

令和元年5月20日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06795

研究課題名(和文) Reelinシグナルによるゴルジ体ダイナミクスが神経細胞の発達に果たす役割

研究課題名(英文) Role of Reelin regulating Golgi apparatus dynamics in neuronal development

研究代表者

松木 亨 (Matsuki, Tohru)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・主任研究員

研究者番号：90332329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究から発達期の神経細胞において、Reelin刺激に反応してPKCが活性化され、GM130をリン酸化する事が明らかとなった。このリン酸化により、神経細胞のゴルジ体が伸長すると共に、神経細胞移動の停止および樹状突起の伸長が引き起こされる事も明らかになった。

加えて、神経細胞が移動を開始する時点では、STK25の働きによりRho-GTPaseファミリーのRhoAの分解とRac1の活性化が同時に引き起こされる事から、両者のバランスが調節される事も必要である事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、大脳皮質の発達機構を根本から理解する上で非常に重要な知見をもたらしている。特に、組織形態的に問題がない知的障害を初めとする発達障害では、神経細胞の発達機構が発達過程、発達後の神経機能に大きな影響を与える事が多いため、今回の知見が関連疾患の理解にも繋がる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Neuronal migration during cortical lamination is precisely regulated and necessary for development of functional brain. Reelin signaling and Stk25 are known to be involved in neuronal development. In this study, we identified that Reelin triggers GM130, a Golgi apparatus molecule, phosphorylation through PKC activation. Furthermore, this stimuli induces Golgi deployment and dendrite extension. On the other hand, MST3, a family member of STK25, compensates for STK25 regulating biological phenomenon. These molecules interact with Rac1, a member of Rho-GTPases. In addition, Stk25 and MST3 accelerate degradation of RhoA through the interaction.

This study demonstrates that Stk25 and MST3 act as hub proteins for Rac1 activation and RhoA destabilization pathway and also provides insights not only for uncovering roles of GCKIII proteins, but also for understanding the basis of the cortical layer formation.

研究分野：分子神経科学

キーワード：Reelin ゴルジ体 神経細胞移動 細胞極性 リン酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳は体の中で最も複雑な構造を持つ器官であり、神経細胞間の複雑なネットワークを介した情報伝達機構によって認知学習機能を制御している。このように脳機能は、シナプスを介した神経細胞間の情報伝達によって実現され、神経細胞の形態的特長である一本の軸索と多数の樹状突起が基盤となっている。そのため、正常な軸索や樹状突起の発達が阻害されることは、発達障害や統合失調症などの神経疾患の要因となる。しかし、極性を持つ神経細胞の形態形成の制御機構についてはあまり分かっていない。しかし近年、神経細胞における極性制御機構が、軸索や樹状突起形成に重要な役割を担っている事が次第に明らかとなってきた(Barnes AP, et al., Cell. 2007, Shelly M, et al., Cell. 2007, Matsuki T, et al., Cell. 2010)。また、皮質層における樹状突起形成直後の神経細胞では、樹状突起内部へのゴルジ体伸長が観察されており(Horton AC, et al., Neuron. 2005, Matsuki T, et al., Cell. 2010)、ゴルジ体伸長が樹状突起伸長に重要な役割を果たしている事が示唆されていた。

これまで申請者は、神経細胞の位置決定や樹状突起伸長を制御している Reelin シグナルとその修飾因子である、Stk25 (Serine/Threonine Kinase 25)に着目し、脳神経系における生理的役割を *in vitro* および *in vivo* について解析してきた(Matsuki T, et al., J Cell Sci. 2008, Cell. 2010, PLoS One. 2012)。その結果、Reelin シグナルの活性化により、ゴルジ体の樹状突起内への伸長と樹状突起の伸長が誘導されることが明らかとなっている。このような経緯から、申請者は Reelin シグナルの新たな役割としてのゴルジ体ダイナミクス制御が、樹状突起伸長機構と直接結びついているだけでなく、Stk25 シグナルと共に細胞骨格や極性輸送制御を通して樹状突起形成に重要な役割を担っているとの仮説を立ててきた。この仮説に基づき、発達期におけるマウス脳において Reelin シグナルによるゴルジ体の伸長促進が神経細胞の正常な発達のみならず、生後の神経活動を正常に行う上で重要な基盤と考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が世界に先駆けて明らかにした、Reelin シグナルによるゴルジ体ダイナミクス制御とその生理的意義の解明にある。しかしながらその詳細な分子機構は殆ど明らかになっていない。また、生体内では Reelin シグナルによるゴルジ体伸長と樹状突起伸長が生じている場所は一致しており、両者には強い相関が見られるが、ゴルジ体伸長と樹状突起伸長の関係についても詳細は不明のままである。加えて、ゴルジ体ダイナミクス制御と神経細胞移動制御による大脳皮質形成機構との関連性もまた解明すべき点が多い。そのため、本研究では、Reelin シグナルと Stk25 シグナルがゴルジ体ダイナミクスを中心として、大脳皮質形成にどのような役割を果たしているのかを明らかにするとともに、最終的には神経機能におけるこれらのシグナルの役割を明らかにする事を目指す。

