

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650174

研究課題名(和文)細胞外情報を微小管に伝える新規の情報伝達機構

研究課題名(英文)A novel mechanism to transmit information of extracellular signals to the cytoskeleton

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Apc2遺伝子欠損マウスについて解析を行った。その結果、Apc2遺伝子欠損マウスの大脳皮質、海馬、小脳、嗅球などの様々な脳の領域で、神経細胞の層構造が正常に形成されていないことを見出した。APC2は微小管並びにアクチン繊維と共局在し、細胞外の情報を細胞骨格に伝える上で必須の役割を果たしていると考えられる。さらに、APC2とLRRとの相互作用によって、APC2の細胞骨格制御能が減弱するが、このLRRの機能発現にある種のキナーゼが関与することを明らかにした。また、LRRファミリー分子の内、LRR1とLRR2について遺伝子欠損マウスを作製した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed Apc2-deficient mice, and found that a lack of Apc2 induces defective lamination in some brain regions, including the cerebral cortex, cerebellum, hippocampus, and olfactory bulb. APC2 is co-distributes with microtubules and actin fibers, and considered to be an essential mediator of the cytoskeletal regulation in response to extracellular signals. We further found that inhibition of APC2 functions on cytoskeleton by LRR is attenuated by a kinase inhibitor. We also generated LRR1- and LRR2-deficient mice.

研究分野：神経生物学

キーワード：細胞骨格 APC2 細胞移動 神経細胞 脳

### 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変異があると、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(引用文献)。一方、Cdk5 は、その活性化因子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(同上)。このように、微小管の制御が脳形成に重要であることが明らかになりつつあるが、制御機構の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、神経系において広く発現する 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(引用文献)。また、ニワトリ網膜神経節細胞における 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。

我々は、APC2 について遺伝子欠損マウスの作製に成功し、解析を開始した。予備的な解析の結果、*Apc2* 遺伝子欠損マウスにおいては、大脳皮質、海馬、小脳、嗅球等の脳内の様々な領域において、神経細胞の移動の異常に起因すると推測される構造変化を観察した。さらに、行動学的な観察により、本遺伝子欠損マウスは、運動障害等を示すとともに、てんかん症状を示すことも明らかになりつつあった。

一方、Yeast two-hybrid 法によるスクリーニングにより、APC2 が、細胞外領域にロイシンリッチリピート構造を有する膜タンパク質(LRR と呼ぶ)と結合することが明らかになった。微小管に結合しその動態を制御する

分子が、膜タンパク質と相互作用する例はほとんど知られていない。培養細胞に APC2 と LRR を共発現させると、APC2 の微小管安定化能が抑制されることから、両者の相互作用が微小管の動態制御において重要な役割を果たしていると推測される。

### 2. 研究の目的

本研究においては、以下の点について明らかにすることを旨とする。

- (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。
- (2) 微小管制御因子 APC2 と膜タンパク質の LRR が、どのように相互作用し、その相互作用の結果何が起きているかについて、細胞生物学的、並びに生化学的に明らかにする。
- (3) APC2 遺伝子欠損マウスと LRR 遺伝子欠損マウスを用いて、両分子が遺伝的に相関するかを明らかにするとともに、個体レベルでの異常について明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (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。

##### 免疫組織化学的解析

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をを用いたトレーサー解析

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) APC2 と LRR の相互作用についての細胞生物学的・生化学的解析

これまでの解析によって、APC2 は LRR と相互作用すると、微小管から離れ、微小管に対する安定化能が消失することを明らかにしている。一方、LRR は APC2 との相互作用により、Triton 可溶性画分から細胞骨格タンパク質に富む Triton 不溶性画分へ移行する。LRR と APC2 の相互作用においては、両分子について、リン酸化やユビキチン化等による制御の可能性が考えられるので、各種のキナーゼやプロテアーゼの阻害剤等を使用した場合に、上記の反応が抑制されるかについて検討することにより、相互作用に關与する情報伝達機構を明らかにする。また、両分子について、リン酸化等の修飾を受けない変異コンストラクトや、様々な領域を欠失した変異コンストラクトを用いて解析することにより、相互作用に必須の領域およびアミノ酸部位を明らかにする。

#### (3) APC2 と LRR の相互作用についての個体レ

## レベルでの解析・遺伝学的解析

APC2 遺伝子欠損マウスについては解析が進んでおり、これまでに、大脳皮質、海馬、小脳、嗅球において、細胞移動の異常に起因すると考えられる、層構造の異常を観察している。また、視神経軸索の投射についても異常を見出している。生化学的には、微小管の安定性が低下しているなどの変化を観察している。

さらに、LRR について遺伝子欠損マウスを作製し、解析を行う。具体的には下記の研究を進めることにより、APC2 と LRR の相互作用についての個体レベルで明らかにする。

### LRR 遺伝子欠損マウスの解析

LRR 遺伝子欠損マウスにおける脳・神経系の異常について、解剖学的に調べる。また、視神経の投射について投射異常の有無を明らかにする。特に、APC2 遺伝子欠損マウスにおいて変化が認められた点を重点的に解析する。以上の結果について、APC2 欠損マウスの解析結果と比較し、APC2 と LRR の間に相関関係があるかを明らかにする。

APC2 遺伝子欠損マウスと LRR 遺伝子欠損マウスの交配による遺伝学的解析

APC2 遺伝子欠損マウスと LRR 遺伝子欠損マウスを交配することによって、様々な遺伝子型のマウスを作成する。もし両分子が遺伝的に関連しているのであれば、形質の異常が相加的にならず、強調されたり減弱されたりする。たとえば、それぞれがヘテロ欠損の場合には異常は無いが、両者がヘテロ欠損になった場合には異常形質が発現する可能性がある。また、両者がともに欠損した場合には、APC2 遺伝子欠損マウスで見られる異常が消失する可能性がある。

