

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300126

研究課題名(和文) 神経系構築における細胞骨格系制御因子 APC2 の機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of APC2 functions in the regulation of cytoskeletal dynamics during neuronal development

研究代表者

新谷 隆史 (SHINTANI, Takafumi)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・准教授

研究者番号：10312208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000 円、(間接経費) 4,410,000 円

研究成果の概要(和文)：APC2について遺伝子欠損マウスを作製し、脳神経系の異常について解析を行った。まず、大脳皮質、海馬などの様々な脳の領域で、層構造が正常に形成されていないことを見出した。また、これらの層構造の異常は誕生した神経細胞が秩序だった細胞移動を行わずに、ランダムに移動することによって生じることを明らかにした。さらに、APC2を欠損した神経細胞は、移動中の神経細胞を誘引する因子や遠ざける因子に応答する能力を欠いていることを見出した。APC2は微小管やアクチン骨格に結合し、それらを制御することを通して、細胞外の情報を細胞骨格に正確に伝えるという、非常に重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Adenomatous polyposis coli 2 (APC2) is mainly expressed in the nervous system and known to regulate microtubule stability in neurons. I show that a lack of Apc2 induces severe laminary defects in some regions of the brain including the cerebral cortex and cerebellum. In vivo BrdU labeling and immunohistochemical analyses with specific markers suggested that the laminary abnormalities are a result of poorly regulated neuronal migration by a cell-autonomous mechanism. Analyses of cerebellar granule cells revealed that the BDNF-stimulated directional migration is impaired in Apc2-deficient cells. We found that APC2 is distributed along actin fibers as well as microtubules by TIRF microscopy, and that BDNF-stimulated F-actin formation at the leading edge is impaired in Apc2-deficient neurons due to the dysregulation of Rho GTPase activity. These results suggest that APC2 is an essential mediator of the cytoskeletal regulation at leading edges in response to extracellular signals.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経発生 神経分化 細胞骨格 細胞移動

1. 研究開始当初の背景

我々の脳神経系が、感覚、運動、情動、記憶・学習などの高次の神経機能を発現するためには、発生過程において神経回路網が正しく形成されることが必要不可欠である。脳においては神経細胞が皮質や神経核に整然と配置され、それぞれが特異的神経回路を形成している。発生過程において、細胞分裂により神経幹細胞から誕生した未分化な神経細胞は、分裂領域から適切な部位に移動して神経層形成や神経核形成を行うとともに、分化・成熟を行い、軸索と樹状突起を伸展させて他の神経細胞等との間に特異的シナプスを形成する。神経細胞の移動や軸索と樹状突起の伸長においては、外部の様々な因子からの情報が最終的に神経細胞内の細胞骨格系の動態の変化を導くと考えられるが、細胞骨格系の動態を制御する機構については依然不明な点が多い。

人において Doublecortin や *Lis1* などの、微小管を制御する分子に異常があると、神経細胞の移動に異常が生じ、X染色体連鎖性滑脳症やミラー・ディッカー症候群などの難治性てんかんと精神遅滞をともなう滑脳症を発症する(文献)。一方、Cyclin-dependent kinase 5 (*Cdk5*)は、その活性化因子(*p35*, *p39*)による制御を介して Doublecortin 等の微小管を制御する因子をリン酸化することで、細胞移動や神経回路形成に機能するのではないかと考えられている(文献)。このように、微小管の制御が重要であることが明らかになりつつあるが、詳細については不明である。

我々は、癌抑制因子である APC (Adenomatous polypolysis coli)に相同性が高く、神経系において特異的に発現する APC2 について解析を行い、APC2 が細胞骨格である微小管に結合し、その安定性を制御することにより、軸索ガイダンス分子に対する軸索の応答性を決定していることを明らかにした(*J. Neurosci.*, 2009)。また、ニワトリ網膜における APC2 の発現を抑制すると、視神経の視中枢への投射に異常が生じることから、APC2 は微小管の制御を通して神経回路形成において重要な役割を果たすことが示唆されていた。

2. 研究の目的

我々は、APC2 について遺伝子欠損マウスの作製に成功した。そこで本研究においては、APC2 の遺伝子欠損マウスについて、詳細な解析を進めることにより、APC2 の脳形成における生理機能を明らかにするとともに、APC2 と相互作用する分子との解析を行うことにより、APC2 が関与する情報伝達経路を明らかにする。最終的に、これらを通して脳形成における細胞骨格系の制御機構について統合的に解明することを目的とする。

