

平成 22 年 3 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790069
 研究課題名 (和文) 脳形成を司る分泌蛋白質リーリンの、分布と機能部位を制御する分子メカニズム
 研究課題名 (英文) Molecular mechanism regulating the localization of Reelin and its functional Receptors.
 研究代表者
 馬場 敦 (BABA ATSUSHI)
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
 研究者番号：70405215

研究成果の概要 (和文)：分泌蛋白質リーリンは、脳の形成に必須の分子である。本研究では、リーリン蛋白質の分布を制御する分子機構を解析した。機能的なリーリン受容体は新生直後の神経細胞に存在しており、その後神経細胞が最終位置に移動するまでに消失した。またリーリン蛋白質が結合する細胞外基質の検索をおこない、結合候補分子としていくつかの糖蛋白質を同定した。以上のことからリーリン蛋白質は、分泌されたのち単純拡散するのではなく、複雑な制御を受けていることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：Reelin is a secreted protein essential for brain development. We analyzed when and where Reelin acts in developing for brain. Functional Receptors are mainly present at newborn neurons, and they are downregulated at postmigrating neurons. We further identified some kinds of glycoproteins as candidate binding factor of Reelin at the extracellular milieu. These results suggest that Reelin protein is not merely a diffusive molecule, but also is affected by extracellular matrices or by acceptor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子神経生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：(1) 脳・神経 (2) 発生・分化 (3) 分泌蛋白質

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の脳皮質は六層の整然とした層構造を有する。この構造は各層毎に特定の脳領域からの神経投射を受け、適切な脳領域に情報を伝達する。したがって、発生時(胎生期)に適切な層構造が形成されることは、脳

の高次機能の発現に欠かせない。分泌蛋白質リーリンまたはリーリン受容体の遺伝子異常により、神経細胞移動の異常とヒト脳皮質や小脳の著しい形成異常を伴う滑脳症が引き起こされる。このような破綻は精神遅滞等の高次脳機能障害の原因となるが、実際に

発生過程の脳形成時に『いつ、どこで』リーリンが機能するのは全く明らかでない。そのためこれらの分子がいかんして機能し脳形成を制御するのは全く不明であった。このことは、脳形成の破綻・高次脳機能障害を理解し、患者の悩まされる社会的偏見の寛恕と将来的な治療へ貢献するにあたりきわめて重要な問題である。

リーリン蛋白質はリーリン産生細胞より分泌され単純に拡散し分泌部位近傍の神経細胞に受容されるものと考えられてきた。また、リーリン分泌細胞は大脳皮質の表層側（神経細胞移動の終点）に存在し、リーリン蛋白質濃度もこの付近で高い。このことから、リーリンは細胞移動の終点付近で機能するものと考えられてきた。

この問題に対して申請者は、以下の予備的知見を得た。(1) 神経細胞移動終了発生期の大脳皮質では、分泌部位の近傍のリーリン受容能はそれほど高くなく、遠く離れた細胞移動の開始点付近で受容されること、(2) 脳内リーリン蛋白質が細胞膜に対して強い親和性を有していること、そしてその親和性はリーリン C 末端配列を含む場合増強することである。以上の知見より、機能部位近傍に一定量リーリンを存在させる機構、すなわち細胞外においてリーリン蛋白質の分布を制御する機構（細胞外基質、脂質分子など）の存在を仮定するに至り、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、リーリン蛋白質の分布を制御する機構を同定しその分子メカニズムを明らかにすることである。

- (1) 脳形成時の大脳皮質において、リーリン蛋白質が機能する時期・部位を同定する。
- (2) リーリン蛋白質の機能部位を決定づける、分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 脳形成時の大脳皮質において、リーリン蛋白質が機能する時期・部位を同定。

リーリン受容体の機能的発現部位および時期の同定

リーリン受容体のトラフィッキングは厳密に制御されており、多量の細胞内プールが存在することが知られている。そこでリーリンの受容体結合部とアルカリフォスファターゼ (AP) を直接融合したプローブを作製し(図 1B)、脳スライスに結合させることでリーリン受容領域の分布を解析する。リーリン受容体の RNA in situ hybridization ならびにリーリン受容体の特異的抗体を用いた染色と組み合わせ詳細に検討する。リーリン受容体のリーリン結合部位を認識する抗体を用い

