生した牽引力の大きさ。(c) 野生型 (WT)及びShootin1 KO (KO)嗅球抑制性神経細胞の成長円錐下で発生した牽引力の方向。牽引力の方向は細胞体側を $0^\circ$ とした $+180^\circ \sim -180^\circ$ の範囲で算出した(左)。(d) 野生型 (WT)及びShootin1 KO (KO)嗅球抑制性神経細胞の成長円錐下で発生する牽引力の大きさに対する成長円錐の前進速度のプロット(赤)。牽引力の大きさを2.5 Pa毎の画分に分け、その画分内で成長円錐の前進速度の平均値と標準誤差を算出した(白)。(d) 野生型 (WT)及びShootin1 KO (KO)嗅球抑制性神経細胞の成長円錐下で発生した牽引力の大きさの各画分に対して、先端突起の伸長速度の有意差検定 (*t*-test)を総当たりで行った。WT,  $n = 13$  cells; KO,  $n = 11$  cells。データはMean  $\pm$  SEMで示される。\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.01$ , n.s., no significant difference。



**図14. 嗅球抑制性神経細胞におけるアクチン線維、Shootin1b、Cortactin、L1-CAMの細胞内局在**

(a-c) 生後5日目マウス脳室下帯由来の嗅球抑制性神経細胞 (DIV2)を用いた免疫細胞染色。(a) アクチン線維を可視化するためのファロイジン (マゼンタ)と抗Shootin1b抗体(緑)を用いて染色した細胞を落射蛍光顕微鏡により観察した。(b) 抗Shootin1b抗体 (マゼンタ)と抗Cortactin抗体 (緑)を用いて染色した細胞を落射顕微鏡で観察した。(c) 抗Shootin1b抗体 (マゼンタ)と抗L1-CAM抗体 (緑)を用いて染色した細胞を全反射顕微鏡により細胞膜近辺の蛍光を観察した。Bars, 10  $\mu\text{m}$ 。





**図15. Shootin1bに対するCortactin及びL1-CAMの相互作用解析**

(a,b) 胎生19日目ラット脳ライセートを用いた免疫共沈降実験。(a) 抗Shootin1b抗体を用いてShootin1bを免疫沈降し、抗Cortactin抗体を用いたウェスタンブロッティングによりCortactinを検出した。コントロールはRabbit normal IgGを使用した(上)。同様に、抗Cortactin抗体を用いてCortactinを免疫沈降し、抗Shootin1b抗体を用いたウェスタンブロッティングによりShootin1bを検出した。コントロールにはMouse normal IgGを使用した(下)。(b) 抗Shootin1b抗体を用いてShootin1bを免疫沈降し、抗L1-CAM抗体を用いたウェスタンブロッティングによりL1-CAMを検出した。コントロールはRabbit normal IgGを使用した(上)。同様に、抗L1-CAM抗体を用いてL1-CAMを免疫沈降し、抗Shootin1b抗体を用いたウェスタンブロッティングによりShootin1bを検出した。コントロールにはGoat normal IgGを使用した(下)。(c, d) 精製タンパク質を用いた*in vitro* binding assay。(c) 抗Myc抗体を用いて精製Myc-Shootin1bを免疫沈降し、抗Cortactin抗体を用いたウェスタンブロッティングにより精製Cortactinを検出した。(d) 抗Myc抗体を用いて精製Myc-Shootin1bを免疫沈降し、抗L1-CAM抗体を用いたウェスタンブロッティングによりL1-CAM細胞内ドメイン(L1-ICD)を検出した。

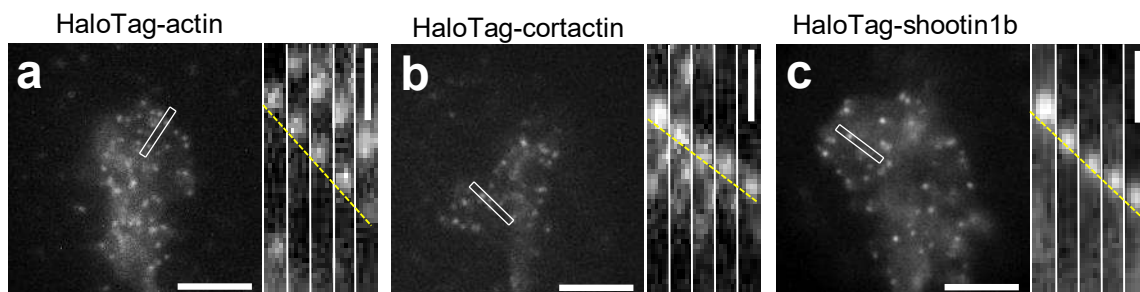


図16. 嗅球抑制性神経細胞の成長円錐内におけるアクチン、Cortactin、Shootin1bの蛍光スペックル観察 (a-c) 生後5日目マウス脳室下帯由来の嗅球抑制性神経細胞を用いて成長円錐内におけるHaloTag融合アクチン (a)、HaloTag融合Cortactin (b)、HaloTag融合Shootin1b (c)の蛍光スペックルを3 sec間隔で撮影した。Bars, 5  $\mu\text{m}$ 。白枠の領域はキモグラフとして右に示される。Bars, 1  $\mu\text{m}$ 。キモグラフ内の破線は蛍光スペックルの逆行性移動を示す。

