

機関番号 : 24402

研究種目 : 基盤研究 (B)

研究期間 : 2008-2010

課題番号 : 20390084

研究課題名 (和文) 中枢神経系の形態形成と機能における細胞内物質輸送機構の解明。

研究課題名 (英文) Elucidation of regulatory mechanisms of cytoplasmic dynein.

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文) :

我々は細胞質ダイニンの制御機構の解明に取り組んできた。細胞質ダイニンは微小管上を双方向に走るがプラス端に向かって走るメカニズムは不明であった。我々は滑脳症の原因遺伝子・LIS1 が細胞質ダイニンを微小管上に固定し、微小管-LIS1-細胞質ダイニンの複合体を形成し、キネシン依存的に運搬することを明らかにした。さらにアスペルギルスにおける Nud 遺伝子群の NudC がキネシンのアダプタータンパク質として機能していることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) :

Lissencephaly is a devastating neurological disorder caused by defective neuronal migration. The *LIS1* (or *PAFAH1B1*) gene was identified as the gene mutated in lissencephaly patients, and was found to regulate cytoplasmic dynein function and localization. In particular, LIS1 is essential for anterograde transport of cytoplasmic dynein as a part of the cytoplasmic dynein-LIS1-microtubule complex in a kinesin-1-dependent manner. Here, we report that mNUDC (mammalian NUDC) interacts with kinesin-1 and is required for the anterograde transport of a cytoplasmic dynein complex by kinesin-1. Our findings have uncovered an essential role of mNUDC for anterograde transport of dynein and dynactin by kinesin-1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：(B) 細胞医化学

1. 研究開始当初の背景

ヒトが記憶・学習をはじめとする高度な精神機能を発揮する上で、発生段階における神経細胞の分化と適切な配置、さらに神経細胞のネットワーク形成に基づいた情報の伝達、処理は重要な基礎となる。我々は神経細胞の遊走異常による脳の形成不全である滑脳症の研究に取り組んできた。滑脳症は大脳皮質の層構造の異常を示し、重度の精神遅滞とてんかんを特徴とする。原因遺伝子・LIS1は細胞質ダイニンの制御因子であることが分かってきたがその分子機構は不明であった。細胞質ダイニンは神経細胞の発生だけでなく細胞内物質輸送の担い手として重要な役割を果たしている。その制御機構の解明は細胞生物学の最も重要な研究課題の一つである。

2. 研究の目的

我々は本研究計画でモータータンパク質である細胞質ダイニンの制御と微小管ネットワークのコントロールが果たす中枢神経系の形態形成と神経細胞の機能における役割を解明する。ヒトが記憶・学習をはじめとする高度な精神機能を発揮する上で、発生段階における神経細胞の分化と適切な配置、さらに神経細胞のネットワーク形成に基づいた情報の伝達、処理は重要な基礎となる。我々は神経細胞の遊走異常による脳の形成不全である滑脳症の研究に取り組んできた。LIS1の結合タンパク質であるNde1とともに細胞質ダイニンと微小管ネットワークの制御因子であることを発見した。細胞質ダイニンは微小管上をマイナス端に向かって走

るモータータンパク質であり、細胞分裂における染色体分配、オルガネラの移動など重要な役割を果たしている。本研究計画では神経細胞における物質輸送の制御機構の解明、神経細胞のネットワーク形成のメカニズムを明らかにし、高次脳機能がどのように達成されているかを明らかにする。

3. 研究の方法

1 細胞内におけるモータータンパク質のイメージング。

FRAPを用いた解析はタンパク質の動きの総体を迅速に観察することはできるが個々のタンパク質の動きを確定的に見ることはできない。そこで蛍光標識したLIS1、Nde11、細胞質ダイニン、キネシンなどを背側神経根細胞に発現させ、1分子蛍光イメージング法を用いて分子レベルでの運動を観察する。既に我々は背側神経根細胞の軸索内でのLIS1、Nde11、細胞質ダイニン、キネシンなどの観察に成功している。また、チューブリンを蛍光標識した解析からチューブリンもダイナミックに運搬されていることが突き止めた。これらの観察を進めて各タンパク質のダイナミックな局在の一致、不一致を観察する。特に順行性の移動における細胞質ダイニン-LIS1-微小管の複合体の解析に重点を置く。また、この複合体にはNde11が存在しないことを明らかにする。逆行性の運動に関しては細胞質ダイニン-LIS1-Nde11の複合体形成のイメージングに主眼をおいて観察する。

2 神経細胞内における微小管の運搬と役割の解明。

我々は細胞質ダイニンの運搬の解析から細胞内において微小管がダイナミックに運ばれていることを明らかにした。特にイメージングの結果からこれらの微小管は従来の細胞内骨格として機能している長い繊維状のものではなく、比較的小さいものであることが示唆されている。今回このような微小管が物質輸送において細胞内骨格の微小管の様なレール以外の機能があることが初めて明らかとなったがその構造は不明である。この特殊な微小管の構造と機能を明らかにするために、イメージングによって軸索内で安定してリサイクルしているかどうか解析する。もし安定してリサイクルしているものであれば単なる微小管の断片でなく特殊な構造をしていることが示唆される。次にこのような微小管を神経細胞から取り出し、電顕によって構造解析をする。さらにこの微小管を蛍光標識し、再び神経細胞に打ち込み、運搬される微小管としての機能が再現されるかどうか解析する。