た染色により、細胞膜表面上に存在するリーリン受容体の検出を行う。また、リーリンシグナル活性化状態を検出する抗体を作成し、これを用いた染色により実際にリーリンが機能する脳領域を同定する。

(2) リーリン蛋白質の機能部位を決定づける、分子メカニズムを明らかにする。

①リーリン受容体トラフィッキングの受容体発現部位に与える影響の解析

リーリン受容体のトラフィッキングはリーリンとの結合および Dab1 により制御される。Dab1 遺伝子欠損マウスの脳スライスに前述のプローブを用いることで、リーリン受容領域の同定と受容体トラフィッキングの関与を検討する。

②リーリン蛋白質が結合する基質の同定

申請者はリーリン C 末端配列が未知の細胞外基質に結合することを見いだした。分泌後のリーリン蛋白質は神経細胞膜表面に存在するこの基質と結合し、受容体結合にいたるまでの分布が制御されるものと考えられる。リーリンの受容体結合領域を排除した C 末端断片を用いてアフィニティーカラムを作製し、リーリン C 末端配列変異マウスの大脳皮質抽出物より結合分子の検出および精製を試みる。

4. 研究成果

(1) リーリン受容体を認識する複数の抗体の樹立に成功した。その結果リーリン受容体にはスプライス変異により複数種の蛋白質が存在し、それぞれの受容体に対するリーリンの親和性が大きく異なることが明らかとなった。リーリン受容体蛋白質は移動中の神経細胞にも移動後の神経細胞にも存在した。この結果は学術論文として神経学会誌に掲載され（発表論文④）、作製した抗体は各国の研究者に分与され、当該分野の発展に寄与している。

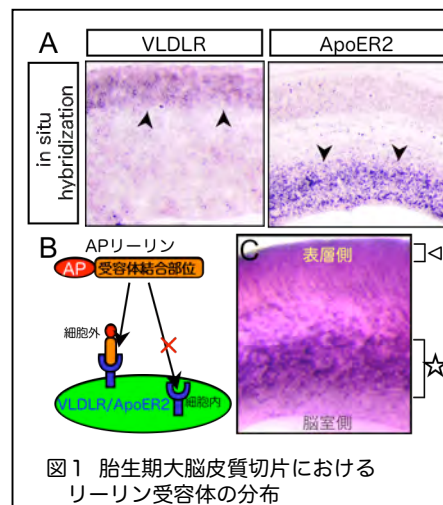


図1 胎生期大脳皮質切片におけるリーリン受容体の分布

リーリン蛋白質の受容体結合部位を用いた結合実験をおこなったところ、機能的なリーリン受容体は脳室付近で新生したばかりの神経細胞に発現しており、その後神経細胞が最終位置に移動し最終位置に移動するまでに速やかに消失することが明らかとなった(図2A)。この結果は発生過程において、リーリンの機能する場所が受容体を発現する細胞により制御されることを示唆しており、学術論文として北米神経科学会誌に掲載された(発表論文①)。

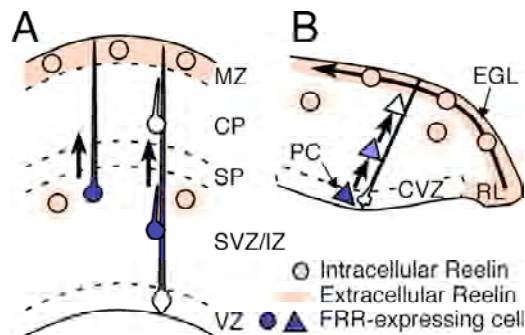


図2 発生期脳におけるリーリン受容体分布の模式図(発表論文①より)

