

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06868

研究課題名(和文) 大脳新皮質における神経前駆細胞の運命をコントロールする細胞外シグナルの役割解析

研究課題名(英文) Roles of extrinsic signals on fate choice of neural progenitor cells in the developing neocortex

研究代表者

眞田 佳門 (Sanada, Kamon)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：50431896

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)：脳の発生過程において、神経細胞は神経前駆細胞から誕生し、最終目的地に向かって移動する。しかしながら、これら一連のプロセスを調節する細胞外シグナルおよびその細胞内情報伝達経に関する知見は充分ではない。本研究では、様々な細胞外シグナルによって活性化されることが知られるAMP活性化キナーゼ(AMPK)が神経細胞移動に寄与することを示した。つまり、活性化AMPKは細胞質ダイニン(plus end)を正に調節することによって、核の前方移動および神経細胞移動を促進する。本研究により、神経細胞移動の鍵分子であるダイニンの新たな調節機構を提示すると共に、細胞外シグナルと神経細胞移動を繋ぐインターフェースを明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

秩序正しい神経細胞移動は脳発生に極めて重要であり、この過程が障害されると脳発生異常が起こる。神経細胞移動において、ダイナミックな細胞骨格の変化やモーター分子の制御は必要不可欠であるが、その制御機構には謎が多い。本研究成果は、世界に先駆けて微小管モーターである細胞質ダイニンの制御機構を明らかにしている。また従来、神経細胞移動を制御する細胞外環境因子およびその細胞内情報伝達機構は十分に理解されておらず、本研究成果は、神経細胞移動という複雑なシステムを理解する上で、細胞外環境の重要性およびそのインターフェースの分子機構を提示しており、当該分野の将来の研究展開に大きな影響を及ぼすと自負している。

研究成果の概要(英文)：During the mammalian brain development, neurons are born from neural progenitor cells and undergo neuronal migration to their final destination. These processes, neurogenesis and neuronal migration, are essential for neurodevelopment. However, the cell-extrinsic signals and their intracellular signaling pathways that govern neurogenesis and neuronal migration are poorly understood. In the present study, we show that AMP-activated protein kinase (AMPK) that is known to be activated by multiple extrinsic signals contributes to neuronal migration in the developing neocortex. In sum, we find that activated AMPK phosphorylates and positively regulates the cytoplasmic dynein to enhance forward movement of the nucleus and thereby neuronal migration. The present study thus uncovers a novel mechanism that regulates cytoplasmic dynein, a critical component for neuronal migration, and the molecular machinery of the interface between migratory neurons and their extracellular environment.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳新皮質 神経細胞移動 細胞質ダイニン AMP活性化キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳新皮質を構成する神経細胞は、発生期脳において神経前駆細胞 (neural progenitor cells) から誕生する。神経細胞を産出する親細胞である神経前駆細胞は、側脳室を取り囲む領域 (脳室帯、図1左の緑色の領域) に存在し、神経前駆細胞の細胞分裂に伴って誕生した神経細胞は、中間帯と呼ばれる領域を通過して、脳表面側に皮質板を形成する。この神経細胞移動は正常な脳構築に極めて重要である。

神経細胞は進行方向に短い突起 (先端突起、Leading process) を持ち、先端突起の伸長、先端突起内での中心体の前方移動、さらに核の前方移動というステップを繰り返すことで、神経細胞は移動する (図2左)。この神経細胞移動の過程において、核移動の不全は神経細胞移動を破綻させることから、核移動が極めて重要なステップである。移動中の神経細胞では、中心体から伸びた微小管は先端突起内を走行すると共に、中心体の後方にある核を取り囲むように伸展している (図2左)。