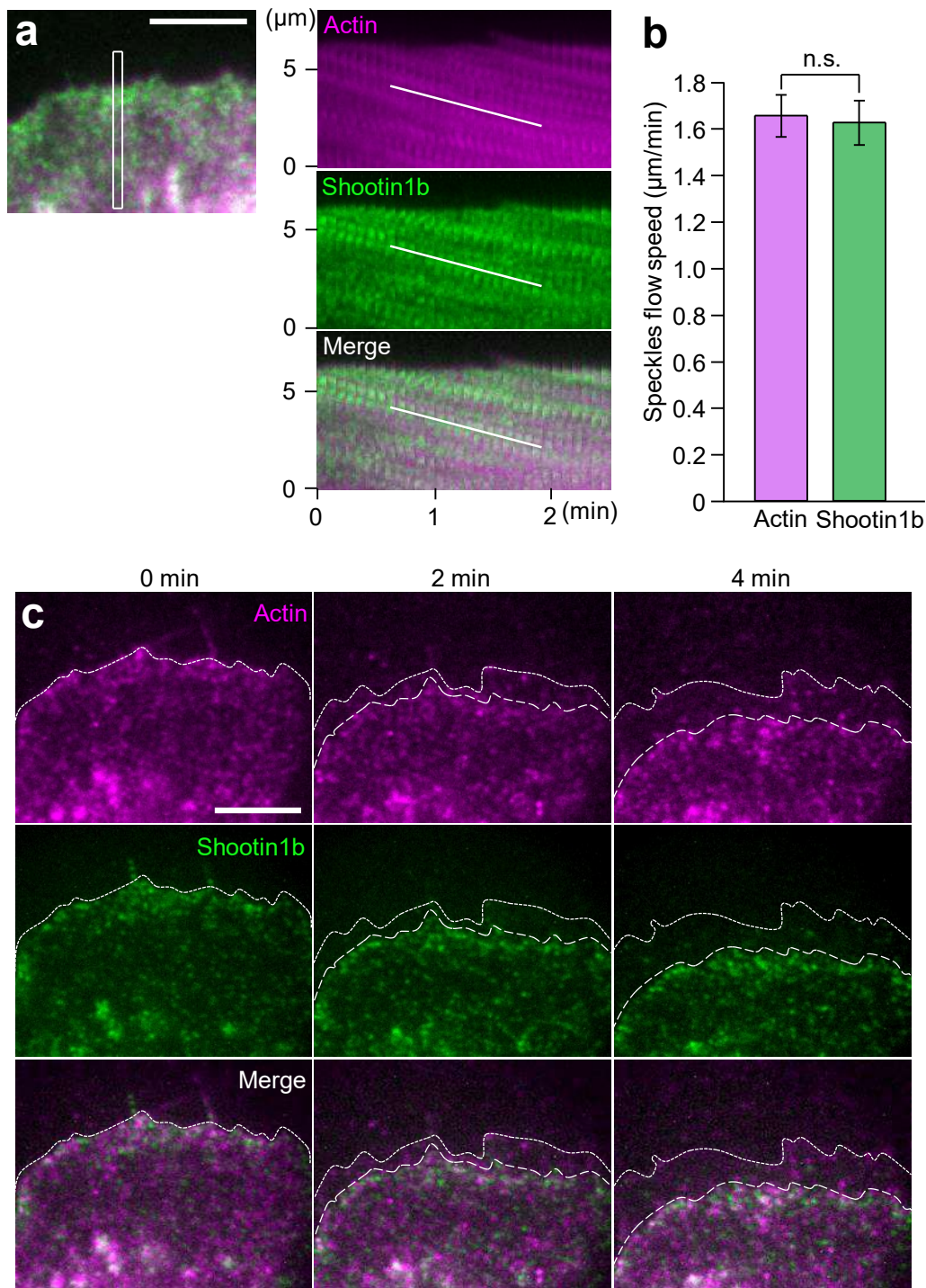


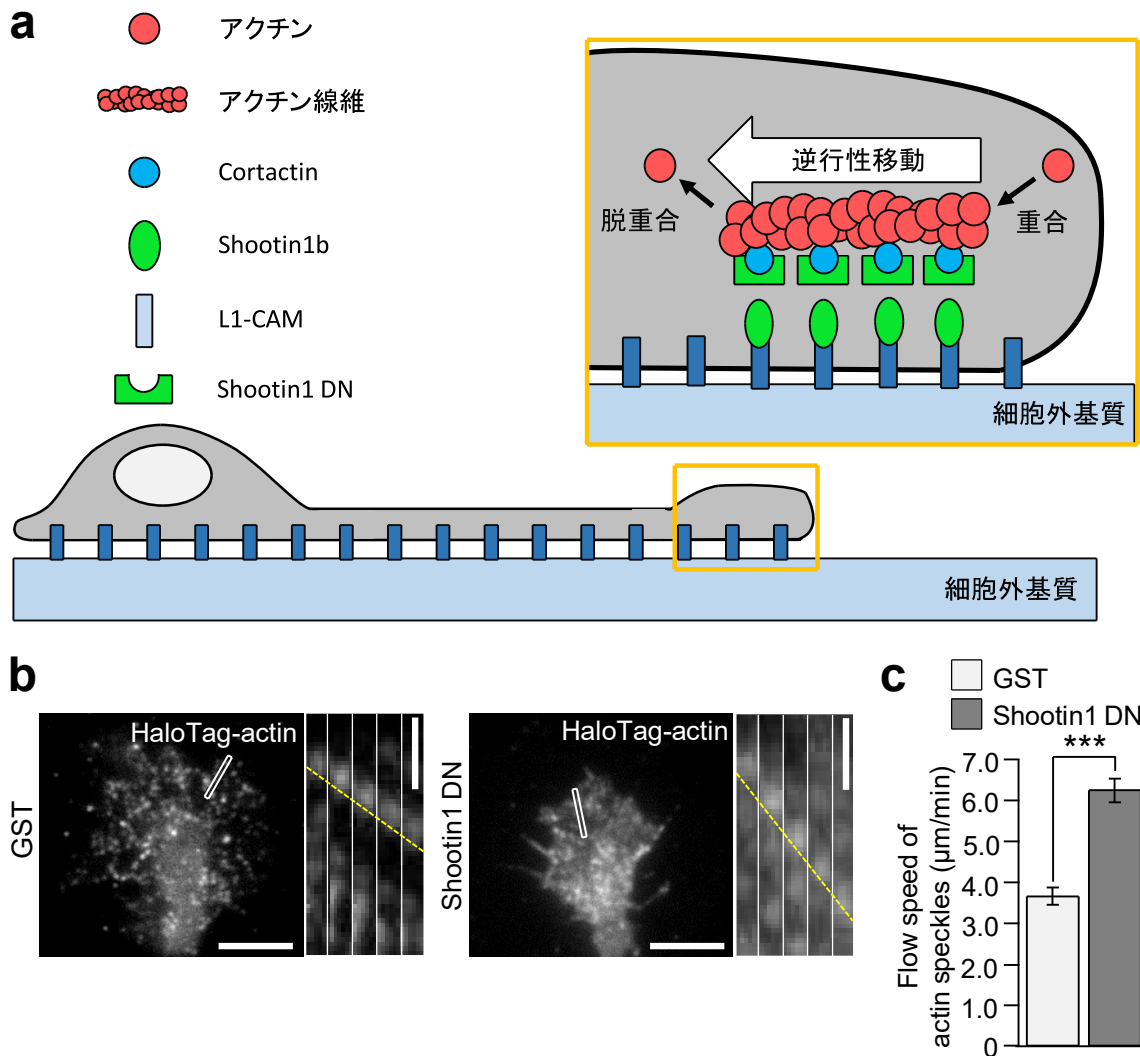
図17. 蛍光スペckル観察による同一細胞内におけるアクチン、Shootin1bの逆行性移動の解析

(a) mRFP融合アクチン及びAcGFP融合Shootin1bを共発現したXTC細胞のラメリポディア先端における蛍光スペckルを5 sec間隔で撮影した(左)。Bar, 5  $\mu\text{m}$ 。白枠で囲われた領域をキモグラフで表した(右)。それぞれのキモグラフでは2 minのmRFP融合アクチン(マゼンタ), AcGFP融合Shootin1b(緑)の蛍光スペckルの逆行性移動を示す(白線)。(b) XTC細胞における mRFP融合アクチン及びAcGFP融合Shootin1bの蛍光スペckルの逆行性移動速度の定量。アクチン, n = 40 speckles; Shootin1b, n = 40 speckles. n.s., no significant difference. データはMean  $\pm$  SEMで示される。(c) Cytochalasin D 1  $\mu\text{M}$ で処理したmRFP融合アクチン(マゼンタ)及びAcGFP融合Shootin1b(緑)の蛍光スペckルを5 sec間隔で撮影した。Cytochalasin D添加前(左, 0 min), 添加後2 min(中央), 添加後4 min(右)におけるラメリポディアの先端は細かい破線、蛍光スペckルの境界線は粗い破線で示される。Bar, 5  $\mu\text{m}$ 。

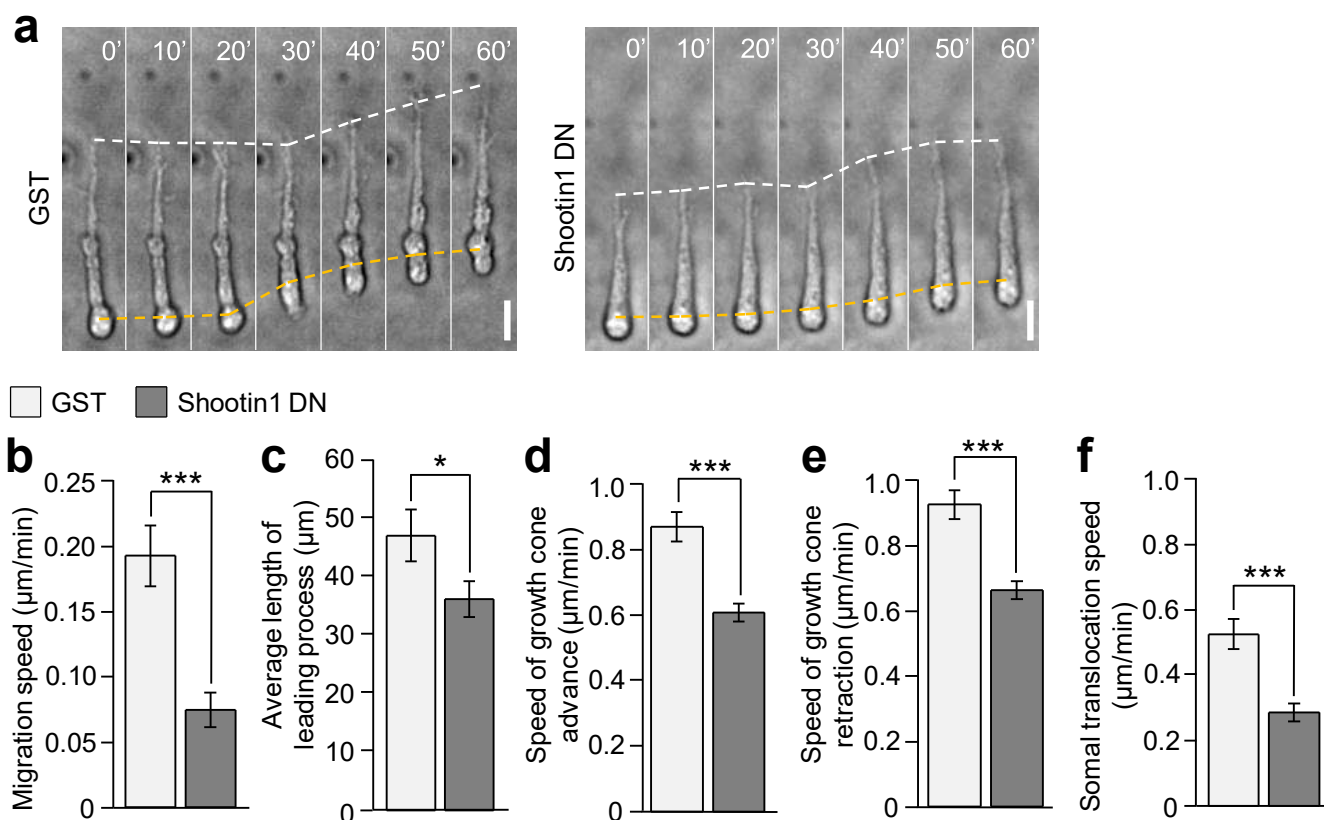
アクチン,  $1.65 \pm 0.09 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $n = 40$  speckles; Shootin1b,  $1.62 \pm 0.10 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $n = 40$  speckles,  $P = 0.82$ )。また、XTC細胞をアクチン重合阻害剤Cytochalasin D  $1 \mu\text{M}$ で処理したところ、mRFP融合アクチンの蛍光スペックルの逆行性移動が停止し、同時にAcGFP融合Shootin1bの蛍光スペックルの逆行性移動も停止した (図17c)。これらの結果は、Shootin1bが逆行性移動するアクチン線維と相互作用することを示す。次に、Shootin1bが嗅球抑制性神経細胞の成長円錐においてクラッチ分子として逆行性移動するアクチン線維を細胞外基質に連結するかを検証した。この検証を行うために、Shootin1とCortactinの相互作用を阻害するShootin1ドミナントネガティブ体 (図3, Shootin1 DN, Shootin1 261-377 a.a.)<sup>38</sup>を用いた。Shootin1 DNを過剰発現する神経軸索の成長円錐内ではアクチン線維と細胞外基質間の連結が阻害され、アクチン線維の逆行性移動速度が増加する<sup>38,39</sup>。Shootin1 DNを過剰発現する嗅球抑制性神経細胞 (図18a)の成長円錐内におけるアクチン逆行性移動の速度は、GST過剰発現 (タンパク質過剰発現のコントロール)細胞と比較して増加した (図18b,c, GST過剰発現,  $3.64 \pm 0.21 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $n = 55$  speckles; Shootin1 DN過剰発現,  $6.23 \pm 0.29 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $n = 60$  speckles,  $P < 0.01$ )。以上の結果から、Shootin1bは嗅球抑制性神経細胞の成長円錐内で逆行性移動するアクチン線維を細胞外基質に連結するクラッチ分子として働くことがわかった。