リーリンシグナルの活性化状態を標識する抗体の作成には至らず、実際にリーリンが機能している部位・時期の精密な解析には至らなかった。これらの抗体については現在引き続き作成中である。しかしながらこの抗体作成過程において、リーリンシグナルにより活性化されるFynが、スフィンゴミエリン代謝を制御することを見いだした。これはリーリンシグナルの新たな標的を示唆するものであり、学術論文として米国生化学・分子生物学会誌に掲載された(発表論文③)。

(2)① Dab1 遺伝子欠損マウスではリーリン欠損マウスと同様の脳構造異常を示すにも関わらず、リーリン受容領域は正常マウスに酷似していた。このことはリーリンと受容体との結合により受容体トラフィッキングが変化し、神経細胞がリーリン受容能を失うことを示唆する。前述の結果とあわせ、学術論文として北米神経科学会誌に掲載された(発表論文①)。

②リーリン蛋白質が結合する細胞外基質の検索をおこない、結合候補分子としていくつかの糖蛋白質を同定した。これらの候補分子は同じく脳の発生過程を制御する分泌蛋白質を一時的に細胞外に滞留させることが知られている。このことから、リーリン蛋白質はこれまで考えられていたように分泌された後単純に拡散し機能するのではなく、細胞表面に一時的に提示され機能するものと考えられる。また、この細胞表面へのリーリンの親和性について解析したところ、リーリン

C末端部分により、リーリン蛋白質の立体構造が変化することが明らかとなった。脳内にC末端配列をもたないリーリン蛋白質が存在すること、C末端部分を保たないリーリン蛋白質は細胞膜への親和性が低いことを考え合わせると、生体ではリーリン蛋白質そのものの構造により局所的な分布が制御されるものと予想される。この結果は Journal of Neuroscience Research 誌に学術論文として掲載された(発表論文②)。現在リーリンC末端領域変異マウスの脳内リーリンを精製中であり、候補分子とC末端領域との結合について確認中である。

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5件)

①Takayuki Uchida, Atsushi Baba, F. Javier Pérez-Martínez, Terumasa Hibi, Takaki Miyata, Juan M. Luque, Kazunori Nakajima and Mitsuharu Hattori., Downregulation of functional Reelin receptors in projection neurons implies that primary Reelin action occurs at early/premigratory stages., *The Journal of Neuroscience*, 査読有, Vol. 29, No. 34, 2009, pp. 10653-10662.

②Takao Kohno, Yoshimi Nakano, Noriko Kitoh, Hirokazu Yagi, Kohichi Kato, Atsushi Baba and Mitsuharu Hattori, C-terminal region-dependent change of antibody-binding to the Eighth Reelin repeat reflects the signaling activity of Reelin., *Journal of Neuroscience Research*, 査読有, Vol. 87, No. 14, 2009, pp. 3043-3053.

③ Atsushi Baba, Koshiro Akagi, Mai Takayanagi, John G. Flanagan, Toshihide Kobayashi and Mitsuharu Hattori, Fyn tyrosine kinase regulates the surface expression of glycosylphosphatidylinositol-linked ephrin via the modulation of sphingomyelin metabolism., *The Journal of Biological Chemistry*, 査読有, Vol. 284, No. 14, 2009, pp. 9206-9214.

④Terumasa Hibi, Masato Mizutani, Atsushi Baba and Mitsuharu Hattori, Splicing variations in the ligand-binding domain of ApoER2 results in functional

differences in the binding properties to Reelin. *Neuroscience Research*, 査読有, Vol. 63, No. 4, 2009, pp. 251-258.

[学会発表] (計 15 件)

①馬場 敦、リーリンは移動初期の神経細胞を標的とする、日本分子生物学会 第 32 回年会、2009 年 12 月 10 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

②河野孝夫、リーリン CTR の切断はリーリンと神経細胞膜との相互作用を制御する、第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 16 日、名古屋国際会議場 (愛知県)

③Atsushi Baba, Localization and function of sphingomyelin synthase in neurons, 4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, 2009 年 5 月 26-27 日、学術総合センター (東京都)

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 敦 (BABA ATSUSHI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：70405215

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：