APC2 遺伝子欠損マウスと LRR 遺伝子欠損マウス由来の細胞を用いた解析

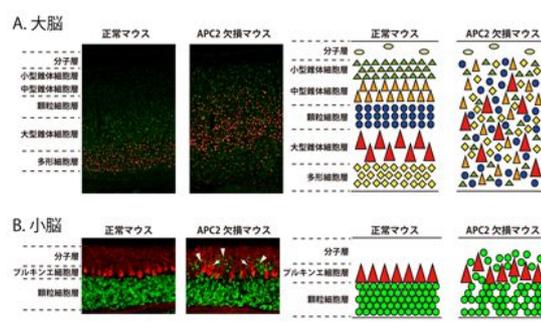
APC2 遺伝子欠損マウスと LRR 遺伝子欠損マウスを交配することによって得られた様々な遺伝子型のマウスより初代培養細胞を調製し、細胞移動や細胞骨格の動態について解析する。また、それらのマウスの脳・神経系について生化学的に解析する。以上の結果を総合することにより、APC2 と LRR の間に相関関係があるかを明らかにする。

## 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。*Apc2* 遺伝子欠損マウスの巨視的な観察からは異常は見られなかった。一方、神経細胞に特異的なマーカー抗体を用いた組織学的解析により、大脳皮質、海馬、小脳、嗅球などの様々な脳の領域で、神経細胞の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

とを明らかにした(図 1)。

図 1 .APC2 欠損マウスの脳で観察される層構造の異常



細胞生物学的並びに生化学的解析により、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、重要な役割を果たしていると考えられた。実際に、小脳より調製した顆粒細胞に神経栄養因子の BDNF を作用させると、野生型の顆粒細胞においては神経突起の先端部にアクチン骨格の著しい発達を観察されたのに対し、*Apc2* 遺伝子を欠損した顆粒細胞においては、このようなアクチン骨格の形成は見られなかった。これらの結果から、APC2 は細胞外の情報を細胞骨格に伝える上で必須の役割を果たしていると考えられる。

APC2 と LRR との相互作用によって APC2 の微小管安定化能が消失する。この際にどのような情報伝達機構が働いているかを明らかにするために、様々な阻害剤を用いた解析を行った。その結果、ある種のキナーゼの阻害剤により、APC2 に対する LRR の作用が減弱することを見出した。この結果から、APC2 と LRR の相互作用において APC2 がリン酸化される可能性が示唆された。このため、APC2 についてリン酸化が予想されるアミノ酸に変異を施した変異体を作製し、解析を行っている。

一方、LRR ファミリーのうち LRR1 について遺伝子欠損マウスの作製を行った。LRR 遺伝子欠損マウスにおいては、脳組織の層構造に異常が見られなかった。LRR2 が LRR1 の欠損を補償している可能性が考えられたため、LRR2 についても遺伝子欠損マウスの作製を行った。現在 LRR1 と LRR2 の二重欠損マウスについて解析中である。

### <引用文献>

Wynshaw-Boris, A. Lissencephaly and LIS1: insights into the molecular mechanisms of neuronal migration and development. *Clinic. Genetics* 72, 296-304 (2007).

Shintani, T., Ihara, M., Tani, S., Sakuraba, J., Sakuta, H., and Noda, M. APC2 plays an essential role in axonal

projections through the regulation of microtubule stability. *J. Neurosci.* 29, 11628-11640 (2009).

#### 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 7件)

Shintani, T., Higashi, S., Takeuchi, Y., Gaudio, E., Trapasso, F., Fusco, A. & Noda, M. The R3 receptor-like protein-tyrosine phosphatase subfamily inhibits insulin signaling by dephosphorylating the insulin receptor at specific sites. *J. Biochem.* 査読有、in press.

Almuriekh, M, Shintani, T., Fahiminiya, S., Fujikawa, A., Kuboyama, K., Takeuchi, Y., Nawaz, Z., Nadaf, J., Kamel, H., Kitam, A.K., Samiha, Z., Mahmoud, L., Ben-Omran, T., Majewski, J., and Noda, M. Loss of Function Mutation in APC2 Causes Sotos Syndrome Features. *Cell Repotrs* 査読有、10, 1585-1598 (2015)  
doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.011.

Suzuki, R., Matsumoto, M., Fujikawa, A., Kato, A., Kuboyama, K., Yonehara, K., Shintani, T., Sakuta, H., and Noda, M. SPIG1 negatively regulates BDNF maturation. *J. Neurosci.* 査読有、34, 3429-3442 (2014).  
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、査読無 51 (10), 665-666 (2013)  
<http://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.51.665>

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

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.* 査読有、61, 423-432 (2012).  
doi: 10.1016/j.neuint.2012.06.004.

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

[学会発表](計 4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 2013年6月21日 京都国際会議場(京都府京都市)

Shintani, T., Sakuraba, J., Tani, S. and Noda, M. Similar or distinct substrate specificity of receptor protein tyrosine phosphatase R3 subfamily members towards receptor protein tyrosine kinases. 10th International Conference on Protein Phosphatase 2013年2月8日、国立がんセンター(東京都中央区)

新谷隆史、竹内靖、藤川顕寛、野田昌晴  
Directional neuronal migration is impaired in mice lacking adenomatous polyposis coli 2, 2012年12月12日、マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

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、2012年9月20日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

[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