4. 研究成果

細胞内における物質輸送は細胞が恒常性を維持するのに必須である。なかでもモータータンパク質は細胞内物質輸送の主要な担い手である。モータータンパク質は微小管を走る細胞質ダイニンとキネシン、アクチンを走るミオシンに分けられる。我々の中でも細胞質ダイニンの制御機構の解明に取り組んできた。細胞質ダイニンは微小管上を双方向に走るがプラス端に向かって走るメカニズムは不明であった。我々は滑脳症の原因遺伝子・LIS1が細胞質ダイニンを微小管上に固定し、微小管-LIS1-細胞質ダイニンの複合体を形成し、キネシン依存的に運搬することを明らかにした。さらにアスペルギルスにおけるNud遺伝子群のNudCがキネシンのアダプタータンパク質として機能していることを明らかにした。このことからLIS1が変異を起こすと細胞質ダイニンの順行性の運搬が障害され、細胞内における細胞質ダイニンの局在が中心体に偏った分布を示し、細胞の末梢部分で枯渇することが分かった。このことがLIS1の変異に伴う神経細胞の遊走異常、また細胞分裂における紡錘

体形成や染色体分配の異常につながるものが分かってきた。また、NudCの変異は細胞質ダイニンの順行性の運搬のみならず、他のオルガネラの運搬も障害されることから、NudCはキネシンの一般的なアダプタータンパク質として機能していることが示唆された。

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 11 件)

- ① Torisawa, T., Nakayama, A., Furuta, K., Yamada, M., Hirotsune, S., and Toyoshima, Y. (2011) Functional dissection of LIS1 and NDEL1 towards understanding the molecular mechanisms of cytoplasmic dynein regulation, *J Biol Chem* 286, 1959-1965. (査読有)
- ② Pramparo, T., Libiger, O., Jain, S., Li, H., Youn, Y. H., Hirotsune, S., Schork, N. J., and Wynshaw-Boris, A. (2011) Global developmental gene expression and pathway analysis of normal brain development and mouse models of human neuronal migration defects, *PLoS Genet* 7, e1001331. (査読有)
- ③ Ibi, M., Zou, P., Inoko, A., Shiromizu, T., Matsuyama, M., Hayashi, Y., Enomoto, M., Mori, D., Hirotsune, S., Kiyono, T., Tsukita, S., Goto, H., and Inagaki, M. (2011) Trichoplein controls microtubule anchoring at the centrosome by binding to Odf2 and ninein, *J Cell Sci.* (査読有)
- ④ Yamada, M., Toba, S., Takitoh, T., Yoshida, Y., Mori, D., Nakamura, T., Iwane, A. H., Yanagida, T., Imai, H., Yu-Lee, L. Y., Schroer, T., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S. (2010) mNUDC is required for plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein and dynactins by kinesin-1, *EMBO J* 29, 517-531. (査読有)
- ⑤ Pramparo, T., Youn, Y. H., Yingling, J., Hirotsune, S., and Wynshaw-Boris, A. (2010) Novel embryonic neuronal migration and proliferation defects in Dcx mutant mice are exacerbated by Lis1 reduction, *J Neurosci* 30, 3002-3012. (査読有)
- ⑥ Youn, Y. H., Pramparo, T., Hirotsune, S., and

Wynshaw-Boris, A. (2009) Distinct dose-dependent cortical neuronal migration and neurite extension defects in *Lis1* and *Ndel1* mutant mice, *J Neurosci* 29, 15520-15530. (査読有)

⑦ Yamada, M., Yoshida, Y., Mori, D., Takitoh, T., Kengaku, M., Umeshima, H., Takao, K., Miyakawa, T., Sato, M., Sorimachi, H., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S. (2009) Inhibition of calpain increases LIS1 expression and partially rescues in vivo phenotypes in a mouse model of lissencephaly, *Nat Med* 15, 1202-1207. (査読有)

⑧ Mori, D., Yamada, M., Mimori-Kiyosue, Y., Shirai, Y., Suzuki, A., Ohno, S., Saya, H., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S. (2009) An essential role of the aPKC-Aurora A-NDEL1 pathway in neurite elongation by modulation of microtubule dynamics, *Nat Cell Biol* 11, 1057-1068. (査読有)

⑨ Arimura, N., Hattori, A., Kimura, T., Nakamura, S., Funahashi, Y., Hirotsune, S., Furuta, K., Urano, T., Toyoshima, Y. Y., and Kaibuchi, K. (2009) CRMP-2 directly binds to cytoplasmic dynein and interferes with its activity, *J Neurochem* 111, 380-390. (査読有)

⑩ Yingling, J., Youn, Y. H., Darling, D., Toyo-Oka, K., Prampero, T., Hirotsune, S., and Wynshaw-Boris, A. (2008) Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division, *Cell* 132, 474-486. (査読有)

⑪ Yamada, M., Toba, S., Yoshida, Y., Haratani, K., Mori, D., Yano, Y., Mimori-Kiyosue, Y., Nakamura, T., Itoh, K., Fushiki, S., Setou, M., Wynshaw-Boris, A., Torisawa, T., Toyoshima, Y. Y., and Hirotsune, S. (2008) LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein, *EMBO J* 27, 2471-2483. (査読有)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/biochem2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：