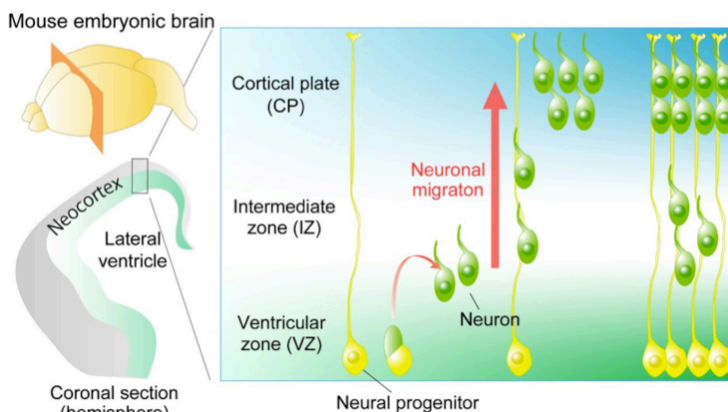


図1 脳新皮質における神経細胞の誕生と移動の模式図
VZ: 脳室帯、IZ: 中間帯、CP: 皮質板

ように伸展している (図2左)。上述の核の前方移動には、この微小管と微小管モータータンパク質である細胞質ダイニンが、極めて重要な役割を果たす。実際、移動中の神経細胞において、細胞質ダイニンは先端突起の根元にある「膨らみ」や核周辺に密に存在しており、それぞれ、微小管を引っ張り上げることにより中心体を前方に移動させる役割、また核膜を引っ張り上げることにより核を前方に移動させる役割を果たすと考えられている (図2右)。

しかしながら、神経細胞の移動におけるモーター分子の制御機構、とりわけダイニンの制御機構は謎に包まれている。このように、神経細胞移動には、微小管およびそのモーター分子であるダイニンの制御を含め、細胞骨格の適切なコントロールが重要であり、これら制御機構を明らかにすることは、複雑な神経細胞移動メカニズムを理解する上で、極めて意義がある。

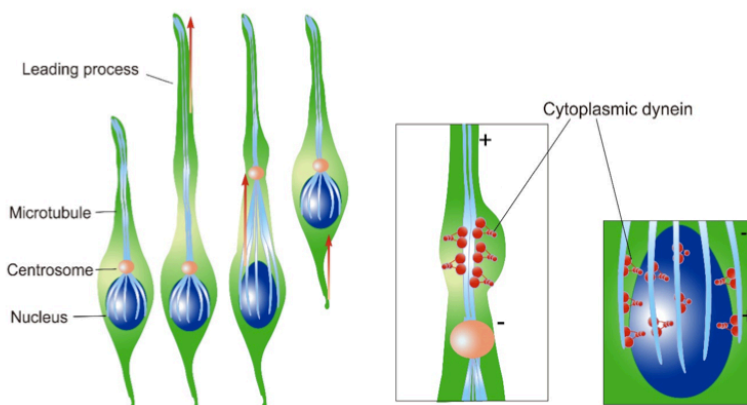


図2 神経細胞の移動と細胞質ダイニンの役割のモデル

2. 研究の目的

AMP-activated protein kinase (AMPK) は細胞内AMP濃度の上昇により活性化されるという特徴から、エネルギー代謝制御における役割が盛んに研究されてきた。近年、AMPKはAMP濃度上昇のみならず、多彩な蛋白質キナーゼによってリン酸化されて活性化されることが明らかになり、エネルギーセンサーとしての役割だけでなく、細胞極性や細胞分裂などの制御にも関わることが報告されている。重要なことに、従来のリン酸化プロテオミクス解析により、ダイニン中間鎖がAMPKによってリン酸化される可能性が示されていた。そこで本研究では、移動中の神経細胞において、謎に包まれているダイニンの制御機構に切り込むため、AMPKの神経細胞移動における役割に着目して研究を進めた。

AMPKはAMP濃度上昇のみならず、多彩な蛋白質キナーゼによってリン酸化されて活性化されることが明らかになり、エネルギーセンサーとしての役割だけでなく、細胞極性や細胞分裂などの制御にも関わることが報告されている。重要なことに、従来のリン酸化プロテオミクス解析により、ダイニン中間鎖がAMPKによってリン酸化される可能性が示されていた。そこで本研究では、移動中の神経細胞において、謎に包まれているダイニンの制御機構に切り込むため、AMPKの神経細胞移動における役割に着目して研究を進めた。

3. 研究の方法

神経細胞移動におけるAMPKの役割を調べるため、子宮内電気穿孔法を用いて、AMPK遺伝子に対するshRNA発現ベクターを神経細胞に導入してノックダウンし、神経細胞移動における影響を精査した。加えて、AMPKの機能を変化させる各種AMPK変異体やダイニン中間鎖の野生型および変異体を遺伝子導入し、その影響等を調べることにより、AMPKおよび細胞質ダイ

ニンの役割を精査した。

4. 研究成果

神経細胞移動における AMPK の役割を調べるため、子宮内電気穿孔法を用いて、AMPK 遺伝子に対する shRNA 発現ベクターと GFP 発現ベクターを共にマウス胎仔脳に遺伝子導入し、遺伝子導入された神経細胞の挙動を調べた。その結果、AMPK がノックダウンされた神経細胞は、中間帯の下部に蓄積しており、脳表面側へと移動できないことが判明した。また、キナーゼ活性を欠損した変異体を導入すると、同様の表現型が観察された。このことから、AMPK が神経細胞移動に重要であり、その作用には AMPK のキナーゼ活性が必要であることが分かった。