### **Shootin1b を介した逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質の連結が先導突起の伸長と嗅球抑制性神経細胞の細胞移動に必要である**

最後に、Shootin1bを介した逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質の連結を阻害した嗅球抑制性神経細胞の細胞移動を解析した (図19a)。この実験では、過剰発現ベクターと同時にEGFP発現ベクターを嗅球抑制性神経細胞に導入し、EGFP発現陽性の細胞をタイムラプス観察した。図10のShootin1 KOのデータと一致して、Shootin1 DNを過剰発現する嗅球抑制性神経細胞の移動速度は有意に減少した (図19b, GST過剰発現,  $0.19 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $n = 31$  cells; Shootin1 DN過剰発現,  $0.074 \pm 0.013 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $n = 38$  cells,  $P < 0.01$ )。同様に、先導突起の平均長さ (図19c, GST過剰発現,  $46.9 \pm 4.1 \mu\text{m}$ ; Shootin1 DN過剰発現,  $35.3 \pm 3.0 \mu\text{m}$ ,  $P < 0.05$ )、成長円錐の前進速度 (図19d, GST過剰発現,  $0.87 \pm 0.04 \mu\text{m}/\text{min}$ ; Shootin1 DN過剰発現,  $0.61 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P < 0.01$ )及び後退速度 (図19e, GST過剰発現,  $0.92 \pm 0.06 \mu\text{m}/\text{min}$ ; Shootin1 DN過剰発現,  $0.66 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P < 0.01$ )、細胞体の牽引速度 (図19f, GST過剰発現,  $0.52 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ ; Shootin1 DN過剰発現,  $0.28 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P < 0.01$ )もShootin1 DNの過剰発現により減少した。以上の結果から、Shootin1bを介した逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質の連結が先導突起の伸長と嗅球抑制性神経細胞の細胞移動に必要であることがわかった。



**図18. Shootin1ドミナントネガティブ体を用いた逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質の連結障害の解析**  
 (a) Shootin1ドミナントネガティブ体 (Shootin1 DN, Shootin1 261-377 a.a.)を過剰発現する嗅球抑制性神経細胞の側面図。Shootin1 DNがCortactinと優勢的に相互作用することにより、内在性Shootin1bがCortactinと相互作用できず、逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質の連結は障害される。Shootin1 261-377 a.a.は神経細胞内で細胞核に局在するため、本研究では核外移行シグナル (Nuclear export signal, NES)を付加したMyc-NES-Shootin1 261-377 a.a.を用いた。また、タンパク質過剰発現のコントロールとしてMyc-NES-GSTを用いた。(b) GSTまたはShootin1 DNを過剰発現する生後5日目マウス脳室下帯由来の嗅球抑制性神経細胞神経細胞を用いて成長円錐内におけるHaloTag融合アクチンの蛍光スペックルを3 sec間隔で撮影した (左)。Bars, 5 µm。白枠で囲われた領域はキモグラフで表した (右)。Bars, 1 µm。破線はHaloTag融合アクチンの逆行性移動を示す。(c) GSTまたはShootin1 DN過剰細胞の成長円錐内におけるHaloTag融合アクチンの蛍光スペックルの逆行性移動速度の定量。GST過剰発現, n = 55 speckles; Shootin1 DN過剰発現, n = 60 speckles。データはMean ± SEMで示される。\*\*\* P < 0.01。



**図19. Shootin1 ドミナントネガティブ体を過剰発現させた嗅球抑制性神経細胞の細胞移動の解析**

(a) GSTまたはShootin1 DNを過剰発現する生後5日目マウス脳室下帯由来の嗅球抑制性神経細胞の細胞移動を2 min間隔3 h撮影した。パネル内の数字は分数を示す。白破線は成長円錐、黄破線は細胞体を示す。Bars, 20  $\mu\text{m}$ 。

(b-f) GSTまたはShootin1 DN過剰発現細胞の細胞移動速度 (b)、先導突起の平均長さ (c)、成長円錐の前進速度 (d) 及び後退速度 (e)、細胞体の牽引速度 (f)。GST過剰発現, n = 11 cells; Shootin1 DN過剰発現, n = 14 cells。データは Mean  $\pm$  SEMで示される。\* P < 0.05, \*\*\* P < 0.01。

