

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570249

研究課題名(和文) 大脳新皮質ニューロン移動における PDK1-Akt 経路の機能解析

研究課題名(英文) Regulation of neocortical neuronal migration by the PDK1-Akt pathway

研究代表者

伊藤 靖浩 (Itoh, Yasuhiro)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：50508108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質の発生において、神経系前駆細胞から産生されたニューロンは長い距離を移動して決められた目的地まで到達することにより、適切な神経回路を形成する。本研究ではその制御メカニズムについて明らかにすることを目的とした。遺伝子改変マウス等を用いた解析の結果、PDK1-Akt経路が微小管骨格の安定性あるいは核-中心体カップリングを制御することによりニューロンの移動速度をコントロールし、大脳皮質発生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the developing mammalian neocortex, neurons born within the inner pseudostratified layer ventricular zone migrate long distance radially toward outer region to form orderly aligned six layers within the cortical plate. Given that proper lamination of neocortex depends on timely and sequential arrival of functionally distinct neurons at the brain surface, regulation of the speed of migrating neurons is important, although the underlying mechanism remains unclear. Our results indicate that the PDK1-Akt pathway plays a crucial role in regulation of neuronal motility possibly through regulation of microtubule stability/dynamics and nucleus-centrosome coupling.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・発生生物学

キーワード：ニューロン移動 Akt

1. 研究開始当初の背景

哺乳類大脳新皮質は大まかに6層に区分され、各層に特異的なニューロンが局在している。発生期の脳新皮質において脳室帯に存在する未分化な神経系前駆細胞からは発生時間に従って6層 5層 4層 2/3層ニューロンが順序良く産生される。この時間軸に沿った情報を層構造という空間情報に変換して正しい皮質構築を実現するためには、ニューロンが分化直後に移動を初め且つ適切なスピードで移動することが重要である。しかし、ニューロンの移動スピードを制御するメカニズムは詳しく分かっていなかった。

Nadarajahらにより、大脳新皮質ニューロンは一定速度で移動するのではなく、移動と滞留を繰り返すことが報告された(Nadarajah et al. 2001)。更に、移動の過程を詳しく観察することによって、まず中心体が伸長突起内を進行方向に移動し、それに遅れて核が追いつくというステップを繰り返してニューロンが移動することが明らかになった(Solecki et al. 2004; 図1)。核-中心体カップリングと呼ばれるこの現象は移動中のニューロンに特徴的な現象であることが知られており、中枢神経系構築の基盤メカニズムであると考えられている。これまで核-中心体カップリングに関わる分子としてDISC1、Lis1、Nudel1、ダイニン、ミオシンなどが同定され、いずれも核が中心体に向かって動く現象(図1、ステップ2)を制御することが示された。一方で、伸長した突起先端に向かって中心体の移動のステップ(図1、ステップ1)を制御する分子あるいはメカニズムは詳しくわかっていなかった。

2. 研究の目的

申請者のグループではこれまでにセリン/スレオニンキナーゼAktが哺乳類繊維芽細胞の移動先端で活性化し、前後極性形成および細胞運動に必須の役割を果たすことを明らかにした(Higuchi et al. 2001,2008; Onishi et al. 2007)。Aktは大脳新皮質ニューロンの移動に関与する可能性が考えられるが、大脳新皮質発生におけるAktの機能はこれまで未解明であった。脳発生におけるAktの役割を検討するためAktの活性化因子PDK1を中枢神経系特異的にノックアウトしたマウスを作製したところ、大脳新皮質層構造の乱れが観察された。またPDK1ノックアウトあるいは優性抑制型Aktの導入によって、大脳新皮質ニューロンの移動速度が低下するという結果を得た。更にAktの活性を上昇させるとニューロンの移動速度が上昇しており、Aktの活性の強さがニューロンの移動速度を決定している可能性を示唆している。

ここで興味深いことに、PDK1ならびに

Aktの機能を阻害すると移動中のニューロンにおいて中心体と核の距離が短い細胞の割合が増え、逆にAktを活性化すると核と中心体の距離が長い細胞の割合が増加するという結果を得た。このことは、Aktが核-中心体カップリングのステップ1(図1)を制御している可能性を強く示唆している。そこで本研究ではこの独自の知見を基にAktの核-中心体カップリングにおける機能をさらに追及することによりニューロン移動の重要な素過程のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

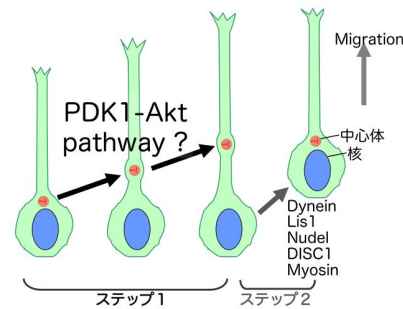


図1 ニューロン移動における核-中心体カップリング

3. 研究の方法

核-中心体カップリングにおけるAktの機能を調べるために、まずAktのリン酸化基質を同定する。これら候補分子の役割を解析することにより、核-中心体カップリングにおいてAktの下流で起こる現象を分子レベルで明らかにする。加えて、ニューロン移動あるいは核-中心体カップリングの素過程をより詳細に解析するために脳スライス培養システムを用いる。Aktの活性の変動あるいはそれともなう基質候補分子のリン酸化が核-中心体カップリングのどの素過程を制御するかをリアルタイムイメージングから解き明かす。更に、周期的に起こる核-中心体カップリングにおいて何時そして何処でAktが活性化しているか、あるいは微小管動態がどのように変化しているかについても検討を進める。

