

機関番号：82611

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580335

研究課題名（和文）Reelin シグナルにおける転写因子としての Dab1 の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of Dab1 as a transcription factor for transmission of Reelin signaling

研究代表者

守村 敏史（MORIMURA TOSHIFUMI）

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第二部

流動研究員

研究者番号：20333338

研究成果の概要（和文）：Reelin は、胎仔大脳皮質遍縁帯に存在する Cajal-Retzius 細胞より分泌され、移動中の投射ニューロンの細胞内アダプター蛋白質 Dab1 のチロシンリン酸化を誘導する事により、これらの移動と位置を決定する。私は期間中、Dab1 欠損マウスの胎仔大脳皮質に Dab1 遺伝子の強制発現を行う事により、遺伝子導入細胞特異的に神経細胞の移動障害が回復する実験系を構築した。この実験系を用いて、Reelin によりリン酸化される 4 つのチロシン残基の相補的な役割と、Reelin シグナルの下流で Dab1 が転写因子として遺伝子発現を調節する事により、投射ニューロンの移動を制御している可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Reelin is secreted by Cajal-Retzius cells and regulates radial migration of projection neurons in the developing cerebral cortex by inducing tyrosine phosphorylation of an intracellular adaptor protein, Dab1. During the period of this grant, I established a suitable system for analyzing Reelin signaling *in vivo* based on *in utero* electroporation with exogenous Dab1 genes into the Dab1-deficient cerebral cortices. Using this system I determined relative importance of the phosphotyrosines of Dab1 to the transmission of Reelin signaling, and I found a possibility that Dab1 may function as a transcription factor to transmit Reelin signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：Reelin、Dab1、Src ファミリーチロシンキナーゼ、チロシンリン酸化、投射ニューロン、放射状移動、大脳皮質、転写因子

1. 研究開始当初の背景

（1）胎仔大脳皮質遍縁帯に位置する Cajal-Retzius 細胞より産生される Reelin は、大脳皮質における投射ニューロンの放射状移動と位置決定に中心的役割を担っている。

Reelin は細胞質アダプター蛋白質 Dab1 の Src ファミリーチロシンキナーゼ（SFK）によるチロシン残基のリン酸化を介し、移動中の未熟ニューロンにシグナルを伝達する事が明らかとなっていたが、5 つある標的リン酸

化部位のそれぞれの役割や、リン酸化以降のシグナル経路は、明らかとされてはいなかった。

(2) Dab1 はその構造上、受容体の endocytosis や細胞内輸送に重要な phosphotyrosine binding (PTB) ドメインを有する一群のタンパク質群に分別される事から、私は Dab1 による Reelin 並びに Reelin 受容体の細胞内局在の調節機構に着目し研究を進め、Dab1 のチロシン残基のリン酸化を薬理的に阻害すると、Reelin 受容体の endocytosis が消失する事を明らかにした。更に、Dab1 は細胞表面では Reelin の局在と一致するが、endocytosis 後 Reelin の局在から Dab1 のシグナルが消失する事が明らかとなり、Dab1 は endocytosis 後 Reelin 受容体から解離する事が示唆された。そこで Reelin 刺激に伴う Reelin 受容体の endocytosis 後の Dab1 の細胞内局在の変化を詳細に解析する事により、リン酸化以降の Dab1 の機能の解明に着手した。

2. 研究の目的

Dab1 は長く『細胞質』アダプター蛋白質として認識されていたが、その N 末端と C 末端に典型的な核移行シグナルと核外排出シグナルを有する事が報告され、私は核での Dab1 の機能に着目した。特に Dab1 に構造上非常に近い Dab2 が転写因子として機能しう事が明らかにされた事から、転写因子としての可能性について着目した。本研究は、転写因子としての Dab1 の機能及び Reelin シグナルにおける役割を解明する事を目的としている。

3. 研究の方法

(1) Reelin 刺激後、Dab1 が核に移行しうるか否か検討する目的で、Reelin 欠損 reeler マウス由来大脳皮質神経細胞を Reelin で刺激し、細胞質・膜及び核分画について抗 Dab1 抗体並びに抗リン酸化チロシン抗体による Western blotting を行った。

(2) Dab1 が核に移行し転写を調節する可能性について検討する目的で、酵母由来 DNA 結合蛋白質 Gal4 に Dab1 を融合した組み換え蛋白質を Gal4 結合配列を持つレポーター遺伝子とともに HeLa 細胞に共発現させ、転写活性を解析した。また同様の実験を Dab1 の deletion 変異体についても行った。

(3) *in vivo* における外来性 Dab1 の機能を解析する目的で、胎齢 (embryonic day [E]) 13 日目の Dab1 欠損マウス大脳皮質の投射ニューロンに、電気穿孔法 (*in utero* electroporation) により野生型 Dab1 を強制