## <考察>

### 先導突起伸長を担うクラッチメカニズム

脳を構成する多様な神経細胞は、その種によって異なる形態と移動様式を示す<sup>19</sup>。しかしながら、神経細胞移動は共通して、先導突起の伸長とその後続く細胞体の牽引により進行することから、異なる神経細胞間で類似した分子機構が細胞移動に作用すると考えられている<sup>19</sup>。最近になり、アクチン線維のダイナミクスが先導突起の伸長に関与することが報告されてきたが<sup>13,21</sup>、先導突起伸長を担う分子メカニズムは不明であった<sup>2</sup>。本研究は、以下に述べる分子メカニズムを通してクラッチ分子 **Shootin1b** が嗅球抑制性神経細胞の先導突起伸長の駆動力を生み出すことを明らかにした (図 20)。

細胞移動する嗅球抑制性神経細胞の成長円錐内でアクチン線維が逆行性移動しており、そこに **Shootin1b** が濃縮する。そして、**Cortactin** 及び **L1-CAM** との直接的な相互作用を介して、**Shootin1b** が逆行性移動するアクチン線維を細胞外基質に連結する。その結果、逆行性移動の駆動力が細胞外基質に伝わり、牽引力が生まれる。この牽引力が成長円錐の前進を駆動し、先導突起が伸長する (図 20)。

これまで、クラッチ分子を介した軸索の伸長メカニズムは既に知られているが<sup>28,29,38</sup>、神経細胞移動に関しては不明であった。本研究は、先導突起伸長を担うクラッチ分子を初めて同定し、クラッチメカニズムが神経細胞移動において重要な役割を果たすことを明らかにした。

### クラッチ分子 **Shootin1b** による嗅球抑制性神経細胞の方向性移動

本研究は、成長円錐内における **Shootin1b** の相対濃度と成長円錐の前進速度が相関することを示した (図 9)。さらに、**Shootin1b** が成長円錐内で逆行性移動するアクチン線維を細胞外基質に連結するクラッチ分子として働くことを示した (図 15-18)。クラッチ分子がアクチン線維と細胞外基質に連結すると、逆行性移動の駆動力が牽引力として細胞外基質に伝わる。即ち、牽引力の大きさは逆行性移動するアクチン線維と細胞基質間の連結の強さを反映する<sup>36</sup>。また、本研究は牽引力の大きさと成長円錐の前進速度が相関することを示した (図 13c)。この結果は、**Shootin1b** が逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質の連結の強さを調節し、嗅球抑制性神経細胞の成長円錐の前進、後退を制御することを示している。脳内を細胞移動する神経細胞は、厳密に移動方向を決定するために先導突起先端の成長円錐を用いる<sup>20</sup>。先導突起先端の成長円錐が細胞接着分子や分泌因子などのガイダンス因子を感知してアクチン線維、微小管を再編成させることにより、先導突

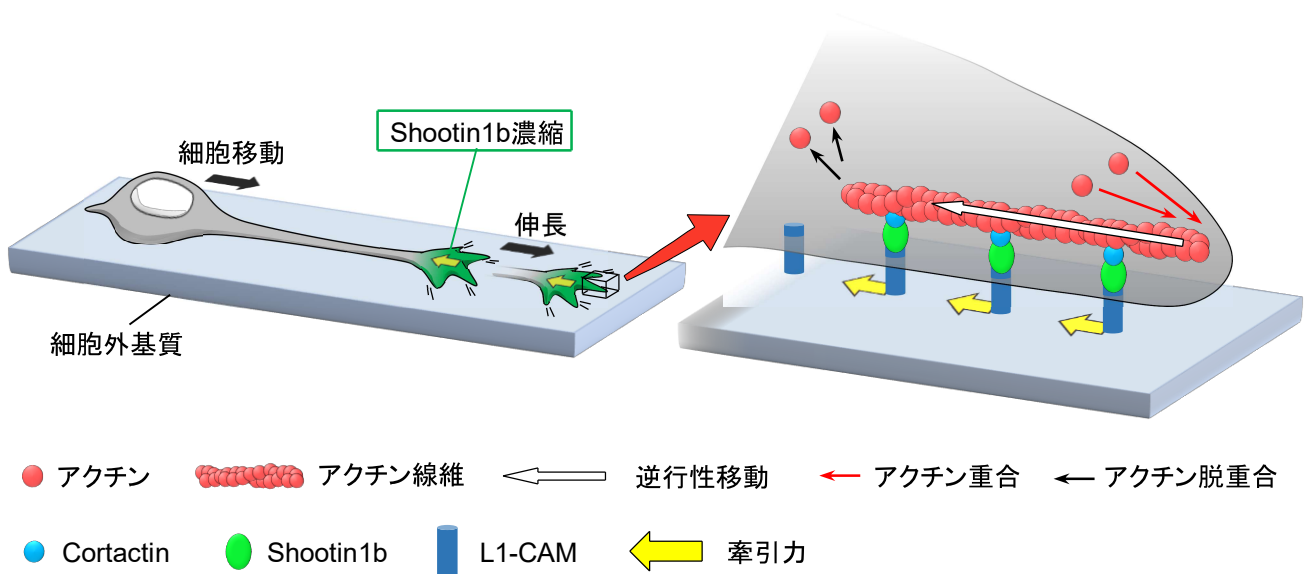


図20. クラッチ分子Shootin1bを介する先導突起伸長の分子メカニズム

嗅球抑制性神経細胞の成長円錐にShootin1bが濃縮(緑)し、細胞外基質に対して牽引力(黄矢印)が働く。牽引力が成長円錐を駆動することで先導突起が伸長する(左)。成長円錐内では、アクチン線維が逆行性移動を示す。Shootin1bがCortactin及びL1-CAMとの相互作用を介して逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質を連結する。その結果、逆行性移動の力が細胞外基質に牽引力として伝わることで、成長円錐の前進に必要な駆動力が生み出される。