特に、以下の点について明らかにすることを旨とした。

(1) APC2 遺伝子欠損マウスにおける脳の構造異常について発生を追って詳しく解析することにより、この異常が細胞移動の異常によるものかどうかを明らかにする。

(2) 細胞骨格系の異常が神経細胞の形態異常を引き起こす可能性があるため、APC2 遺伝子欠損マウスにおける神経細胞形態の異常の有無を明らかにする。

(3) APC2 遺伝子欠損マウスにおける神経回路形成の異常の有無について明らかにする。

(4) APC2 遺伝子欠損マウスにおける脳・神経系における構造の異常がどのような行動学的な異常として現れるかについて明らかにする。

3. 研究の方法

APC2 遺伝子欠損マウスについて下記の解析を行う。

(1) 中枢神経系の構造の解析

APC2 欠損マウスと野生型マウスについて下記の解析を行い、比較をすることで中枢神経系の構造における異常を明らかにする。

発生過程を追って、中枢神経系の組織切片について核染色及び神経細胞の特異的抗体や、グリア細胞の特異的抗体を用いた免疫染色を行うことによって、脳・神経系の各部位における層形成や神経核形成について解析を行う。

プロモデオキシウリジン (BrdU) を動物個体に投与すると、DNA 合成を行っている増殖中の細胞のゲノムに取り込まれる。BrdU を取り込んだ細胞については、特異的抗体を用いて組織科学的に検出することが出来る。BrdU を取り込ませ後、直ちに解析を行えば、細胞増殖の部位を明らかにすることが可能であり、また、一定時間後に解析を行えば、増殖後細胞移動を行っている細胞について解析することが可能である。本法を用いて、大脳皮質および小脳について細胞増殖並びに細胞移動について詳細に解析する。

(2) 神経細胞の形態解析

APC2 欠損マウスと野生型マウスについて下記の解析を行い、比較をすることで神経細胞の形態における異常を明らかにする。

ゴルジ染色を行うことにより、脳の各部位における神経細胞の形態を明らかにする。また、スパインの形態や密度についても解析を行う。

脳の各部位から調製した神経細胞について分散培養を行うことにより、培養下における形態の異常について明らかにする。また、これらの細胞について、細胞骨格系タンパク質に対する抗体や、それらを制御する分子に対する抗体を用いて免疫染色を行い、それらの神経細胞内の発現と分布について解析を行う。

(3) 神経回路形成の解析

APC2 欠損マウスと野生型マウスについて下記の解析を行い、比較をすることで神経回路形成における異常を明らかにする。

視神経の上丘への投射系を用いて解析を行う。視神経軸索が上丘へ到達した時期(生後0-2日)や軸索の分岐形成が盛んな時期(生後2-4日)、不必要な軸索が除去される時期(生後4-6日)及び、投射が完成した時期(生後7日頃)に、上丘における視神経軸索の走行について、一部の視神経を蛍光トレーサー(Dil等)により標識し観察を行う。

背側外側膝状体へは両側の網膜からの投射があるが、投射の完成時には、同側性の視神経と対側性の視神経の投射領域は明瞭に分離されている。このような分離は、投射開始時に誤って重なって投射をしていた軸索が、発生に伴って除去されることにより生じると考えられている。このような過程を投射の精密化(refinement)と呼ぶ。背側外側膝状体への投射形成、特に精密化に APC2 が関与するかどうかについて明らかにするために、左右の眼球内にそれぞれ異なる蛍光トレーサー(Alexa488-, Alexa594-コレラトキシン)を注入し、発生を追って解析する。

(4) 行動学的解析

APC2 欠損マウスと野生型マウスについて下記の解析を行い、比較をすることで神経回路形成における異常を明らかにする。

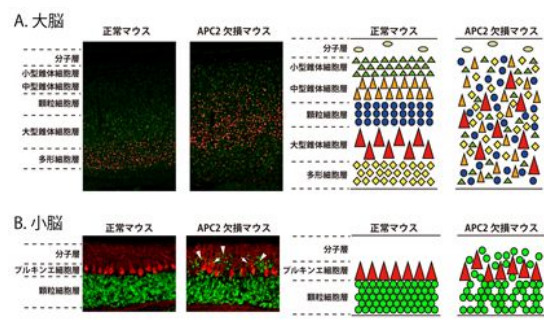
オープンフィールドテストを用いて新規環境下における自発運動について解析することにより、運動活動性、探索行動、情動反応における異常について明らかにする。

ローターロッド(回転棒)テスト、懸垂テスト等を行うことにより、運動機能について明らかにする。

4. 研究成果

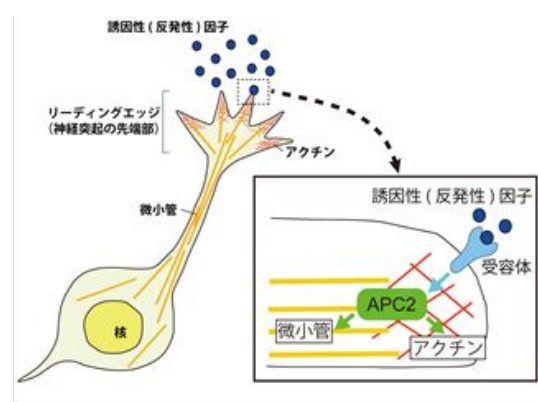
APC2 遺伝子欠損マウスにおける脳神経系の異常の有無について解析を行った。その結果、大脳皮質、海馬、小脳、嗅球などの様々な脳の領域で、層構造が正常に形成されていないことを見出した。また、各種の層特異的な分子に対する抗体染色や、プロモデオキシウリジンをを用いた birth date 解析から、これらの層構造の異常は、誕生した神経細胞が秩序だった細胞移動を行わずに、ランダムに移動することによって生じることを見出した(図1)。