発現させ、表現系を回復させる実験系を構築した。更に、Reelin によりリン酸化される 4 カ所のチロシン残基 (Y) をフェニルアラニン (F) に置換した変異体を Dab1 欠損マウスの胎仔大脳皮質に導入し、それぞれのリン酸化部位の相補的役割について解明した。

(4) (3) で確立した実験系を用い、ヘルペスウイルス転写活性化因子である VP16 及びショウジョウバエの転写抑制因子である Engrailed の転写調節領域を Dab1 に融合し (それぞれ転写活性化型 Dab1 及び転写抑制型 Dab1)、Dab1 欠損マウスの胎仔大脳皮質の投射ニューロンに強制発現させその表現系を比較した。

4. 研究成果

(1) reeler マウス胎仔大脳皮質ニューロンを Reelin で刺激すると、Dab1 は二本のバンド (Dab1 upper [Dab1U]、Dab1 lower [Dab1L]) として検出された (図 1A)。Dab1L と Dab1U の量比は細胞質・膜分画 (C/M) では、Reelin 刺激の有無にかかわらず大きな差が認められなかったが、核分画 (N) では Dab1U の割合が顕著に増加した (図 1B)。Dab1U の増加は SFK 阻害剤である PP2 により消失したがネガティブコントロールの PP3 や DMSO では変化しない事から、Dab1 のチロシンリン酸化の影響である事が示唆された。

次にリン酸化 Dab1 が Dab1U と Dab1L のどちらに含まれるかを明らかにする目的で、抗 Dab1 抗体で免疫沈降を行ったサンプルについて抗リン酸化チロシン抗体により Western blotting を行った。その結果、抗リン酸化チロシン抗体は Dab1U とのみ反応する事が明らかとなった (図 1C)。Dab1 のチロシンリン酸化は細胞膜直下で起こる事から、核で増加した Dab1U は、Reelin 刺激後細胞膜直下でリン酸化された Dab1 が核に移行したものである事が示唆された。

(2) Dab1 に構造上非常に近い Dab2 が転写活性化因子として機能しう事が報告された事から、Gal4 融合 Dab1 遺伝子をレポーター遺伝子と HeLa 細胞に co-transfection し、レポーターアッセイを行った (図 2A)。Gal4 を導入した際のレポーター遺伝子の発現を基準にした場合、Gal4-Dab1 の転写活性は 4 倍増加した (図 2B)。また deletion 変異体で同様の解析を行ったところ、Dab1 の PTB ドメインを削った変異 Dab1 で非常に強い転写活性を示した (結果は示さず)。

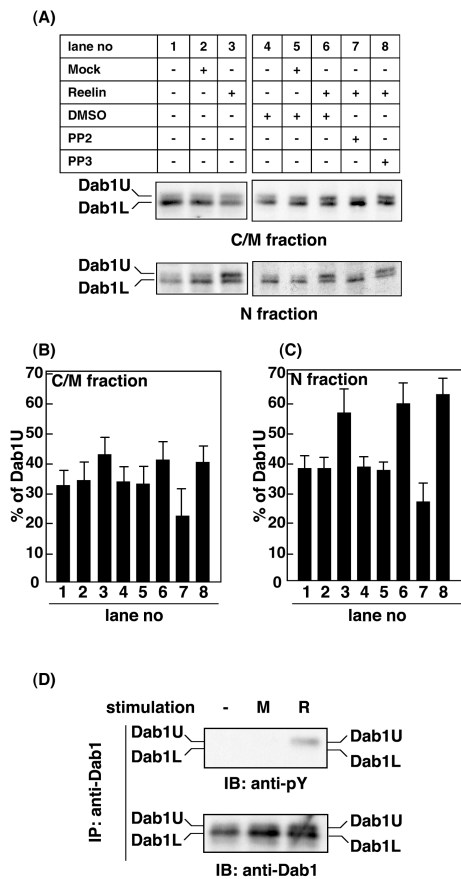


図1 Reelin刺激に伴うDab1Uの核での増加
(A) 細胞質・膜分画及び核分画におけるDab1のWestern blotting
(B) 各分画におけるDab1Uの割合
(C) 免疫沈降によるリン酸化Dab1の検出