起の安定化、崩壊、枝分かれが起こる<sup>21</sup>。その結果、神経細胞は適切な方向に先端突起を伸長させることが可能となり、目的地へ方向性移動すると考えられている<sup>2</sup>。本研究が示す結果は、細胞外シグナルによる細胞骨格の再編成に加えて、クラッチ分子による牽引力の大きさ制御が神経細胞の方向性細胞移動に関与する可能性を示唆している。

当研究室はこれまでに、軸索誘引分子 Netrin-1 の刺激により p21-activated kinase 1 (Pak1) が活性化され、Shootin1a のアミノ酸配列 101 番目と 249 番目のセリンのリン酸化が起こることを報告した<sup>36</sup>。さらに、当研究室はリン酸化型 Shootin1a がアクチン線維と細胞外基質間の連結を強めることで牽引力が増大し、Netrin-1 に誘引される方向に軸索が伸長することを報告した<sup>36,38</sup>。Shootin1b のアミノ酸配列も同様に、Pak1 によりリン酸化される 101 番目と 249 番目のセリンを含む<sup>31</sup>。また、私が Shootin1 の 249 番目のリン酸化型セリンを認識する抗体を用いて免疫細胞染色を行ったところ、リン酸化型 Shootin1b が先端突起の先端に濃縮することを見出した。そのため、誘引因子の刺激により Shootin1b のリン酸化が起きると、牽引力が増大し、誘引される方向に先端突起を伸長させる牽引力が増大する可能性が考えられる。嗅球抑制性神経細胞の方向性細胞移動には、誘引因子 Netrin-1 が関与する可能性が示されている<sup>40,41</sup>。また、脳が傷害を負うと、脳室下帯における嗅球抑制性神経細胞の産生が亢進し、その一部は傷害部位に細胞移動して神経ネットワークの再編に貢献することが知られている<sup>13</sup>。このとき、ケモカインの Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) と Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) が傷害部位への方向性移動の誘引を行う<sup>42,43</sup>。

今後は、野生型及び Shootin1 KO 神経細胞を用いて上記に述べたガイダンス因子の濃度勾配アッセイを行い<sup>44</sup>、細胞移動の方向を解析する。そして、野生型及び Shootin1 KO 神経細胞の移動方向を比較することにより、Shootin1b が方向性細胞移動に関与するかを検証する。また、ガイダンス因子で刺激した嗅球抑制性神経細胞における Shootin1b のリン酸化レベルを、抗リン酸化型 Shootin1 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより定量する。また、精製タンパク質を用いた *in vitro* binding assay を行い、Shootin1b のリン酸化が Cortactin 及び L1-CAM との相互作用を増強させるかを調べる。以上の実験を通して、ガイダンス因子の刺激によりリン酸化された Shootin1b が、逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質間の連結を強めて牽引力を増大し、誘引される方向に先端突起を伸長させることで方向性細胞移動に関与するかを検証する。

## Shootin1b を介した先端突起伸長による細胞体牽引の誘起

本研究により、Shootin1b を介した逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質の

連結が成長円錐の前進に必要な牽引力を生み出し、先導突起を伸長させることが明らかとなった (図 20)。興味深いことに、この連結障害が先導突起の伸長障害のみならず細胞体の牽引も抑制することが示された (図 10j, 図 11f, 図 19f)。Shootin1b は成長円錐に多く存在することから (図 6c,d)、細胞体の牽引に直接作用する可能性は考えにくい。実際に、Shootin1 KO 嗅球抑制性神経細胞は中心体の動態に顕著な異常を示さなかった (図 11)。嗅球抑制性神経細胞の細胞移動に伴う牽引力解析では、細胞体牽引の過程におけるビーズの遠心方向への移動が見られた (図 12b)。この結果は、細胞体が前方移動のための牽引力を生み出さず、受動的に前方へ牽引されることを示している。また、Shootin1b を介した逆行性移動するアクチン線維と細胞外基質の連結が障害された細胞は、成長円錐の後退速度の減少を示した (図 10f, 図 19e)。これらの結果から、Shootin1b を介した先導突起の伸長が細胞膜の張力を増大させ、細胞体の牽引を誘起する可能性が考えられる。

そこで今後は、細胞移動中の神経細胞における細胞膜の張力の時間変化を、光ピンセットで捕捉したビーズを用いて計測する解析<sup>45</sup>や、マイクロニードルを用いて先導突起先端を吸引し、強制的に伸長させて細胞膜の張力を増大<sup>46</sup>させることにより細胞体の牽引が誘起されるかを調べる。また、野生型と Shootin1KO 嗅球抑制性神経細胞における細胞膜の張力の大きさを比較して、Shootin1b を介した先導突起伸長による細胞膜の張力増大が、細胞体の牽引を誘起するかを検証する。

### Shootin1 が関与する嗅球の形成メカニズム

本研究により、Shootin1b が嗅球形成に重要な嗅球抑制性神経細胞の細胞移動を推進することが明らかとなったが、嗅球形成には胎生期の嗅球原基における嗅球興奮性神経細胞の産生<sup>7</sup>と神経細胞への分化及び適切な位置への細胞移動<sup>47</sup>も関与する。マウスの場合、嗅球形成は胎生 11 日目における嗅球興奮性神経細胞の一つである僧帽細胞の産生で始まると考えられている<sup>47,48</sup>。本研究により、表現型 Severe と表現型 Mild を示す Shootin1 KO マウス脳は僧帽細胞層の形成不全を示すことを見出した。そのため今後は、Shootin1 が胎生期の嗅球原基における細胞の産生、分化、細胞移動に関与するかを検証する必要がある。嗅球原基における細胞増殖と細胞移動は、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)を用いて調べる。EdU はウリジン類似体の 1 つであり、細胞の DNA 合成の過程で取り込まれることから、細胞増殖のマーカーとして用いられている<sup>49</sup>。また、EdU のパルス標識により細胞増殖した細胞の産生場所からの移動を追跡することが可能であることから、細胞移動の解析にも用いられている<sup>27</sup>。そこで、EdU を妊娠 11 日目の母親マウスに投与した後、胎児の脳切片を作製し、免疫組織染色を行う。そして、Shootin1 KO の脳内における EdU 陽性細胞と僧帽細胞マーカー Tbr2<sup>35</sup> 陽性細胞の数と分布を解析

