

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06897

研究課題名(和文) サイトヘジン2-Arf6小胞輸送経路を介した神経細胞の移動制御機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of Cytohesin2-Arf6 mediated vesicular transport pathway in neuronal migration

研究代表者

原 芳伸 (Hara, Yoshinobu)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：40558467

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)：本研究では、細胞内輸送経路による神経細胞移動の制御機構の解明を最終目的として新規サイトヘジン2-Arf6経路の役割に焦点を当て、サイトヘジン2の細胞内局在 活性化制御機構 積荷タンパク質の解析を行った。その結果、サイトヘジン2は移動神経細胞では細胞内小胞に局在すること、サイトヘジン2-Arf6経路はリーリンシグナル経路により活性化されること、サイトヘジン2の機能阻害はN-カドヘリンやリーリン受容体の細胞内貯留を増加させることを見出した。これらの結果から、サイトヘジン2-Arf6経路は受容体の細胞内輸送を介してリーリンシグナル経路を制御する新たなシグナル経路であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、RabやRap1がN-カドヘリンの細胞膜発現の制御経路として同定され、細胞の運動性や方向性の調節因子として細胞内小胞輸送経路の重要性が明らかとなってきたが、細胞内小胞輸送がどのように調節されているかは不明だった。本研究では、移動神経細胞においてN-カドヘリンの細胞内輸送を制御するArf6経路に着目し、その活性化因子としてサイトヘジン2を同定し、その活性がリーリンシグナル経路により調節されていることを明らかにした。さらにサイトヘジン2-Arf6経路がリーリン受容体の細胞内輸送を制御していることを世界に先駆けて解明しつつある。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to understand functional role of intracellular vesicular transport system in neuronal migration focussing on cytohesin2, the guanine nucleotide exchange factor for ADP-rybosition factor 6 (Arf6) that regulate vesicular transport. Immunohistological analysis showed that cytohesin2 localized in intracellular vesicles including early and recycle endosomes in migrating neurons. Biochemical analysis revealed that cytohesin2-Arf6 signal pathway was activated by reelin signal. Furthermore, knockdown of cytohesin2 increased accumulation of N-cadherin in cytoplasm in migrating neurons, as knockdown of Arf6. These results suggest that cytohesin2-Arf6 pathway regulates neuronal migration through intracellular membrane transport of N-cadherin under reelin signal.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経細胞移動 細胞内小胞輸送 脳層形成 低分子量Gタンパク質 Arf6 サイトヘジン2 N-カドヘリン  
リーリン

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の大脳皮質は6層構造を呈している。この構造は胎児期の脳室帯において神経幹細胞としての放射状グリアが、細胞分裂により未熟な神経細胞を生み出し、それらが中間帯、皮質板を経て、古くに生まれた細胞を新しい細胞が飛び越えて位置する“インサイドアウト様式”で上層へ移動することで形成される。この過程で移動神経細胞はN-カドヘリンなどの接着分子を移動の“足”として、またアポリポタンパク質E受容体2 (ApoER2)などの受容体を“センサー”として使い、それらをエンドサイトーシスやリサイクリングなどの細胞内輸送機構により再配置することで運動性や方向性を調節する。細胞内輸送機構の異常は神経細胞移動を阻害し、層形成異常を引き起こすことが知られている。

これまでに、RabファミリーやArfファミリーなどの低分子量Gタンパク質が、細胞内輸送の主要な制御因子として注目されてきた(*Grant, 2009*)。例えば、胎児大脳皮質の移動神経細胞におけるN-カドヘリンのエンドサイトーシスはRab5により制御されており、またそのリサイクリングは、Rab11とArf6が制御していることが報告された(*Kawauchi, 2010; Hara, 2016*)。Rab11とArf6は各々ファミリー分子の一つであることから、膜分子の輸送において、ファミリー分子の間では機能的な住み分けがなされていると推測されるが、個々の膜分子の局在変化や再配置がどのような細胞内輸送機構により時空間的に制御されているのか、また膜分子-低分子量Gタンパク質の対応がどのように規定されているのかは明らかではなかった。