そこで脳スライス培養を用いて神経細胞移動をタイムラプスイメージングした。その結果、AMPK ノックダウンにより中心体の前方移動と共に核移動のプロセスが障害されることが判明した。このことから、AMPK は神経細胞の核移動（および中心体の移動）を制御していることが示唆できた。

重要なことに、培養細胞において、AMPK は細胞質ダイニンと似た局在を示すこと、さらに AMPK が細胞質ダイニンと相互作用することが判明した。また、大脳新皮質において AMPK をノックダウンした神経細胞は、ダイニン重鎖をノックダウンした神経細胞と似た表現型（核の形態が楕円から真円に近くなることや核と中心体との距離が長くなること）を示すことを見出した。興味深いことに、AMPK 活性化剤および阻害剤を Cos-7 細胞や培養神経細胞に暴露すると、ダイニン中間鎖のリン酸化が、それぞれ増加および低下することが明らかになった。これらのことから、ダイニン中間鎖が AMPK の基質になりえることが示唆された。そこで、リン酸化部位を質量分析等によって解析したところ、ダイニン中間鎖の Ser81 を AMPK がリン酸化することが判明した。

神経細胞移動における AMPK-ダイニン経路の役割を明らかにするため、ダイニン中間鎖の Ser81 の非リン酸化変異体およびリン酸化状態模倣変異体を用いて、ダイニン中間鎖のリン酸化がダイニンの機能および神経細胞移動に与える影響を調べた。その結果、ダイニン中間鎖の Ser81

リン酸化がダイニンの機能を正に調節することが判った。さらに重要なことに、AMPK ノックダウンによる神経細胞移動の障害は、ダイニン中間鎖のリン酸化模倣変異体の発現によって緩和された。以上のことから、AMPK はダイニン中間鎖の Ser81 リン酸化を介して

ダイニンの機能を正に調節し、核移動および神経細胞移動を制御していることが判明した。前述したように、移動中の神経細胞において、細胞質ダイニンは先端突起の根元にある「膨らみ」や核周辺に密に存在している。本研究で得られた知見を併せて考えると、「膨らみ」領域の細胞質ダイニンは、AMPK によってリン酸化されることで、より強く微小管を引っ張ることができ、その結果として中心体の前方移動が起こる。また、核膜にあるダイニンも同様に、リン酸化されことで、核を微小管に沿って、より強く前方移動させると推察できた（図 3、Naito et al., 2020 Development）。

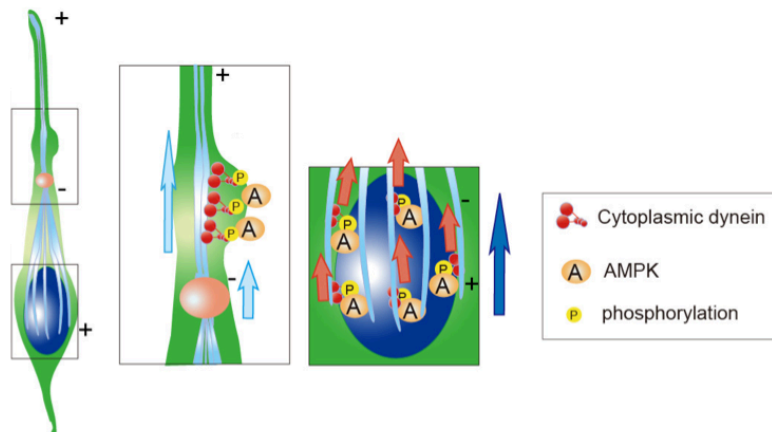


図 3 神経細胞移動における AMPK の役割のモデル

<引用文献>

Yasuki Naito, Naoyuki Asada, Minh Dang Nguyen, Kamon Sanada. AMP-activated protein kinase regulates cytoplasmic dynein behavior and contributes to neuronal migration in the developing neocortex. *Development* (Cambridge, England) 147(14) (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasuki Naito, Naoyuki Asada, Mihn Dang Nguyen, Kamon Sanada	4. 巻 147
2. 論文標題 AMP-activated protein kinase regulates cytoplasmic dynein behavior and contributes to neuronal migration in the developing neocortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev187310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.187310	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 眞田佳門
2. 発表標題 大脳新皮質における神経前駆細胞の運命制御を司る脳外環境因子の役割解析
3. 学会等名 「脳構築における発生時計と場の連携」領域会議
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/mgrl/
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
カナダ	University of Calgary			