

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08283

研究課題名(和文) 新規中枢神経系形成不全性疾患：滑脳症・小脳症が同時に発症する分子機構の解明

研究課題名(英文) Clarify the pathogenic mechanism of microlissencephaly

研究代表者

金 明月 (Jin, Mingyue)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60740404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、滑脳症と小脳症の特徴を同時に併せ持つ小脳滑脳症(microlissencephaly)の発症機構を解明するため、その原因遺伝子であるカタニンp80の機能解析をin vitroとin vivoで行なった。小脳症と滑脳症が同時に発症することは、神経幹細胞の分裂と神経細胞の遊走に共通する領域が存在し、その要にカタニンp80がキー役割を果たすことが考えられる。我々はこのポイントに注目して研究を進め、カタニンp80がNuMAと細胞質ダイニンを介して中心体及びその周辺での微小管ネットワークの再編を制御することにより神経幹細胞の分裂と神経細胞遊走に関わることが証明された。

研究成果の概要(英文)：In this project, we performed functional analyses of katanin p80, a pathogenic causing gene of microlissencephaly. This congenital neurodevelopmental disorder has the clinical features of both microcephaly and lissencephaly. To date, mutations on the genes correlated with proliferation of neural progenitors cause microcephaly, and associated with the neuronal migration induces lissencephaly. This highlight critical functions for katanin p80 during neurogenesis and neuronal migration, suggesting the existence of a common pathophysiological pathway responsible for microcephaly and lissencephaly. In this study, we demonstrated that katanin p80 regulates microtubule (MT) remodeling with NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus protein) and cytoplasmic dynein. Our findings provide valuable insights into the pathogenesis of severe microlissencephaly, in which p80 and NuMA delineate a common pathway for neurogenesis and neuronal migration via microtubule organization at the centrosome/spindle pole.

研究分野：分子生物学

キーワード：中枢神経形成不全 カタニンp80 細胞質ダイニン NuMA 微小管ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

成熟した大脳皮質は、その形態と機能が厳密に制御されている6層の構造をとり、これらの層構造は、側脳室に面した脳室帯での神経幹細胞の増殖・分化と神経細胞の遊走により構築される。従って、神経幹細胞の増殖・分化と神経細胞の遊走を制御する遺伝子の変異はさまざまな中枢神経系形成不全症及び神経変性疾患の原因となっている。これまでの研究では、神経幹細胞の増殖にかかる遺伝子の変異は小脳症を引き起こし、神経細胞の遊走にかかる遺伝子の変異は滑脳症の原因であると考えられていた。従って、小脳症と滑脳症は二つ異なった疾患であると考えられてきたが、その両者の特徴をあわせ持つ疾患が海外の共同研究者 Reversade 博士(IMB、シンガポール)により発見され、カタニン p80 の変異が発症の原因であることが明かとなった。しかし、カタニン p80 変異がどのようにしてこのような重い中枢神経系形成不全を引き起こすかに関しては、まったく不明である。

我々の研究グループは、これまで滑脳症の原因遺伝子・LIS1 の機能解析に取り組んできていて、LIS1 が細胞質ダイニンの制御因子であることを明らかにした。さらに、LIS1 は細胞質ダイニンを微小管上に固定させ、プラス端へ細胞質ダイニンを輸送するのに貢献していることを解明した。興味深いことに、カタニン p80 は N 末端に LIS1 と相同な WD40 ドメインを持っており、機能的には一部 LIS1 とも共通することが示唆されていた。そこで、我々はカタニン p80 も LIS1 と同様に微小管上における細胞質ダイニンの運動性をブロックする機能があることを明らかにした。さらに、カタニン p80 は有糸分裂紡垂体の制御因子である NuMA と相互作用することを発見した。これらの結果から、カタニン p80 は NuMA と細胞質ダイニンを介して細胞内の微小管ネットワークを制御し、神経幹細胞