申請者は細胞膜とエンドソーム間の小胞輸送を制御するArf6に着目した大脳皮質層形成における機能解析を行い、Arf6がN-カドヘリンのリサイクリングを介して神経細胞移動を制御する新たな小胞輸送経路であることを明らかにした。しかしながら、Arf6のノックダウンにより低下したN-カドヘリンの発現量を野生型N-カドヘリンの共発現により補っても神経細胞移動異常は改善されなかったことから、N-カドヘリン以外の積荷タンパク質の重要性が示唆された。また、Arf6のノックダウンにより移動異常が起こるのは中間帯で、皮質板でのロコモーション移動は影響を受けなかったことから、Arf6の活性が移動の過程で厳密に調節されていることが考えられた。

### 2. 研究の目的

移動神経細胞におけるArf6の活性化因子を同定するため、特異抗体を用いた発現解析と、子宮内電気穿孔法によるそれぞれの活性化因子のノックダウン実験の結果、サイトヘジン2がその候補として見出された。これらのことを踏まえ、本研究では細胞内輸送経路の機能解明を最終目的とし、移動神経細胞で発現し、神経細胞移動を制御するArf6の活性化因子サイトヘジン2に着目し、サイトヘジン2-Arf6シグナル経路の活性化機構、および積荷タンパク質について解析を行った。

### 3. 研究の方法

胎児大脳皮質におけるサイトヘジン2の詳細な発現パターンを調べるため、マウス胎児は胎齢(E)17日および出生後(P)0日で環流固定し、サイトヘジン2に対する特異抗体を用いて免疫組織染色を行った。また移動神経細胞および移動後神経細胞におけるサイトヘジン2の細胞内局在を調べるため、E14で子宮内電気穿孔法によりpCAGGS-EGFPをマウス胎児大脳皮質に遺伝子導入し、E17およびP0で環流固定をして凍結切片を作成し、抗サイトヘジン2、抗EGFP、各種細胞内小器官のマーカー抗体、およびDAPIで4重染色を行って共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

サイトヘジン2-Arf6シグナル経路とリーリンシグナルの関連性は初代培養神経細胞を用いたリーリン刺激実験と、子宮内電気穿孔法による機能改善実験により調べた。前者には、E14のマウス胎児大脳皮質から作成した初代培養神経細胞を用いた。細胞は播種前にサイトヘジン2に対するノックダウンベクターを遺伝子導入し、培養後3日でHEK293TにpCrl-Reelinをトランスフェクションすることで作成したリーリン培養上清を処理してリーリンシグナル経路下流分子(Fyn, Dab1, Akt, Cofilin-1)のリン酸化をウエスタンブロットで検出し、リーリンシグナル経路におけるサイトヘジン2の作用点を調べた。後者は、サイトヘジン2のノックダウンベク

ターとリーリンシグナル経路関連分子の活性型変異体 (Fyn[Y531F], Dab1[p45/8R], Rap1[Q63E], Cofilin-1[S3E])、もしくはリン酸化 Dab1 のユビキチンリガーゼ Cullin5 のノックダウンベクターを子宮内電気穿孔法により E14 で大脳皮質に共遺伝子導入し、E17 および P0 で固定した胎児脳を用いた。抗 EGFP 抗体を用いて免疫組織染色を行い、遺伝子導入された移動神経細胞の移動度を解析した。

サイトヘジン 2 -Arf6 シグナル経路により輸送される積荷タンパク質を探索は、抗 Arf6 抗体を用いた共免疫沈降実験により行なった。E17 のマウス胎児大脳皮質を切り出し、密度勾配遠心により可溶画分を生成し、抗 Arf6 抗体で共免疫沈降実験を行った。