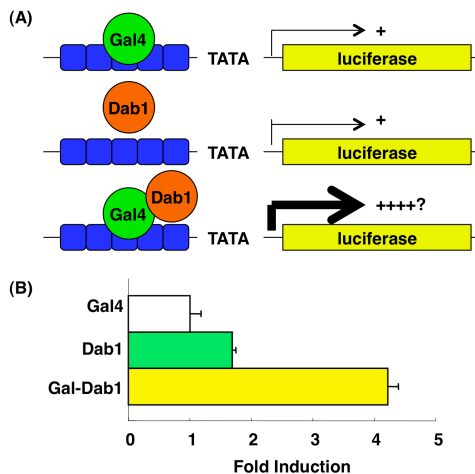


図2 Dab1の転写活性化能の検討
(A) 実験系のスキーマ
(B) Gal4融合Dab1による転写活性化

(3) Dab1欠損マウスに、外来性Dab1遺伝子を *in utero* electroporationにより強制発現させ、再構築系を確立した(図3)。まずE13の野生型(+/+)マウス的大脑皮質にコントロールとしてGFP遺伝子を導入したところ、3日後のE16までには大脑皮質の最上部まで到達した(図3A-C)。E18ではE13以降に誕生したニューロンに追い越されるため、GFPで標識されたE13生まれのニューロンは皮質深部で認められた(図3D)。同様にE13のDab1欠損マウス(yot/yot)的大脑皮質にGFP遺伝子のみを導入すると、野生型マウスとは異なりGFP陽性細胞はE16の時点で皮質全体に散在した(図3I)。これに対してE13のDab1欠損マウスにDab1遺伝子をGFP遺伝子と共発現させたところ、野生型マウスと同様E16までに発現細胞は大脑皮質最上部に集積し、遺伝子導入細胞の直下にはreelerマウスでは認められないサブプレート(SP)が形成された(図3E-G)。以上の結果より、Dab1欠損胎児仔大脑皮質への *in utero* electroporationによるDab1遺伝子の強制発現は、その表現系を回復する事が明らかとなった。また、Reelin受容体に結合できないDab1(S114T/F158V)変異体(図3J)や(その当時までに抗リン酸化抗体でリン酸化が確認されている)標的チロシンをフェニルアラニンに置換したDab1(Y198F/Y220F/Y232)変異体(図3K)ではDab1欠損マウスの表現系を回復する事ができなかった事から、表現系の回復はReelinシグナル依存的である事が証明された。

私は本実験系を利用して、Reelinシグナルにおける各チロシンリン酸化残基の相補的な役割についてE18の大脑皮質を用いて解析した(図4)。E13で導入されたDab1変異遺伝子のうち、Y185F/Y200F、Y198F、Y220F、Y232F、Y198F/Y220F、Y198F/Y232Fの変異を持つDab1は野生型Dab1同様Dab1欠損大脑皮質の表現系を回復する事ができたが、Y198F/Y220F/Y232F、Y185F/Y198F、Y220F/Y232Fの変異を持つDab1は、Dab1欠損大脑皮質の表現系を回復する事ができなかった。以上の結果より、Reelinによるリン酸化標的チロシン残基のうち、Y185とY198、及びY220とY232はそれぞれ機能的に相同な機能を有する事が明らかとなった。

蛋白質の各ドメインやアミノ酸の機能を個体で解析する際、遺伝子変異マウス(トランスジェニックマウス、ノックインマウスなど)の樹立が一般的である。ReelinシグナルにおけるDab1の機能解析も、同様に各種変異マウスを樹立する事により解析されてきたが、本実験系はこれら手法と比較し時間やコストの問題を大幅に節約でき、各種Dab1変異体や関連遺伝子のknock-downを併用する事により、今後Reelinシグナル解析の有

用なツールになる事が期待できる。

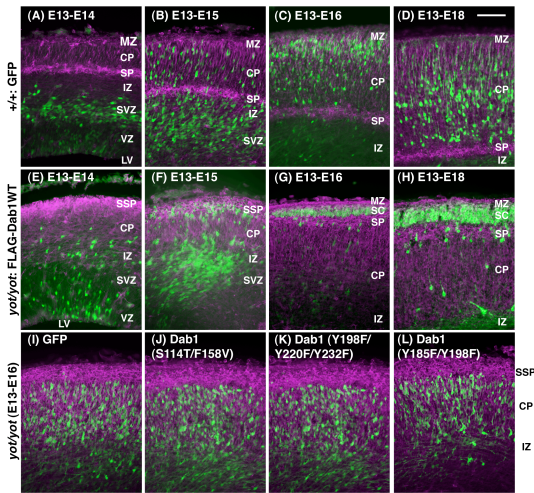


図3 外来性 Dab1 遺伝子の導入による Dab1 欠損大脳皮質の表現系の回復

図3-5において、緑は GFP、マジェンタは MAP2、スケールバーは 100 μm 、略語は以下の通り示している。

MZ, marginal zone; CP, cortical plate; SP, subplate; IZ, intermediated zone; VZ, ventricular zone; LZ, lateral ventricle; SPP, superficial preplate; SC, super cortex