4. 研究成果

Aktが直接リン酸化する基質を探索する目的で、脳抽出液中に含まれるリン酸化ペプチドの網羅的検出を行なった。Akt活性化に必要な上流分子PDK1のノックアウトマウス脳とコントロール脳から検出されたリン酸化ペプチドを比較したところ、コントロール脳に比べてPDK1ノックアウト脳において微小管結合タンパク質のリン酸化が大きく変化していた。この結果は、PDK1ノックアウトにより微小管安定性が変化していることを示唆している。そこで、PDK1のノックアウトが微小管安定性に与える影響を検討するため、PDK1ノックアウトマウス脳抽出液中の重合微小管量を定量した。すると、PDK1ノックアウト脳において

は重合微小管量が減少していた。更に、PDK1 ノックアウト脳においては微小管に結合している微小管結合タンパク質群の結合量がコントロール脳に比べて大きく減少していることが明らかになった。従って、PDK1は発生期脳において微小管の安定性ならびに微小管結合タンパク質群の微小管への結合を制御することにより核-中心体カップリングを制御している可能性が示唆された。

PDK1-Akt経路が核-中心体カップリングのどの素過程を制御するかを理解するためにはAktがいつどこで活性化しているかを知ることが重要である。活性化しているAktの局在を大脳新皮質切片の組織染色によって調べたところ、活性化Aktの染色シグナルは移動中のニューロンの先端突起に強く観察された。従って、PDK1-Akt経路はニューロンの移動方向前方の突起内で活性化していることが示唆される。核-中心体カップリングは周期的に起こる現象であるため、PDK1-Akt経路の活性化がその周期のどのタイミングで起きているかを知るためにはAktの活性をリアルタイムに観察する必要がある。最近、Aktの新規のFRETプローブが開発された(Miura et al., 2014)。我々は既にこのプローブを入手し、脳に発現をさせることに成功している。更に解析を進めることにより移動中のニューロンにおけるAktの活性の時空間的な変化を詳細に明らかにする予定である。

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)

綿谷健二、平林祐介、伊藤靖浩、後藤由季子

PDK1 regulates the generation of oligodendrocyte precursor cells at an early stage of mouse telencephalic development.

Genes to Cells (査読有り) 2012, 17, 326-335,

DOI: 10.1111/j.1365-2443.2012.01591.x

Jacque P. K. Ip, Lei Shi, Yu Chen, 伊藤靖浩, Wing-Yu Fu, Andrea Betz, Wing-Ho Yung, 後藤由季子, Amy K.Y. Fu, and Nancy Y. Ip: α 2-chimaerin controls neuronal migration and proper functioning of cerebral cortex through regulation of CRMP-2

Nature Neuroscience (査読有り) 2012, 15, 39-47, DOI: 10.1038/nn.2972

伊藤靖浩、森山泰亘、長谷川強、遠藤高帆、豊田哲郎、後藤由季子

Scratch regulates neuronal migration

onset via an epithelial-mesenchymal transition-like mechanism

Nature Neuroscience (査読有り) 2013, 16, 416-425, DOI: 10.1038/nn.3336

伊藤靖浩、Kelsey Tyssowski、後藤由季子

Transcriptional coupling of neuronal fate commitment and the onset of migration

Current Opinion in Neurobiology (査読有り) 2013, 23, 957-964, DOI: 10.1016/j.conb.2013.08.003

桑原篤、酒井寛、徐源江、伊藤靖浩、平林祐介、後藤由季子

Tcf3 represses Wnt- β -catenin signaling and maintains neural stem cell population during neocortical development

PLoS One (査読有り) 2014, 9, e94408, DOI: 10.1371/journal.pone.0094408

[学会発表](計8件)

伊藤靖浩、後藤由季子: 大脳新皮質発生におけるニューロン移動開始制御、発生生物学会 秋期シンポジウム 2011、2011年12月19-21日、岡崎

伊藤靖浩、後藤由季子: Faithful coupling of neuronal fate commitment and the onset of neuronal migration during neocortical development, The 59th NIBB Conference - Neocortical Organization, 2012年3月10-13日、岡崎

伊藤靖浩、後藤由季子: 大脳新皮質発生におけるニューロン移動開始制御、第35回日本分子生物学会、2012年12月11-14日、福岡

伊藤靖浩、後藤由季子: Faithful coupling of neuronal fate commitment and the onset of neuronal migration during neocortical development, Keystone Symposia - Neurogenesis, 2013年2月3-8日、Santa Fe (米国)

伊藤靖浩、後藤由季子: Scratch triggers the onset of neuronal migration via an epithelial-mesenchymal transition-like mechanism, 2013年度包括脳ワークショップ, 2013年8月29日-9月1日、名古屋

伊藤靖浩、後藤由季子: Scratch triggers the onset of neuronal migration via an epithelial-mesenchymal

transition-like mechanism, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting - Stem Cell Biology, 2013 年 9 月 24-28 日, Cold Spring Harbor (米国)

伊藤靖浩、後藤由季子: PDK1-Akt pathway regulates neocortical neuronal migration, 3rd German-Japanese Neurogenesis Meeting 2013, 2013 年 10 月 13-16 日, 仙台

伊藤靖浩、後藤由季子: Scratch triggers the onset of neuronal migration via an epithelial-mesenchymal transition-like mechanism, Abcam Meeting - Neurogenesis 2013 in Matsushima, 2013 年 10 月 16-18 日, 仙台

[図書](計1件)

伊藤靖浩、後藤由季子 2013 **脳の発生学** 宮田卓樹、山本巨彦編
3章 「細胞運命決定の分子機構」、pp. 34-50、化学同人

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 靖浩 (ITOH YASUHIRO)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：5 0 5 0 8 1 0 8

(2) 研究分担者

後藤由季子 (GOTOH YUKIKO)
東京大学・薬学系研究科・教授
研究者番号：7 0 2 5 2 5 2 5