#### 4 . 研究成果

免疫組織染色によるサイトヘジン 2 の発現解析の結果、E17 の大脳皮質では中間帯および皮質板で強い発現が見られた。一方 P0 では中間帯や皮質板での発現は低下し、軟膜近傍の原皮質帯で強い発現が見られた。また、pCAGGS-EGFP を遺伝子導入した胎児大脳皮質を用いた移動神経細胞における細胞内局在解析の結果、移動神経細胞では主に初期小胞やリサイクリング小胞に局在していた。原皮質帯の神経細胞でも同様のパターンで局在していたが、細胞全体における発現量が増加していた。

次にサイトヘジン 2 -Arf6 シグナル経路とリーリンシグナルの関連性について、初代培養神経細胞を用いた刺激実験の結果、コントロールではリーリン刺激により Fyn, Dab1, Akt, Cofilin-1 のリン酸化が上昇したが、サイトヘジン 2 がノックダウンされた神経細胞ではこれらの下流分子のリン酸化が抑制されていた。一方、子宮内電気穿孔法により E14 でサイトヘジン 2 ノックダウンベクターと pCAGGS-Fyn[Y531F], Dab1[p45/8R], shCullin5, Rap1[Q63E], Cofilin-1[S3E]のそれぞれを共遺伝子導入し、E17 および P0 で固定して神経細胞の移動度を調べた結果、サイトヘジン 2 ノックダウンによる移動異常は Fyn[Y531F]や Rap1[Q63E], Cofilin-1[S3E]では改善されなかったが Dab1[p45/8R]やリン酸化 Dab1 の分解を制御する Cullin5 のノックダウンでは移動異常が改善された。これらのことから、サイトヘジン 2 はリーリン受容体の細胞膜における発現を調節していることが示唆された。そこで免疫組織染色によりサイトヘジン 2 がノックダウンされた移動神経細胞におけるリーリン受容体 ApoE 受容体 2 (ApoER2) および超低密度リポタンパク質受容体 (VLDLR) の発現を調べた結果、細胞内における蛍光輝度値がコントロールよりも有意に上昇していた。さらに、リーリン刺激によるサイトヘジン 2 -Arf6 経路の活性化を、下流効果分子を使った GST プルダウン法で調べた結果、Arf6 の結合はリーリン刺激により増加し、一方サイトヘジン 2 ノックダウンでは低下していた。これらのことから、サイトヘジン 2 -Arf6 経路はリーリンにより活性化され、N-カドヘリンに加え、リーリン受容体の細胞内輸送を制御することが示唆された。

最後に、サイトヘジン 2 -Arf6 経路による積荷タンパク質を網羅的に調べるため、抗 Arf6 抗体を用いて共免疫沈降により Arf6 陽性小胞の単離を試みた。研究室で作成した抗 Arf6 抗体をプロテイン G に架橋し、それらを E17 のマウス胎児大脳皮質から作成した S2 画分の可溶化液を反応させた結果、Arf6 抗体特異的なバンドは検出出来なかった。Arf6 は低分子量 G タンパク質であることから膜小胞の単離には向かないことが考えられる。今後はリサイクリング小胞に局在する膜分子に対する抗体を使った共免疫沈降に切り替えて行う予定である。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito Akiko, Fukaya Masahiro, Sugawara Takeyuki, Hara Yoshinobu, Okamoto Hirotsugu, Yamauchi Junji, Sakagami Hiroyuki	4. 巻 159
2. 論文標題 Cytohesin-2 mediates group I metabotropic glutamate receptor-dependent mechanical allodynia through the activation of ADP ribosylation factor 6 in the spinal cord	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105466 ~ 105466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2021.105466	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原芳伸, 阪上洋行
2. 発表標題 移動神経細胞における低分子量Gタンパク質Arf4の機能的役割
3. 学会等名 日本解剖学会第109回関東支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原芳伸, 阪上洋行
2. 発表標題 神経細胞移動における低分子量Gタンパク質Arf4およびArf5の機能的役割
3. 学会等名 日本解剖学会第127回全国学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------