

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14949

研究課題名(和文) Vangl2の神経形態形成に関わる分子機構および成体における生理的意義の解明

研究課題名(英文) Physiological roles of Vangl2 in neural development.

研究代表者

飛田 耶馬人(HIDA, Yamato)

山梨大学・医学部・技術職員

研究者番号：50570264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はVangl2が関与している神経の形態形成に、どのような分子が関わって影響しているのかを解析することを目的とした。Vangl2相互作用因子を探索し、候補分子を26個特定した。このうち候補分子の発現ベクターを海馬に発現させることで、神経細胞の樹状突起の長さが増大することがわかった。またVangl2の脳領域特異的欠損マウスを作成し、神経回路形成や行動学にどのような影響があるのかを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経同士の接合部であるシナプスは脳が高次機能を発揮するために必須であり、学習・記憶・情動などさまざまな神経活動に関与している。本研究ではシナプス後部に局在しているVangl2が神経細胞の樹状突起の形態形成に関与していることを明らかにした。今後、本研究で得られた神経の形態形成に関わる因子を解析することで、各種神経変性疾患の解明につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to analyze what molecules are involved in the morphogenesis of neurons in which Vangl2 is involved. We searched for the Vangl2 interaction factor and identified 26 candidate molecules. Among them, it was found that by expressing the candidate molecule in the hippocampus, the total length of the dendrite is increased. In addition, we created a brain region-specific Vangl2 deficient mice and analyzed how it affects neural network formation and behavioral science.

研究分野：神経科学

キーワード：平面内細胞極性 Vangl2 神経形態形成 神経 シナプス

1. 研究開始当初の背景

認知、思考、記憶といった脳高次機能が正常に働くためには、層構造や神経回路網の形成が適切に行われることが不可欠である。神経回路網の基盤となっているのはシナプスであり、シナプスが適切に形成されるためには、神経細胞の樹状突起が適切な分枝パターンを形成することが重要となってくる。そのため、樹状突起の形態形成不全は自閉症スペクトラム障害や知的障害といった精神疾患の発症に深く関与していると考えられている。したがって、樹状突起形態形成の分子機構を明らかにし、この経路の異常によって引き起こされる変化を神経細胞から個体行動に至るまで様々なレベルで明らかにしていくことは、精神疾患の病態解明の足がかりを得ることに役立つと考えられる。

樹状突起形態形成において、重要な役割を担っていると考えられる経路として、平面細胞内極性 (PCP, Planar cell polarity) 因子がある。PCP は上皮細胞の頂底軸と垂直な平面に形成される細胞極性で、コア PCP と呼ばれる数種類のタンパク質が PCP 経路の主要な役割を担っている。コア PCP は中枢神経系にも広く発現し、発達期に神経細胞の移動や、軸索伸長、樹状突起の形態形成に関与していることが徐々に明らかになりつつあり、PCP 以外の極性形成や、神経細胞の形態形成においても重要な役割を担っていることが示唆されている (Goodrich, 2008)。コア PCP の1つである Van Gogh-like (Vangl) 2 は、胎生期の脳では脳室帯に強く発現し、交連神経や視神経の軸索伸長を調節していることが報告されている (Shafer et al., 2011, Vicki et al., 2015)。申請者らは生化学的な解析から、Vangl2 は C 末端の細胞質内領域で別のコア PCP である Prickle2 と相互作用し、C 末端の PDZ 結合ドメインでシナプス後部肥厚部の主要な足場タンパク質である PSD-95 と相互作用することを明らかにしている (Yoshioka et al., 2013)。さらに、ラット海馬培養神経細胞を用いた形態解析から、Vangl2 はシナプス後部に局在し、樹状突起の分枝パターンやスパイン密度の制御に関与していることを世界に先駆けて報告している (Hagiwara et al., 2014)。Vangl2 は胎生期から成体に至るまで発現している点を踏まえると、個体発生のみならず成体でも樹状突起形態形成やシナプスの維持といった何らかの働きを担っていると考えられ、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

