

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770202

研究課題名（和文） 神経細胞の位置決定に関わる低分子量 G 蛋白質活性調節因子群の役割とその特異性

研究課題名（英文） The roles and specificities of the regulators for small GTP-binding proteins in the regulation of neuronal cell location

研究代表者

加藤 裕教（KATOH HIRONORI）

京都大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：50303847

研究成果の概要（和文）：大脳皮質は哺乳類において特に発達しており、近年、スライス培養や in vivo 遺伝子導入法、ノックアウトマウスの解析、イメージング技術の進歩により、その回路構造や発達過程などが明らかになりつつある。Rho ファミリー低分子量 G タンパク質は、細胞内において分子スイッチとして働き、主に細胞骨格系を制御することにより培養細胞において細胞運動や神経突起の伸長を調節することが知られているが、大脳皮質形成過程においてどのような役割を担っているのかはあまり明らかになっていない。本研究ではマウス大脳皮質発達における RhoG の役割について解析を行い、RhoG が神経前駆細胞の増殖を促進していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cerebral cortex is developed particularly in mammals, and recent studies using slice culture, in vivo gene expression, knockout mice, and imaging system have elucidated the structure of neuronal circuit and developmental process in the cerebral cortex. Rho family small GTPases act as molecular switches in cells and regulate cytoskeleton to control cell migration and neurite outgrowth in cultured cells. However, their roles in the development of cerebral cortex have not yet well understood. In this study, we studied the role of RhoG in the developing mouse cerebral cortex and found that RhoG promoted neuronal progenitor cell proliferation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：脳・神経、細胞・組織、シグナル伝達、発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

大脳皮質の形成過程において、様々な場所から様々な時期に生まれた神経細胞がそれぞれ決まった場所へと移動し、そして決められた場所へと軸索や樹状突起を伸ばしていくことで他の細胞とネットワークを形

成していく。この時に個々の神経細胞は、それぞれ非常に複雑な形態変化をすることが知られており、よって大脳皮質の発達において神経細胞の形態が正確に制御される必要がある。またこれらの異常がヒトでは統合失調症などの高次脳機能障害の重大な

要因の1つと考えられている。従って、この一連の複雑な神経細胞の形態変化を制御する分子機構を理解することは、臨床的にも非常に重要であると考えられる。これまでも神経細胞の位置決定に重要な役割を担っているリーリンなどの細胞外因子や、ニューロジェニンなどの神経細胞の運命決定に関わる転写因子については、比較的数多くの研究が成され、これまでも非常に数多くの研究成果が報告されている。ところが、大脳皮質の形成過程における一連の神経細胞のダイナミックな形態変化、すなわち神経前駆細胞から神経細胞が分裂し、その後移動して軸索や樹状突起を伸長し、他の神経細胞とシナプスを形成するまでの一連の過程においては、正確にコントロールされた細胞骨格の再構築が行われなければならないことは容易に想像できることであるが、その分子機構に関してはまだほんの一部しか理解されていないのが現状である。

細胞骨格の制御において、細胞内で重要な役割を担っているのが Rho ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) である。Rho ファミリー G 蛋白質は細胞骨格を制御することにより、様々な刺激にตอบสนองして細胞の形態変化を引き起こす分子スイッチの役割を果たすタンパク質ファミリーで、現在までに哺乳動物では少なくとも 20 種類存在することが確認されている。その中でも RhoA、Rac1、Cdc42 に関しては最もよく研究が進んでおり、それらが脳皮質の形成過程においても様々な役割を担っていることが報告されている。一方、Rho ファミリーを活性化する因子 (GEF) はヒトでは約 60 種類、抑制する因子 (GAP) にいたっては約 80 種類存在するといわれ、Rho ファミリーの機能の多様性はこれら制御因子の違いによると考えられている。ところがその機能や作用機序が明らかになっているものはまだほんの一部にすぎず、今後はこれら個々の活性制御因子の制御機構とその機能の解明に研究の中心が移りつつあるのが現状である。申請者はこれまでに、RhoA、Rac1、Cdc42 以外の Rho ファミリー G タンパク質である RhoG と Rnd1 について、世界に先駆けてその機能及び情報伝達経路について明らかにし、その過程で今までにない低分子量 G 蛋白質の活性を制御する新しいメカニズムの存在を明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

本研究は Rho ファミリー G 蛋白質の活性を制御する因子群に焦点を絞り、脳の発達過程においてどの制御因子がどの時期にどの場所で働いているのかについて解析していきたいと考えている。具体的には Rho ファ