の増殖・分化における紡錘体形成、細胞極性の制御、さらに神経細胞の遊走時における微小管ネットワークの再編を制御している可能性が示唆され、本研究計画を提案することとなった。

2. 研究の目的

本研究では、カタニン p80 の変異がどのように小脳症と滑脳症の両者を同時に発症させるかを明らかにする。最近、カタニン p80 の変異が小脳症と滑脳症の特徴をあわせ持つ新規の中枢神経系形成不全を引き起こすことが判明された。我々は、カタニン p80 が細胞分裂の制御因子の一つである NuMA 及び神経細胞遊走に関わる細胞質ダイニンと相互作用することを突き止めた。これらの結果に基づいて、カタニン p80 による NuMA と細胞質ダイニンの制御を介した神経幹細胞の増殖・分化における紡錘体形成、分裂軸の制御を明らかにする。さらに、神経細胞遊走における微小管ネットワーク再編へのカタニン p80 の役割を解明することにより新規中枢神経系形成不全性疾患である小脳症と滑脳症を同時に発症させる分子機構を解明することを目指す。

3. 研究の方法

本研究計画では、神経幹細胞の増殖・分化と神経細胞遊走の共通メカニズムである微小管ネットワーク再編へのカタニン p80 の制御機構を明らかにすることで、小脳症と滑脳症の両者を同時に発症させる分子機構を解明する。具体的には、(1)組み替えカタニン p80、NuMA と細胞質ダイニンをを用いて微小管ネットワーク形成に与える影響を *in vitro* で解析する。(2)カタニン p80、NuMA を siRNA でノックダウンし、*in vivo* での微小管ネットワーク形成に与える影響を解析する。さらにカタニン p80 のノックダウンを NuMA で、逆に NuMA のノックダウンをカタニン p80 でレスキューできるかどうか解析し、両者の機能的

関係を解明する。(3) *In utero* でマウス胎児脳に核酸を導入し、脳組織における神経幹細胞の分裂と神経細胞の遊走を解析することによりカタニン p80 が与える効果を明らかにする。(4)患者由来の神経前駆細胞を用いた解析を行い、カタニン p80 が神経細胞への分化・増殖と神経細胞の遊走に与える影響を明らかにする。これらの解析により、カタニン p80 が果たす神経幹細胞の分裂と神経細胞遊走への役割を明らかにする。

4. 研究成果

本研究プロジェクトでは、小脳症と滑脳症が同時に発症する分子機構の解明を目指して、発症の原因遺伝子であるカタニン p80 の機能解析を進めてきた。滑脳症と小脳症が同時に発症することから、両者には共通する領域が存在し、その要にカタニン p80 が重要な働きをすることを示唆する。我々は、小脳症に関わる神経幹細胞の増殖・分化と滑脳症に関わる神経細胞の移動に極めて重要である中心体の微小管ネットワークの制御であることを突き止めた。また、その点に着目して研究を進め、カタニン p80 が N 末端を介して神経細胞移動に関わっている細胞質ダイニンを制御し、C 末端を介して神経幹細胞の増殖・分化に関わっている細胞分裂制御因子 NuMA と相互作用することを見出した。即ち、カタニン p80 は中心体及びその周辺で細胞質ダイニンと NuMA を介して微小管ネットワークの再編を制御することにより、神経幹細胞の分裂と神経細胞の遊走に関わることを明らかにし、小脳滑脳症(microlissencephaly)の発症メカニズムの解明に大きく貢献することができた。

本研究課題を含む我々のこれまでの研究から、滑脳症の原因遺伝子 LIS1 と小脳滑脳症の原因遺伝子 p80 がともに細胞質ダイニンの運動活性と細胞内局在を制御することを報告した。さらに、LIS1 が神経細胞内におい