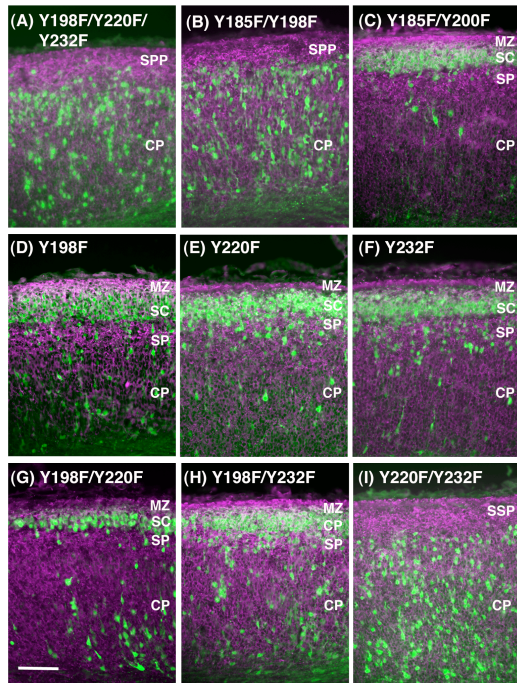


図4 ニューロンの移動と位置決定におけるそれぞれのチロシンリン酸化部位の役割

(4) (2) の解析より Dab1 は転写活性化因子として働く事が示唆された。この機能が

Reelin シグナルに関与しているか否か調べる目的で、VP16 融合 Dab1 (転写活性化型 Dab1) 及び Engrailed 融合 Dab1 (転写抑制型 Dab1) 遺伝子を GFP 遺伝子とともに E13 の Dab1 欠損マウスの大脳皮質に強制発現させ、E16 でその表現系を比較した。この手法はある蛋白質が DNA に結合して転写因子として機能するか否かを、VP16 や Engrailed の融合により、機能の低下や反転を指標に調べる解析方法である (図5A) その結果、転写活性化 Dab1 は野生型 Dab1 同様大脳皮質の最上部に E16 までに蓄積したが、転写抑制型 Dab1 はその移動が障害され、かなりの細胞が大脳皮質深部に認められた (図5B)。E18 の段階では転写抑制型 Dab1 発現細胞も大脳皮質最上部に蓄積していた事から (結果は示さず)、転写抑制型 Dab1 は Dab1 欠損マウスの表現系を回復する事はできるが、投射ニューロンの移動が野生型や転写活性化型 Dab1 発現細胞と比較して遅れる事が明らかとなった。

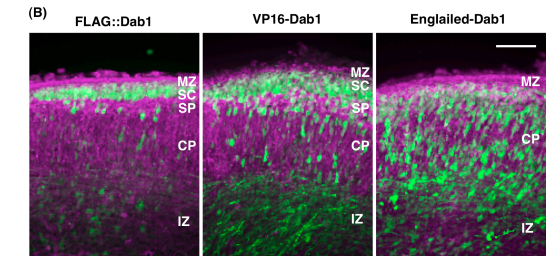
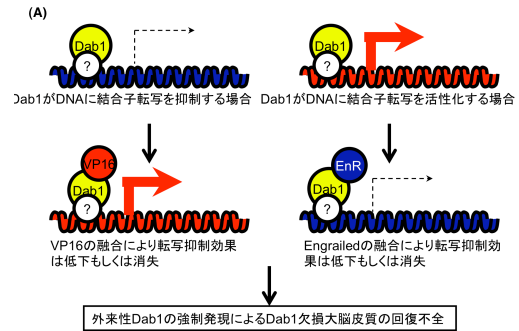


図5 転写活性化型 Dab1 並びに転写抑制型 Dab1 を導入した Dab1 欠損大脳皮質の表現系の比較

(A) 実験系のスキーマ

(B) 転写活性化型及び抑制型 Dab1 を強制発現させた時の細胞の分布

Reelin シグナルの機能としてニューロンの移動調節の他、神経系の高次機能の調節や神経変性疾患の関わりが示唆されているが示唆されているが、その分子機構は明らかにされていない。今後転写因子としての Dab1 の役割や関連遺伝子の同定が進めば、これら高次機能や疾患のメカニズムの解明に貢献できるかもしれない。

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)

Morimura T., Ogawa M.

Relative importance of the tyrosine phosphorylation sites of Disabled-1 to the transmission of Reelin signaling. Brain research 1304:26-37. 2009 (査読あり)

Morimura, T., Ogawa M.

Analysis of relative roles of the individual phosphotyrosine of Disabled-1 in Reelin signaling. Neuroscience Research, 65: S161, 2009 (査読無し)

[学会発表] (計1件)

Morimura, T., Ogawa M.

Analysis of relative roles of the individual phosphotyrosine of Disabled-1 in Reelin signaling. 第32回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、名古屋 9.17, 2009

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r2/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

守村 敏史 (MORIMURA TOSHIFUMI)

研究者番号：20333338

国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・流動研究員

(2)研究分担者

小川 正晴 (OGAWA MASAHARU)

理化学研究所・脳化学総合研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：50111951