神経回路網が適切に形成されることは脳が正常に機能するために不可欠である。神経回路網の基盤となっているのはシナプスであり、シナプス形成や再編成の破綻は精神疾患の発症に深く関与していると考えられている。申請者らはこれまでに平面細胞内極性因子 Vangl2 がシナプス後部に局在し、神経細胞の樹状突起形態形成に関与していることを明らかにしている。本研究は Vangl2 の神経形態形成に関わる分子機構および成体における生理的意義の解明を目的とし研究を実施した。

3. 研究の方法

- (1) Yeast two hybrid 法による候補分子のスクリーニングおよび結合領域の特定
- (2) 候補分子を過剰発現もしくはノックダウンするためのベクター構築
- (3) 海馬初代培養神経細胞を用いた樹状突起形態解析
- (4) 部位特異的 Vangl2 欠損マウスの行動解析による脳機能への寄与の解明

4. 研究成果

- (1) Yeast two hybrid 法による候補分子のスクリーニングおよび結合領域の特定
これまでの解析から Vangl2 が神経細胞のシナプス後部に局在し、神経棘の密度や樹状突起の分岐に関与することが示唆されていた。ラット海馬培養神経細胞に 4 回膜貫通ドメインの C 末端側を欠損した Vangl2 を発現させると分岐が増加する一方、N 末端側を欠損する Vangl2 の場合は分岐が減少したことから、Vangl2 は分岐を正にも負にも制御することが示唆されていた (Hagiwara et al., 2014 Mol. Brain)。この結果から Vangl2 に相互作用する因子が分岐の制御を担っていると考えられたため、Yeast two hybrid 法 (Y2H 法) による相互作用分子のスクリーニングを実施した。
二次スクリーニングまでに得られたライブラリーの DNA 配列を解析し、独立した 280 個の遺伝子が同定された。このうち、文献やデータベースの情報から無関係と思われる候補を除外し、39 個の候補分子が同定された。これらについて HEK293 細胞で発現させ、GST-Vangl2 との結合について Pull-down assay で再確認したところ、26 個において結合が確認できた。
- (2) 候補分子を過剰発現もしくはノックダウンするためのベクター構築
(1) のスクリーニングで同定した Vangl2 との相互作用候補分子 26 個について、ラット海馬培養神経細胞で過剰発現もしくは発現抑制を行うためのベクターを構築した。

(3)海馬初代培養神経細胞を用いた樹状突起形態解析

(2)で構築したノックダウンベクターを in utero エレクトロポレーションにより胎生 13 日齢のマウスに導入し、樹状突起の分岐の変化を解析したところ、候補 3 つにおいて樹状突起の長さが増加していた。

(4)部位特異的 Vangl2 欠損マウスの行動解析による脳機能への寄与の解明

Vangl2 は胎生の発生期においても大脳皮質、海馬、線条体、小脳外顆粒細胞などに発現することが知られており(Tissir and Goffinet, 2006)、発生期における Vangl2 の欠損や変異は重篤な神経管閉鎖障害を引き起こし胎生致死となる。このため Vangl2 を部位や時期特異的に欠損させるため、Vangl2 遺伝子を Cre 組換え酵素の認識配列である loxP で挟んだ (Vangl2 floxed)マウスを樹立した。Vangl2 floxed マウスに、神経細胞特異的(Nestin-Cre)、前脳神経細胞特異的(CaMKII-Cre)および小脳顆粒細胞特異的(E3CreN)、また薬剤投与により Cre の発現時期を調節できる神経細胞特異的 (Nestin-CreERT2) マウス系統と交配し、それぞれの条件欠損マウスを産出した。その結果、他の Vangl2 欠損マウスにおいてみられるループテイルの表現型が観察された。海馬での新生の神経細胞の嗅球への移動において Vangl2 が関与している可能性を検証するため、Vangl2 欠損マウスと野生型マウスにおける細胞輸送形態を観察したが有意な差は見られなかった。

以上の結果から、Vangl2 は発生過程において細胞内にある N 末端や C 末端の領域を介して他の分子と相互作用することで神経の樹状突起の形態を制御していることが示唆された。樹状突起形成の破綻は精神疾患の発症に深く関与すると考えられており、今後、得られた候補分子の解析を進めることで樹状突起形態形成の分子機構に新たな知見を加えることができれば、精神疾患の症状を緩和するための創薬の新たな分子ターゲットを見つけることに貢献できると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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

<https://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bioche01/>

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：

ローマ字氏名：

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。