し、野生型マウスと比較することにより、Shootin1 が嗅球原基形成に重要な細胞増殖、分化、細胞移動に関与するかを検証する。

また、発生過程の脳内では転写因子のパターニングが見られ<sup>50</sup>、パターニングの破綻は脳組織の形成不全を引き起こす<sup>51,52</sup>。そこで、*in situ hybridization* 法により Shootin1 KO マウスの脳内における転写因子の発現パターンを解析し、野生型マウスの脳と比較することで、Shootin1 の遺伝子欠損がこれら転写因子の発現量やパターニングに影響するかを検証する。さらに、Shootin1 KO マウスの中には、野生型と比較して脳構造に顕著な異常が見られない個体がいる。これは、遺伝子の欠損により発現量が増加<sup>53</sup>する冗長な遺伝子<sup>54</sup>が、Shootin1 の機能を補完する可能性を示唆している。そこで、RNA シーケンス解析<sup>55</sup>により異常を示さない Shootin1 KO マウスの脳内における遺伝子発現量を解析し、野生型と比較して発現量が増加した遺伝子を網羅的に調べることで、Shootin1 の遺伝子欠損により発現量が増加した遺伝子を同定する。そして、同定された遺伝子の欠損マウスと Shootin1 KO マウスを交配させて、新たに Double KO (DKO)マウスを作製し、表現型解析を行う。

今後は、以上の実験を通して Shootin1 が関与する嗅球の形成メカニズムの解明を目指す。

## <謝辞>

本研究を行うにあたり、充実した研究環境のみならず、研究を進めるための姿勢や考え方に関してご助言やご指導を与えていただいた指導教官の稲垣直之教授に心より感謝を申し上げます。また、本研究のアドバイザー委員である箱嶋敏雄教授と末次史郎教授には、研究内容に関して鋭いご指摘やご助言をいただきました。この場を借りて感謝申し上げます。

神経細胞の移植実験は、名古屋市立大学医学研究科再生医学分野の澤本和延教授、金子奈穂子講師との共同研究として行いました。また、澤本和延教授、金子奈穂子講師と本研究に関してディスカッションを行い、論文の修正点や必要な実験についてご助言を頂きました。金子奈穂子講師には、神経細胞の移植と、脳内における神経細胞の移動の観察、解析を行っていただいただけでなく、嗅球抑制性神経細胞の培養方法に関するご助言をいただきました。作村諭一准教授（本学バイオサイエンス研究科計算生物学）には、神経細胞移動における Shootin1b の動態解析に関してご助言とご協力をいただきました。小沢哲研究員（現 株式会社国際電気通信基礎技術研究所）には、Traction force microscopy の解析に関して計算プログラムの解釈の仕方や解析方法の相談にご協力していただきました。これらの方々に深く感謝申し上げます。

神経システム生物学研究室の浦崎明宏助教授と鳥山道則助教授には本研究を進めるにあたりご助言とご指導いただいただけでなく、実験機器の取り扱いや実験手法、データの解析方法に関して学ばせていただきました。また、久保祐亮研究員（現 国立研究開発法人 日本医療開発機構）、勝野弘子研究員（現 クイーンズランド大学）、馬場健太郎研究員には、実験機器の取り扱いや実験手法、データの解析方法に関してご指導いただきました。さらに、研究室の秘書である植田美恵子さんと技術職員の山本優香さんをはじめとして、先輩方や後輩のみなさんには本研究を進めるにあたり多くのサポートをしていただきました。研究室の皆さまにこの場を借りて深くお礼申し上げます。

最後に、私の大学院生活を経済的に支え、応援していただいた家族と、苦楽を共に過ごし、励ましあった友人たちに感謝申し上げます。

## <参考文献>

- 1 Ridley, A. J. *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704-1709 (2003).
- 2 Marin, O., Valiente, M., Ge, X. & Tsai, L. H. Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1-21 (2010).
- 3 Ghashghaei, H., Lai, C. & Anton, E. S. Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 141-151 (2007).
- 4 Lledo, P. M., Alonso, M. & Grubb, M. S. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 179-193 (2006).
- 5 Valiente, M. & Marin, O. Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **20**, 68-78 (2010).
- 6 Hatten, M. E. Central nervous system neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 511-539 (1999).
- 7 Hinds, J. W. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Time of origin of neurons and neuroglia. *J. Comp. Neurol.* **134**, 287-304 (1968).
- 8 Blanchart, A., De Carlos, J. A. & Lopez-Mascaraque, L. Time frame of mitral cell development in the mice olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* **496**, 529-543 (2006).
- 9 Tucker, E. S., Polleux, F. & LaMantia, A. S. Position and time specify the migration of a pioneering population of olfactory bulb interneurons. *Dev. Biol.* **297**, 387-401 (2006).
- 10 Pencea, V. & Luskin, M. B. Prenatal development of the rodent rostral migratory stream. *J. Comp. Neurol.* **463**, 402-418 (2003).
- 11 Lledo, P. M., Merkle, F. T. & Alvarez-Buylla, A. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci.* **31**, 392-400 (2008).
- 12 Sun, W., Kim, H. & Moon, Y. Control of neuronal migration through rostral migration stream in mice. *Anat. Cell Biol.* **43**, 269-279 (2010).
- 13 Kaneko, N., Sawada, M. & Sawamoto, K. Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. *J. Neurochem.* **141**, 835-847 (2017).
- 14 Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* **18**, 779-791 (1997).
- 15 Wu, W. *et al.* Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* **400**, 331-336 (1999).
- 16 Kaneko, N. *et al.* New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron* **67**, 213-223 (2010).
- 17 Ota, H. *et al.* Speed control for neuronal migration in the postnatal brain by Gmp-mediated local inactivation of RhoA. *Nat. Commun.* **5**, 1-12 (2014).