ミリー G 蛋白質活性調節因子群の個々の分子の脳における発現時期や分布、また細胞内での機能の相違を分子レベルで網羅的に調べ、最終的には *in vivo* の系で機能を明らかにしていく。特にこれまでに申請者が行ってきた研究から、細胞外からの様々な刺激が、多様に存在する低分子量 G 蛋白質活性調節因子を使い分けることによって、ある特定の生理機能を発揮する仕組みが存在すると思われる。ところがこれまでの Rho ファミリー G 蛋白質の活性制御因子についての研究は、その多くが培養神経細胞を用いた研究レベルまでにとどまっており、また細胞レベルの機能に関しても全く報告がないものも数多く存在する。本研究は世界に先駆けてその解明に取り組むものであり、当該分野においては独創的であると考えられる。さらには本研究によって発見された新たな分子機構と疾患との関係を検討し、様々な高次脳機能障害に対する臨床応用に向けた新たな分子ターゲットの確立をめざしていきたいと考えている。

## 3. 研究の方法

(1) 脳の発達期における Rho ファミリー G 蛋白質活性制御因子の発現部位や時期の網羅的解析: Rho ファミリー G 蛋白質の活性化因子はヒトにおいて約 60 種類以上、また抑制する因子は約 80 種類程度存在するとされている。これらはそのアミノ酸配列から共通の機能領域を持った幾つかのグループに分類される。そこでまずグループごとにマウスの胎児脳における発現時期や発現パターンなどをそれぞれ特異的なプローブを作成し、リアルタイム PCR や *in situ* ハイブリダイゼーション法などを用いて解析を行う。申請者らは既に一部の活性制御因子の発現パターンの解析を進めており、発達期の脳に発現が見られるものも既に得ている。これらの結果をもとに、特にユニークな発現パターンを示すものから抗体を作製し、その抗体を用いて免疫組織染色を行い、活性制御因子の蛋白レベルでの発現パターンを同定する。得られた結果から、それらの分子の脳の発達における役割について検討を行う。

(2) マウス胎児期の脳皮質における各 Rho ファミリー G 蛋白質活性制御因子の活性変異体やノックダウンによる神経細胞への影響: 1) で得られた結果をもとに、特にその発現パターンが神経細胞の増殖、分化、移動、突起進展などに関連があると思われるものから順に、各蛋白質のクローニングを行い、それらの活性変異体や特異的 siRNA の作成を行う。これらを GFP などの蛍光蛋白を同時に発現するベクターに挿入し、子宮内エレクトロポレーション法を用いて神経細胞分化前の神経前駆細胞にこの

ベクターを導入し、その後の変化を観察する。この方法は、子宮内の胎児の側脳室にマイクロキャピラリーを用いてプラスミド溶液を注入し、その後胎児の頭を子宮の外側から電極で挟んで、電ポレーションによって脳室に接した脳室帯に存在する神経前駆細胞に効率よく目的のベクターを導入することが可能となっている。その後、胎児を母親マウスの体内に戻してやることで、プラスミドが導入された神経前駆細胞がその後どのように増殖し、神経細胞へと分化してどのような形態変化を起こして移動し突起を伸展させていくか、蛍光蛋白を追うことで *in vivo* での観察が可能となっている。

#### 4. 研究成果

(1) RhoG の大脳皮質形成過程における役割: *in situ* ハイブリダイゼーションを行って胎児脳における RhoG の発現分布を調べたところ、脳室帯に強い発現が見られた。そこで申請者は、子宮内電ポレーション法を用いた遺伝子導入を行い、脳室帯に存在する神経前駆細胞での RhoG の役割を解析しようと試みた。常時活性型の RhoG (RhoG-V12) を導入すると神経前駆細胞の増殖は促進された。一方で RhoG に対するショートヘアピン RNA (shRNA) を導入して RhoG をノックダウンすると神経前駆細胞の増殖は抑制された。また、細胞周期の S 期の細胞に取り込まれるブロモデオキシウリジン (BrdU) を用いてラベリングを行うと、BrdU 陽性細胞の割合が RhoG-V12 を導入した神経前駆細胞で増加し、RhoG shRNA を導入した細胞では減少した。また、増殖細胞のマーカーである Ki67 に対する抗体で組織染色を行った場合も、Ki67 陽性細胞の割合が RhoG-V12 を導入した神経前駆細胞で増加し、RhoG shRNA を導入した細胞では減少した。また、RhoG のノックダウンにより神経前駆細胞の細胞死が誘導されることはなかった。一方、神経前駆細胞のマーカーである Nestin に対する抗体で染色を行うと、RhoG-V12 では Nestin 陽性細胞の割合が増加したが、RhoG shRNA を導入しても変化はなかった。

これまでの培養細胞における知見から、RhoG は特異的エフェクターである ELMO と Rac 特異的な GEF である Dock180 を介して Rac を活性化し、神経突起の伸長や細胞運動を制御し、一方で PI3K の制御サブユニットである p85a を介して Akt のリン酸化を起こすことによって細胞の生存に関与していることが知られている。そこで申請者は、神経前駆細胞の増殖における RhoG の下流で、どちらのシグナル経路が RhoG による神経前駆細胞の増殖制