図1 .APC2 欠損マウスの脳で観察される層構造の異常



さらに、小脳顆粒細胞の初代培養系を用いた細胞生物学的解析並びに生化学的解析を行った。共焦点レーザー顕微鏡並びに全反射顕微鏡を用いた解析により、APC2 は微小管やアクチン骨格に結合することを見出した。APC2 を欠損した顆粒細胞においては、安定化した微小管であるアセチル化チューブリン量が減少していた。さらに、小脳顆粒細胞に BDNF を作用させると、APC2 を欠損した顆粒細胞においては、BDNF の勾配に沿った細胞移動が正常に起こらないことが観察された。この時、野生型の顆粒細胞においては BDNF 刺激によって Rac1 および Cdc42 の活性化が見られるのに対して、APC2 を欠損した顆粒細胞においてはそれらの活性化が生じないことが判明した。これらの結果から、APC2 は微小管及びアクチン骨格系と共局在し、それらを制御することを通して細胞外の情報を細胞骨格に正確に伝えるという、重要な役割を果たしていると考えられた(図2)。

図2 . 予想される APC2 の働き



APC2 遺伝子欠損マウスについて行動学的解析を行ったところ、ローターロッド解析において運動機能の異常を見出した。また、歩幅が広くなるという異常も見出した。

脳の層構造異常を示す変異マウスにおいて、てんかんの症状がしばしば見出される。APC2 遺伝子欠損マウスにおいても同様に、てんかんの症状が見出された。

さらに、APC2 遺伝子欠損マウスにおける神経回路の異常の有無について解析を進めた。その結果、APC2 遺伝子欠損マウスにおいては神経細胞の移動に異常があるものの、それぞれの神経細胞は軸索や樹状突起を伸長させること自体は正常であることが明らかになった。しかしながら、APC2 遺伝子欠損マウスのいくつかの神経投射において、神経軸索の適切な進路選択や神経結合形成に異常があることを見出した。これらの結果から、APC2 は神経細胞の移動のみでなく、神経投射の形成においても重要な役割を果たしていることが推測された。さらに解析を進めることで、APC2 の神経系構築において果たす役割の全体像が明らかになると期待される。本研究は、

ヒトにおいて神経細胞の細胞骨格系の異常によって生じる疾患が発症する仕組みや、それらの治療法の開発につながる可能性がある。

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)

Suzuki R, Matsumoto M, Fujikawa A, Kato A, Kuboyama K, Yonehara K, Shintani T, Sakuta H, Noda M. SPIG1 negatively regulates BDNF maturation. *J. Neurosci.* 34, 3429-3442, 2014. 査読有
doi: 10.1523/JNEUROSCI.1597-13.2014

新谷隆史、野田昌晴： 脳の層構造を作る分子。 *化学と生物* 51 (10), 665-666, 2013. 査読無

http://www.jsbba.or.jp/pub/journal_kasei/kasei_contents/vol51_10_2013.html

Sakuraba J, Shintani T, Tani S, Noda M Substrate specificity of R3 receptor-like protein tyrosine phosphatase subfamily towards receptor protein tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 288, 23421-23431, 2013. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M113.458489. Epub 2013 Jun 28.

Sugitani K, Ogai K, Hitomi K, Nakamura-Yonehara K, Shintani T, Noda M, Koriyama Y, Tani H, Matsukawa T and Kato S. A distinct effect of transient and sustained upregulation of cellular factor XIII in the goldfish retina and optic nerve regeneration. *Neurochem. Intern.* 61, 423-432, 2012. 査読有
doi: 10.1016/j.neuint.2012.06.004. Epub 2012 Jun 16.

Shintani, T., Takeuchi, Y., Fujikawa, A. and Noda, M. Directional neuronal migration is impaired in mice lacking adenomatous polyposis coli 2. *J. Neurosci.* 32, 6468-6484, 2012. 査読有
doi: 10.1523/JNEUROSCI.0590-12.2012.

[学会発表](計3件)

鈴木亮子, 加藤彰, 米原圭祐, 藤川顕寛, 松本匡史, 新谷隆史, 作田拓, 野田昌晴： SPIG1 は BDNF のプロセッシングを負に制御する 第36回日本神経科学学会大会 25年6月21日 京都国際会議場(京都)

新谷隆史、竹内靖、藤川顕寛、野田昌晴 APC2 欠損マウスにおいては神経細胞の指向的な移動に異常がある 日本分子生物学会

24年12月12日 福岡国際会議場(福岡)

新谷隆史、竹内靖、藤川顕寛、野田昌晴 APC2 は神経細胞の移動に必須である 日本神経科学大会 24年9月20日 名古屋国際会議場(名古屋)

[その他]
ホームページ等
<http://niwww3.nibb.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新谷 隆史 (SHINTANI, Takafumi)
基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・准教授
研究者番号：10312208