3 . 研究の方法

1) Reelin 刺激後にゴルジ体構造たんぱく質である GM130 へ生じるリン酸化について質量分析法により Ser300 がリン酸化される事を見出だしていたため、まずこのセリン残基のリン酸化が発達過程の神経細胞におけるゴルジ体構造制御、特にゴルジ体伸長に関係しているかどうかを *in utero* electroporation により胎児期の脳皮質神経細胞へ導入して確認を行う。Ser300 がゴルジ体伸長へ関与しない場合、他のリン酸化アミノ酸の同定と解析を上記と同様の手法を用いて行う。

2) Stk25 は、ゴルジ体構造制御において Reelin シグナルが担う役割に拮抗的に働いている事がこれまでの研究から分かっているため、Stk25 が神経細胞の発達に果たす役割を明らかにするため、*in vitro* の系において Stk25 に相互作用する事が分かっているゴルジ体関連分子との関連性を生化学的、組織学的に明らかにする。特に、申請者がこれまでに発見した知見の中で最も重要な神経細胞移動への関与、の点からまず解析を進めて行く。そのために、*in utero* electroporation により Stk25 flox マウスの脳皮質神経細胞に Cre を時期特異的に発現させることにより、null mice で見られた代償機構の発現を回避し、Stk25 シグナルの本来の役割を明らかにする。この時、ゴルジ体の構造についても詳細に解析を進める。

3) 神経細胞移動の完了時には樹状突起の伸長が加速される事が形態学的に分かっているが、GM130 の Ser300 のリン酸化が、ゴルジ体の伸長だけでなく樹状突起の伸長にも関与しているかどうかを初代培養神経細胞へ Reelin 刺激を与える事により形態学的解析を行う。また、より *in vivo* に近い培養系である、*explant culture* を用いる事により、同定される事が期待される GM130 のリン酸化を誘導するキナーゼ等の阻害薬存在下でゴルジ体伸長が抑制できるかどうかについても解析する。

4 . 研究成果

平成 27 年度では、これまでに得られたプレリミナリーなデータ検証を行った結果、*in utero* electroporation により、リン酸化型(S300E)および非リン酸化型(S300A)GM130 をマウス胎児脳へ導入したが、*in vitro* で見られたような明らかなゴルジ体構造の変化が見られなかった。Ser300 は PKC によるリン酸化部位である事が予測されていたため、リン酸化予測ソフトウェアを用いて質量分析ではカバーされていない PKC によるリン酸化部位の確認を行ったところ、Ser300 を含め 7 残基が該当する事が分かった。そこで、これらについて放射性同位体を用いたキナーゼアッセイを行ったところ、アミノ酸 A と B が特にリン酸化される事を見出した。これらのアミノ酸残基をリン化する PKC ファミリー分子は、Reelin 刺激にตอบสนองして活性化し、その後減衰することも明らかになった。さらに、刺激にตอบสนองして PKC と GM130 の結合が変化することも分かった。

平成 28 年度では、GM130 のリン酸化部位が neuronal migration や dendritogenesis に果たしている役割を検証してきた。*in utero* electroporation により、アミノ酸残基 A あるいは B のリン酸化変異体を脳室下帯の神経細胞に導入したところ、neuronal migration の停止とともに、dendrite の優位な伸張が認められた。ゴルジ体たんぱく質である、GM130 のリン酸化

の生理的重要性は、これまで有糸分裂時に見られる Ser25 のリン酸化のみである。本研究で見出した、Reelin シグナル下で PKC により引き起こされる GM130 のリン酸化は神経細胞に特異的な現象かどうか今後検証していく必要がある。

平成 29 年度では、前年度に分かった Reelin による神経細胞移動と樹状突起伸張の制御がゴルジ体の構造制御と密接に関連していることから、神経細胞移動に関与する Stk25 の役割についてより詳細に検討してきた。Stk25 の null mice では神経細胞移動の障害をはじめとして形態的な差異が野生型マウスと比べて見られなかったことから、何らかの代償機構が働いている事が想定された。実際、Stk25 およびその同じグループに属する MST3 は、非常に良く似た働きを担っており、神経細胞の発達過程においてお互いの役割を代償している可能性が考えられた。そのため、神経細胞の発達時期におけるこれら二つの分子の役割を比較した時、必ずしも同一ではないことも分かった。すなわち、Stk25 についてはキナーゼ活性を持つものの、必ずしもそれは必要ではなく、キナーゼ活性を持たない変異体でも神経細胞移動や神経極性制御を正常に機能させることが出来る。しかし、MST3 においては神経細胞移動を正常に行わせるためにはキナーゼ活性が必要である。qPCR による結果からは、Stk25 mRNA が MST3 mRNA よりも iPS 細胞からの神経分化誘導時にどの段階においても発現量が多いことが分かった。このことは、通常 Stk25 が機能分子として働く一方で、MST3 が補佐的な役割を担っている可能性が示唆された。今回の研究からは、神経系の発達においてゴルジ体構造制御の動的恒常性を制御するシグナルとしての Reelin シグナルの役割と、拮抗的に機能する Stk25 シグナルの重要性が明らかとなった。特に、Stk25 と MST3 の相補的代償機能は、これまで生体の発達を正常に行うためのメカニズムとして想定されてきた代償機構について、同じファミリー内の相同性の高い二つの分子による神経細胞の発達への関与が初めて明らかとなった。

平成 30 年度では、Stk25 と MST3 による相互補完的な代償機構による神経細胞移動のメカニズムについてより詳細な検証を行った。その結果、Stk25, MST3 とともに Rho-GTPase ファミリーとの相互作用が確認できたが、興味深い発見として RhoA のプロテアソーム系およびライソソーム系による分解を促進し、かつ Rac1 の活性化を促進している可能性が示唆する結果を得た。実際、発達過程の Stk25 flox マウスで Rac1-biosensor (Raichu-1011X) を発現させた場合、Cre を発現するプラスミドによる Stk25 の時期特異的ノックアウトを行った場合には、Rac1 の活性化が抑制されている事が判明した。また、RhoA の分解では生化学的アッセイおよび in utero electroporation を用いた neuronal migration assay から、E3 Ubiquitin Proteasome complex を構成する、Cullin3 および Bacurd1 が Stk25 が制御する神経細胞移動に関与している事も判明した。現在、これらの結果を専門誌に報告するために準備を進めている。

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

1)Stk25-LKB1 signal has possible roles in neuronal development and function.

松木亨、飯尾明生、中山敦雄

日本組織培養学会第 89 回大会

大阪 2016/5/25-26.

2) 神経極性制御に関わる Stk25-LKB1 シグナルが神経系の発達と機能に果たす役割

松木亨

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所シンポジウム「培養神経細胞の可能性」

大阪 2016/5/27

3) Stk25 欠損マウスの発達において MST3 が果たす代償的役割

松木亨、飯尾明生、中山敦雄

日本組織培養学会第 90 回大会

2017/6/30-7/1 岡山

4) Stk25 and MST3 act on neuronal polarization, migration, and cardiovascular development with compensation manner.

松木亨、飯尾明生、上田昌史、戸谷明恵、中山敦雄

平成 29 年度「先端モデル動物支援」成果発表会

2018/1/24-1/25 滋賀

5) Stk25 and MST3 act on neuronal polarization and migration in a compensation manner.

松木亨、飯尾明生、上田昌史、戸谷明恵、中山敦雄

第 41 回日本神経科学大会

2019/7/26-29 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 中山敦雄、Brian W. Howell
ローマ字氏名：Atsuo Nakayama, Brian W. Howell

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。