て“荷台”となる特殊な微小管フラグメント (PALM 画像で確認された長さは $\sim 1 \mu\text{m}$)上に細胞質ダイニンを可逆的に固定することで輸送複合体を形成し、アダプター因子 mNudC とキネシンによって順向性に運ばれることを報告した。これらの研究をさらに発展させる形で、末梢神経から細胞質ダイニンの順向性輸送に必要な“荷台”の形成に関わる因子を同定することにした。そのため、結紮したラットの大腿神経を用いた LC-MS/MS の解析と電子顕微鏡法を用いた構造解析を行い、“荷台”となる特殊な微小管フラグメントにはパーキンソン病の原因遺伝子である α -Synuclein (α Syn)が結合することを発見した。さらに、*in vitro* での微小管の重合実験では α Syn が選択的に 14 本のプロットフィラメント(14-pfs)の微小管に結合することを見出した。これらの結果は、“荷台”は 14-pfs の微小管フラグメントであることを示唆する。我々の研究成果は、 α Syn の変異によって発症する神経変性疾患の発症機構の解明に新しい証拠を提供することになる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Jin M., Toba S., Yamada M., Kumamoto K., Matsumoto S., Yasunaga T., Fukunaga Y., Miyazawa A., Fujita S., Itoh K., Fushiki S., Kojima H., Wanibuchi H., Arai Y., Nagai T. & Hirotsune S. Alpha-synuclein facilitates to form short unconventional microtubules that have a unique function in the axonal transport. *Scientific Reports*, **7(1): 16386** (2017), DOI: 10.1038/s41598-017-15575-3 (査読あり)
- (2) Jin M., Pomp O., Shinoda T., Toba S., Torisawa T., Furuta K., Oiwa K., Yasunaga T., Kitagawa D., Matsumura S., Miyata T., Tan T., Reversade B. & Hirotsune S.

Katanin p80, NuMA and dynein cooperate to control microtubule dynamics. *Scientific Reports* 7: 39902 (2017), DOI: 10.1038/srep39902 (査読あり)

[学会発表](計 4件)

- (1) Jin M., Toba S., Matsumoto S. & Hirotsune S. Alpha-synuclein has a unique function in axonal transport. *The 12th Biennial Conference of Chinese Neuroscience Society*, (China, 2017).
- (2) Jin M., Pomp O., Toba S., Tan T.T., Reversade B. and Hirotsune S. Katanin p80 regulates microtubule organization with NuMA and cytoplasmic dynein during neural proliferation and migration. *2016 World Life Science Conference*, (China, Nov 2016).
- (3) 金明月、Oz Pomp、篠田友康、鳥羽栞、鳥澤高行、古田健也、大岩和弘、安永卓生、北川大樹、宮田卓樹、Bruno Reversade、広常真治。カタニン p80 による微小管ネットワーク構築の制御。生体運動合同班会議、2016。
- (4) Jin M., Pomp O., Reversade B. and Hirotsune S. Katanin p80 regulates microtubule organization via cytoplasmic dynein during brain development. *9th Asian Biophysics Association Symposium 2015*, (China, 2015).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 明月 (JIN Mingyue)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：60740404

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

広常 真治 (HIROTSUNE Shinji)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80337526

松本 早紀子 (MATSUMOTO Sakiko)
大阪市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00789654

山田 雅巳 (YAMADA Masami)
福井大学・学術研究院医学系部門・教授
研究者番号：10322851

安永 卓生 (YASUNAGA Takuo)
九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授
研究者番号：60251394

宮田 卓樹 (MIYADA Takaki)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：70311751

大岩 和弘 (OIWA Kazuhiro)
国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所・主管研究員
研究者番号：10211096

古田 健也 (FURUTA Ken'ya)
国立研究開発法人情報通信研究機構・研究員
研究者番号：40571831

鳥羽 栞 (TOBA Shiori)
弘前医療福祉大学短期大学部、教授
研究者番号：40419891

(4) 研究協力者

宮澤 敦夫 (MIYAZAWA Atsuo)

永井 健治 (NAGAI Kakeharu)

Reversade Bruno (REVERSADE Bruno)

Pomp Oz (POMP Oz)