- 18 Tsai, L. H. & Gleeson, J. G. Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron* **46**, 383-388 (2005).
- 19 Marin, O., Valdeolmillos, M. & Moya, F. Neurons in motion: same principles for different shapes? *Trends. Neurosci.* **29**, 655-661 (2006).
- 20 Cooper, J. A. Mechanisms of cell migration in the nervous system. *J. Cell Biol.* **202**, 725-734 (2013).
- 21 Ayala, R., Shu, T. & Tsai, L. H. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* **128**, 29-43 (2007).
- 22 Edmondson, J. C. & Hatten, M. E. Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J. Neurosci.* **7**, 1928-1934 (1987).
- 23 Shu, T. *et al.* Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron* **44**, 263-277 (2004).
- 24 Martini, F. J. & Valdeolmillos, M. Actomyosin contraction at the cell rear drives nuclear translocation in migrating cortical interneurons. *J. Neurosci.* **30**, 8660-8670 (2010).
- 25 Schaar, B. T. & McConnell, S. K. Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13652-13657 (2005).
- 26 Bellion, A. 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.* **25**, 5691-5699 (2005).
- 27 Shinohara, R. *et al.* A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nat. Neurosci.* **15**, 373-380 (2012).
- 28 Mitchison, T. & Kirschner, M. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* **1**, 761-772 (1988).
- 29 Suter, D. M. & Forscher, P. Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J. Neurobiol.* **44**, 97-113 (2000).
- 30 Lowery, L. A. & Van Vactor, D. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 332-343 (2009).
- 31 Higashiguchi, Y. *et al.* Identification of a shootin1 isoform expressed in peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* **366**, 75-87 (2016).
- 32 Toriyama, M. *et al.* Shootin 1: a protein involved in the organization of an asymmetric signal for neuronal polarization. *J. Cell Biol.* **175**, 147-157 (2006).
- 33 吉田 亙. 終脳発生における shootin1 および shootin2 の機能解明. 奈良先端科学技術大学院大学修士論文 (修士論文番号 1171113). (2013).
- 34 上杉 康之. 嗅球形成における Shootin1 の機能解析. 奈良先端科学技術大学院大学修士論文 (修士論文番号 1471010). (2016).
- 35 Besse, L. *et al.* Primary cilia control telencephalic patterning and morphogenesis via Gli3

- proteolytic processing. *Development* **138**, 2079-2088 (2011).
- 36 Toriyama, M., Kozawa, S., Sakumura, Y. & Inagaki, N. Conversion of a signal into forces for axon outgrowth through pak1-mediated shootin1 phosphorylation. *Curr. Biol.* **23**, 529-534 (2013).
- 37 Shimada, T. *et al.* Shootin1 interacts with actin retrograde flow and L1-CAM to promote axon outgrowth. *J. Cell Biol.* **181**, 817-829 (2008).
- 38 Kubo, Y. *et al.* Shootin1-cortactin interaction mediates signal-force transduction for axon outgrowth. *J. Cell Biol.* **210**, 663-676 (2015).
- 39 Suter, D. M., Errante, L. D., Belotserkovsky, V. & Forscher, P. The Ig superfamily cell adhesion molecule, apCAM, mediates growth cone steering by substrate-cytoskeletal coupling. *J. Cell. Biol.* **141**, 227-240 (1998).
- 40 Murase, S. & Horwitz, A. F. Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J. Neurosci.* **22**, 3568-3579 (2002).
- 41 Hakanen, J., Duprat, S. & Salminen, M. Netrin1 is required for neural and glial precursor migrations into the olfactory bulb. *Dev. Biol.* **355**, 101-114 (2011).
- 42 Yan, Y. P. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **27**, 1213-1224 (2007).
- 43 Robin, A. M. *et al.* Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **26**, 125-134 (2006).
- 44 Zhang, H., Vutskits, L., Pepper, M. S. & Kiss, J. Z. VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *J. Cell Biol.* **163**, 1375-1384 (2003).
- 45 Lieber, A. D., Yehudai-Resheff, S., Barnhart, E. L., Theriot, J. A. & Keren, K. Membrane tension in rapidly moving cells is determined by cytoskeletal forces. *Curr. Biol.* **23**, 1409-1417 (2013).
- 46 Houk, A. R. *et al.* Membrane tension maintains cell polarity by confining signals to the leading edge during neutrophil migration. *Cell* **148**, 175-188 (2012).
- 47 Hebert, J. M., Lin, M., Partanen, J., Rossant, J. & McConnell, S. K. FGF signaling through FGFR1 is required for olfactory bulb morphogenesis. *Development* **130**, 1101-1111 (2003).
- 48 Gong, Q. & Shipley, M. T. Evidence that pioneer olfactory axons regulate telencephalon cell cycle kinetics to induce the formation of the olfactory bulb. *Neuron* **14**, 91-101 (1995).
- 49 Imamura, F., Ayoub, A. E., Rakic, P. & Greer, C. A. Timing of neurogenesis is a determinant of olfactory circuitry. *Nat. Neurosci.* **14**, 331-337 (2011).
- 50 Rowitch, D. H. & Kriegstein, A. R. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* **468**, 214-222 (2010).

- 51 Hebert, J. M. & Fishell, G. The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 678-685 (2008).
- 52 Geng, X. & Oliver, G. Pathogenesis of holoprosencephaly. *J. Clin. Invest.* **119**, 1403-1413 (2009).
- 53 Weischenfeldt, J., Symmons, O., Spitz, F. & Korbel, J. O. Phenotypic impact of genomic structural variation: Insights from and for human disease. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 125-138 (2013).
- 54 Doetschman, T. Interpretation of phenotype in genetically engineered mice. *Lab. Anim. Sci.* **49**, 137-143 (1999).
- 55 Dillon, G. M. *et al.* CLASP2 links reelin to the cytoskeleton during neocortical development. *Neuron* **93**, 1344-1358 (2017).