御に関与しているのかを調べることにした。その結果、PI3K を介した Akt のリン酸化を引き起こすことができるが、ELMO に結合することのできない常時活性型変異体である RhoG-V12A37 を過剰発現させると、RhoG-V12 と同程度に BrdU 陽性細胞の増加がみられた。さらに、RhoG-V12 による BrdU 陽性細胞および Nestin 陽性細胞の増加は PI3K の阻害剤である LY294002 で処理することによって抑制された。

以上の結果から、RhoG は脳室帯に発現しており、神経前駆細胞の増殖を正に制御している。また、RhoG による神経前駆細胞の増殖制御には PI3K の活性が必要であることが明らかとなった。

(2) SrGAP3 の大脳皮質形成過程における役割: 大脳皮質形成に関与している可能性のある活性制御因子を同定するために、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の 1 つである Rac1 の不活性化因子の中から半定量的 RT-PCR 法および *in situ* hybridization 法を用いて大脳皮質形成時に発現している可能性のある分子を探索したところ、srGAP3 を同定した。srGAP3 は重度の精神遅滞の症状を示す患者においてその発現が阻害、もしくは機能的に不活性化されているにもかかわらず、生体内における機能についてほとんどわかっていない。そこで、本研究において大脳皮質形成過程における srGAP3 の機能を解明することを試みた。

半定量的 RT-PCR 法および *in situ* hybridization 法を用いて srGAP3 mRNA の発現分布を調べたところ、大脳皮質形成初期の脳室帯に強い発現が認められた。そこで、ニューロンの放射状移動における srGAP3 の機能を調べるために、子宮内電ポレーション法を用いて胎児マウスの神経前駆細胞へ野生型の srGAP3 を遺伝子導入したところ、ニューロンの放射状移動が遅れた。また、srGAP3 の GAP 活性を欠失させた変異体を導入したところ、野生型で認められた放射状移動の遅れが解除された。次に、srGAP3 特異的なショートヘアピン RNA (shRNA) を導入し、内在性の srGAP3 をノックダウンしたところ、ニューロンの放射状移動が抑制された。さらに、srGAP3 ノックダウンにより複雑に神経突起を伸長した細胞が多数認められるとともに、脳室帯頂端膜側においてニューロンのマーカーである Tuj1 陽性細胞の位置に異常が認められた。

以上の結果から、大脳皮質形成の初期段階において srGAP3 が神経前駆細胞からニューロンへの分化あるいはニューロンの移動に関与している可能性が示唆さ

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4件)

1. Hiramoto-Yamaki, N., Takeuchi, S., Ueda, S., Harada, K., Fujimoto, S., Negishi, M., and Katoh, H. (2010) Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependemt mechanism. **J. Cell Biol.** 190, 461-477. (査読有)

2. Oinuma, I., Ito, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2010) Semaphorin 4D/Plexin-B1 stimulates PTEN activity through R-Ras GTPase-activating protein activity, inducing growth cone collapse in hippocampal neurons. **J. Biol. Chem.** 285, 28200-28209. (査読有)

3. Fujimoto, S., Negishi, M. and Katoh, H. (2009) RhoG promotes neural progenitor cell proliferation in mouse cerebral cortex. **Mol. Biol. Cell** 20, 4941-4950. (査読有)

4. Takeuchi, S., Yamaki, N., Iwasato, T., Negishi, M. and Katoh, H. (2009) b2-Chimaerin binds to EphA receptors and regulates cell migration. **FEBS Lett.** 583, 1237-1242. (査読有)

[学会発表] (計6件)

1. 脇田洋平、柿本哲宏、加藤裕教、根岸 学、The F-BAR domain is important for the regulation of endocytosis and spine formation by Rapostlin in hippocampal neurons. 第 83 回日本生化学会大会、第 33 回日本分子生物学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日、神戸国際会議場

2. 平本(山木) 奈央、竹内真吾、上田修平、原田耕平、藤本聡志、根岸 学、加藤裕教、Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependemt mechanism. 第 83 回日本生化学会大会、第 33 回日本分子生物学会大会合同大会、2010 年 12 月 8 日、神戸国際会議場

3. 原田耕平、山木奈央、根岸 学、加藤裕教、Ephexin4 はがん細胞におけるアノイキス制御に関与する 第 83 回日本生化学会大会、第 33 回日本分子生物学会大会合同大会、2010 年 12 月 8 日、神戸国際会議場

4. 加藤裕教、細胞運動における Eph 受容体による Rac 活性制御 第 61 回日本細胞生物学会大会、2009 年 6 月 2 日、名古屋国際会議場

5. 加藤裕教、上田修平、倉本和也、藤本聡志、根岸 学、樹状突起の形態形成における Dock ファミリーの役割 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

6. 竹内真吾、山木菜央、岩里琢治、根岸 学、加藤裕教、beta2-chimaerin は Eph 受容体と結合して細胞運動を抑制する 第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、神戸国際会議場

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/negishi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 裕教 (KATOH HIRONORI)

京都大学・大学院生命科学研究科・准教授  
研究者番号: 50303847

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: