

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770218

研究課題名(和文)

Aurora-AとNDEL1による細胞質ダイニンと微小管の制御機構の解明

研究課題名(英文)

Microtubules organization regulated by Aurora-A and NDEL1

研究代表者

森 大輔 (MORI DAISUKE)

名古屋大学・医学系研究科・COE 特任講師

研究者番号：00381997

研究成果の概要(和文)：神経細胞における aPKC による Aurora-A の活性化の分子メカニズムとその下流で起こる作用機序について分子レベルでのひとつの重要な経路を証明した。微小管ネットワークにおける細胞周期の制御と神経細胞の極性および軸索形成に分子レベルで共通したメカニズムがあることを初めて示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We proved the molecular mechanisms which sequential activation among aPKC, Aurora-A and NDEL1 in neurite elongation. We firstly indicated the common mechanisms in regulating cell cycle, formation of neurite polarity or elongation..

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：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：中心体, Aurora-A キナーゼ, NDEL1

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は発生・分化の過程でダイナミックに位置・形態を変化させる。この過程の中で細胞内骨格の再編とモータータンパク質は中心的役割を果たす。我々は滑脳症の原因遺伝子・LIS1 の機能解析を行ってきた。LIS1 は Ndel1 とともにモータータンパク質である細胞質ダイニン、微小管の再編を制御するカタニンを制御し神経細胞の遊走の担い手であることを発見した。

細胞内には微小管、アクチンなどの細胞内骨格が張り巡らされている。これらは細胞極性のコントロール、モータータンパク質による細胞内の物質輸送を担っており、オルガネラの移動、細胞分裂、神経細胞における軸索輸

送、シナプスの形成など重要な役割を果たしている。これら細胞の機能、生存に必須なモータータンパク質と微小管ネットワークの制御機構の解明を通して、神経発生と中枢神経系形成後の神経細胞のネットワーク形成、シナプス形成のメカニズムを明らかにする。また、我々の研究から LIS1 の変異に伴う滑脳症においては分子機構に立脚した治療法が可能であることが示唆されている。本研究課題ではこれらの実用化にも挑戦したい。当研究室で LIS1 の機能を明らかにするために LIS1 の結合タンパクを同定した結果、真菌において核の移動を制御している遺伝子である NUDEL を同定した。また LIS1、Ndel1 は共に、中心体に局在し、モータータ

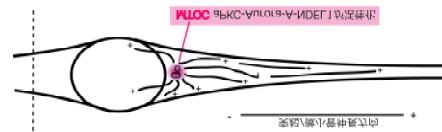
ンパクの細胞質ダイニンの重鎖と結合し、その機能を制御していることがわかった (Neuron 2000)。また Ndel1 は中心体において Aurora A の基質となり、微小管再編の制御を行っていることが分かった (MCB,2007)。さらに Ndel1 は中心体特異的な脱リン酸化酵素・PP4 の基質となり、微小管ネットワークのコントロールをしていることを明らかにした (JCB,2008)。さらに我々は NDEL1 が神経細胞においても Aurora-A の基質となることを見だし、神経細胞のネットワーク形成に重要な役割を持っている可能性が極めて高いと考えている。細胞分裂期で得られた分子機構と分裂後の細胞である神経細胞で共通の分子機構が微小管のダイナミズムを制御しているという知見は斬新であり、細胞周期と神経細胞の研究を接続する大きな発展性を秘めていると考えている。

2. 研究の目的

(1) 神経細胞における Aurora-A キナーゼの活性化とその生物学的意義の解明

Aurora-A キナーゼは細胞分裂の制御という生理的な役割を持っている。また、繊維芽細胞の形質転換能を有するがん遺伝子としても知られており、ヒトのがん腫でも Aurora-A キナーゼの過剰発現が報告されている。多くの分裂期イベントの制御異常が発生して染色体分配に支障を来すためである。我々は Aurora-A キナーゼには NDEL1 と共役して中心体の分離および成熟、紡錘体形成のプロセスにおいて重要な役割を担っていることを証明した。このときに NDEL1 は Aurora-A キナーゼによってリン酸化修飾を受ける。NDEL1 は LIS1 とともに細胞質ダイニンの制御因子であり、神経細胞の遊走のみならず、細胞分裂時の染色体の移動、細胞内のオルガネラの輸送、小胞の輸送など細胞分裂、細胞の恒常性の維持など重要な役割を果たしている。我々はその証明を背側神経根細胞を用いて行っていた。この細胞の軸索ではすべての微小管がマイナス端を細胞体に向けて並んでおり一定した方向性を持っていること、同時に軸索が太く観察に適していることからから微小管形成の動きを評価するのに適している。このとき NDEL1 のリン酸化状態を背側神経根細胞で観察すると有意に NDEL が活性化されており、同時に Aurora-A も活性化していた。この Aurora-A の発現量を減少させたときに、軸索進展の遅延が見られた。まだ現在のところでは現象の観察でしかないので、その生理的な意義は不明である。分裂を終了した神経細胞における Aurora-A の活性化の分子メカニズムとその下流で起こる作用機序について解明を試みる。

図1 背側神経根細胞 (DRC)



(2) 神経細胞遊走における Aurora-A の役割

Aurora-A は微小管形成中心(MTOC)において微小管形成の促進に関与する。それは神経細胞でも同様であると考えている。我々は滑脳症の研究で Lis1 のパートナー分子である NDEL1 のリン酸化による構造体の変化が微小管形成と細胞質ダイニンの制御に重要である事を証明している。微小管の再編と神経細胞の遊走について下記の図2に示されているようなダイニンの複合体が重要であると考えている。軸索の伸長と同様に Aurora-A が神経細胞の遊走にも機能を持つことを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞における Aurora-A キナーゼの活性化とその生物学的意義の解明。

分子イメージング解析を中心に Aurora-A による NDEL1 の活性化による細胞質ダイニンの制御機構の解明を行う。解析はモータータンパク質の動態の観察に適している背側神経根細胞を用いて行う。最初に Aurora-A および NDEL1 のリン酸化の時系列的解析を発現タンパク質量の定量をウェスタンブロット法によっておこなう。また発現量と細胞内の時間的变化を分子イメージングによって詳細に解析する。さらにその上流および下流にある制御分子を探索する。その分子の機能を分子イメージングと siRNA のダウンレギュレーション実験や過剰発現系を用いて評価する。Aurora-A と NDEL1 の M 期初期でのリン酸化による活性化とは異なる分子系が神経細胞にはあることを明らかにする。

軸索伸展時における微小管の形成に中心体もある程度関与するが、がん細胞のように中心体が活性化してそのまま紡錘体にはならないことが微小管のライブイメージの観察からわかっている (下記 図3)。神経細胞では中心体の活性は形骸化していると推測しており、その代わりに中心体とは独立した微小管形成中心 MTOC が形成していることがわかっている。この領域に AuroraA, NDEL1 の細胞内局在を見ることが出来る。AuroraA-NDEL1 複合体と直接微小管の走行に関わる細胞質ダイニンとの調節分子の動態をライブイメージで評価する。

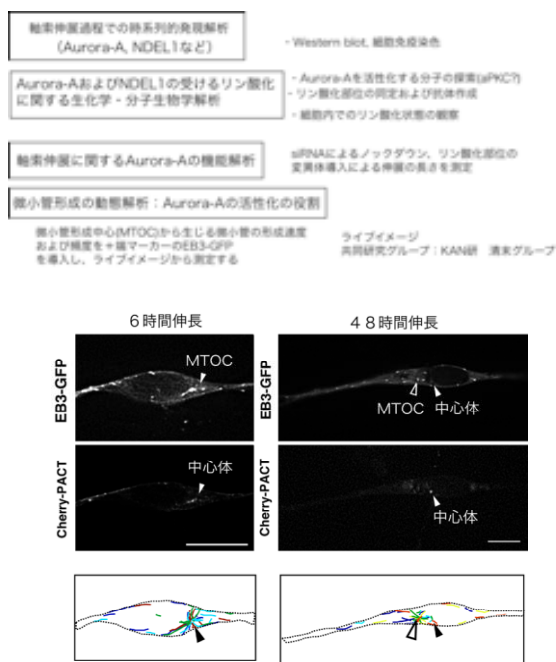


図3 微小管+端(EB3)の動態観察

(2) 神経細胞遊走における Aurora-A の役割の解明

Aurora-A は微小管形成中心(MTOC)において微小管形成の促進に関与する。それは神経細胞でも同様であると考えている(上記1)。Aurora-AによるNDEL1のリン酸化による構造体の変化が微小管形成と細胞質ダイニンの制御に重要であると考えている。微小管の再編と神経細胞の遊走について重要なダイニンの複合体の制御を明らかにする必要がある。軸索の伸長と同様にAurora-Aが神経細胞の遊走にも機能を持つことを証明する為に、先に述べた(1)の実験と類似しているが、分子機構を小脳の顆粒細胞を使った系において行う。最も重要な実験は、発生中の脳において実際にAurora-AがNDEL1に対して機能していることの証明である。この実験は14.5日胚のマウス脳にAurora-A遺伝子をin utero 遺伝子導入法によって発現させ、その脳切片についての形態学的な表現型の変化によってその機能を明らかにする。

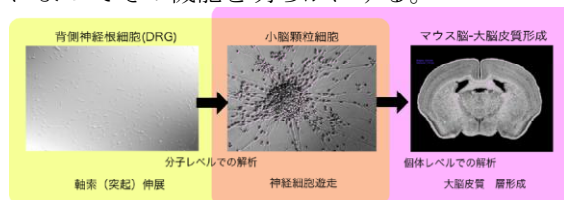


図4 Aurora-AとNDEL1の神経細胞における微小管形成とダイニン複合体の制御に関する機能解析の流れ

4. 研究成果

(1) Aurora-A の活性化と軸索伸長

Aurora-A は細胞分裂の制御という生理的な役割を持っている。また、繊維芽細胞の形質転換能を有するがん遺伝子としても知られており、ヒトのがん腫でもAurora-Aの過剰発現が報告されている。またAurora-AキナーゼにはNDEL1と共役して中心体の分離および成熟、紡錘体形成のプロセスにおいて重要な役割を担っている。このときにNDEL1はAurora-Aによってリン酸化修飾を受ける。我々は背側神経根細胞(DRG)の軸索でAurora-AとNDEL1の中心体・微小管形成中心(MTOC)においての機能を調べた。DRGは微小管形成の動きを評価するのに非常に適している神経細胞である。微小管の+端に局在するタンパク質であるEB3を用いてライブ観察を行ったところ軸索が十分に伸長した成熟DRGでは中心体に代わって新生したMTOCがその中心になっていた。NDEL1のリン酸化状態をDRGで調べると有意にNDEL1が活性化されており、同時にAurora-Aも活性化していた。またこのAurora-Aの発現量を減少させると軸索伸長が阻害された。神経細胞におけるAurora-Aの活性化の分子メカニズムとその下流で起こる作用機序について分子レベルでの解明を試みた。

(2) aPKC-AuroraA-NDEL1 カスケード

aPKC/Par6/Par3 複合体が神経細胞の軸索伸展を決定する極性に重要な因子であることは広く知られている。神経細胞においてはaPKCが中心体で活性化し、軸索伸展の極性形成決定に重要な因子であることはわかっている。ショウジョウバエの研究でAurora-AがaPKCをリン酸化して活性化することによって極性形成に作用することが報告されている。一方、我々はマウスの後根神経節の細胞ではaPKCがAurora-Aをリン酸化してAurora-Aを活性化し、活性型NDEL1をMTOCにリクルートし活性化する分子メカニズムを明らかにした。

Aurora-Aキナーゼとその標的因子であるNDEL1の軸索の突起伸展における機能を調べるために、微小管動態を前述のEB3-GFPの発現をモニターすることによって確かめた。Aurora-AのノックダウンおよびaPKCによるリン酸化部位の変異体導入により、EB3のMTOCから生じる速度・頻度の減少が観察された。aPKCによるAurora-Aのリン酸化による活性化とそれに伴うTPX2やNDEL1の活性化がDRGニューロンにおいてMTOCを活性化し突起伸展に重要な役割を持つことを示唆している。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 大輔 (MORI DAISUKE)

名古屋大学・医学系研究科・COE 特任講師

研究者番号：00381997

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし