

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659031

研究課題名(和文) 大脳皮質神経前駆細胞の増殖を制御する新たな分子基盤の探索

研究課題名(英文) A search of novel molecular mechanisms regulating neural progenitor cell proliferation in the cerebral cortex

研究代表者

加藤 裕教 (Kato, Hironori)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：50303847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質の発達において、神経前駆細胞の増殖を制御することは、大脳皮質の神経細胞の総数を決定し機能的な大脳皮質を形成する過程において非常に重要な要素である。本研究では、シグナル伝達の分子スイッチとしての役割を果たすRhoファミリーG蛋白質の活性制御因子に焦点を当て、大脳皮質の発生過程において各活性制御因子の発現時期と分布の解析を行い、これまでにsrGAP3が大脳皮質発生初期の神経細胞の移動に関わっている可能性を示唆する結果が得られている。

研究成果の概要(英文)：In the developing cerebral cortex, the regulation of neural progenitor cell proliferation is one of most important element for the determination of the total number of neurons and the formation of the functional cerebral cortex. In this research, we focused on the regulatory factors for the activities of Rho family G proteins, which function as molecular switches of signal transductions. We analyzed expression periods and patterns of regulatory factors during the development of the cerebral cortex, and obtained results indicating the possibility that srGAP3 is involved in the migration of neurons in the cerebral cortex during early developmental stages.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞・組織 シグナル伝達 脳・神経 発生

1. 研究開始当初の背景

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。大脳皮質の興奮性神経細胞は、脳室に沿った脳室帯とよばれる領域で神経前駆細胞から誕生し、その後基底膜方向へと移動し層構造を形成する。大脳皮質の発達初期において、神経前駆細胞は脳室帯で増殖するが、神経前駆細胞が一度神経細胞へと分化するとそれ以上増殖することができない。従って、神経前駆細胞の増殖を制御することは、大脳皮質の神経細胞の総数を決定し機能的な大脳皮質を形成する過程において非常に重要な要素である。また神経細胞の数の異常がヒトでは小頭症などの脳機能に障害が起こる疾患の重大な要因の1つと考えられている。そのため神経前駆細胞の増殖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り、さらには神経細胞の再生を視野に入れた基礎研究の推進に貢献できることも考えられる。神経前駆細胞の増殖を制御する分子メカニズムに関するこれまでの研究は、主に FGF や Wnt などの細胞外因子や bHLH や Sox などの核内に存在する転写因子が中心で、これまでも数多くの研究成果が報告されている。ところが、細胞外の因子がどのようなシグナル伝達を介して核内の転写因子を活性化し、神経細胞の増殖を制御しているかについてはあまり理解が進んでいないのが現状である。

Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質は、様々な刺激に応答して主に細胞の形態変化を引き起こすシグナル伝達の分子スイッチとしての役割を果たす蛋白質ファミリーで、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、特にノックアウトマウスなどを用いた解析から、Rac1 や Cdc42 が大脳皮質形成に深く関わっていることが報告されている。ところがこれらのノックアウトマウスは発生初期の段階から異常が見られるため、神経前駆細胞の増殖を含め、各発達段階における詳細な機能については不明な点が多く残されている。一方、申請者が研究対象としている RhoG に関しては、申請者が研究を始める以前はその機能やシグナル伝達についてほとんどわかっていなかったが、申請者らはこれまでに、Rho ファミリー G 蛋白質の1つ、RhoG が、胎児期のマウス大脳皮質の脳室帯に存在する神経前駆細胞に発現しており、その増殖を促進する機能があることを明らかにした。(Ishikawa et al. *Brain Res.* 2002; Fujimoto et al. *Mol. Biol. Cell* 2009)

2. 研究の目的

これまでの申請者らの研究成果をもとに、神経前駆細胞において神経前駆細胞の増殖

を制御する働きに関わる Rho ファミリー G 蛋白質活性制御因子の同定を行い、さらには様々な細胞外刺激に対するシグナル伝達の役割を明らかにすることで、神経前駆細胞の増殖を制御する新たな分子基盤の解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

1) マウス大脳皮質形成過程における G 蛋白質活性制御因子の発現部位や時期の解析

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。そこで様々な Rho ファミリー G 蛋白質活性制御因子について、それぞれ特異的なプロンプトを作成し、RT-PCR や *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いてマウスの胎児の大脳皮質における発現時期や発現パターンの解析を行った。そこで、大脳皮質の発達期において発現が見られたものの中で、特に神経前駆細胞の増殖が盛んに行われる時期に発現しているものについて、さらなる機能解析を行った。

2) マウス子宮内エレクトロポレーション法を用いた胎児大脳皮質神経前駆細胞における各 G 蛋白質活性制御因子の *in vivo* における機能解析

各 G 蛋白質活性制御因子の発現パターンの解析から、特にその発現パターンが神経前駆細胞の増殖と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ショートヘアピン RNA の作成を行った。これらを YFP 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の導入を行い、その後の増殖や神経細胞への分化に対する影響を解析した。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気パルスをかけることで、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遺伝子導入法である。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。特に神経前駆細胞の増殖を解析する方法として、エレクトロポレーションしてから決められた時間の後、増殖中の細胞において細胞周期の S 期の時にのみ取り込まれるプロモデオキシウリジン (BrdU) を母親マウスの腹腔内にインジェクションし、その後胎児の大脳皮質の切片を作

成し解析することで、BrdU が取り込まれた細胞の割合を in vivo で測定することが可能となっている (Fujimoto et al. *Mol. Biol. Cell* 2009)。この手法を用いて各 G 蛋白質活性制御因子に対する活性変異体や特異的のショートヘアピン RNA を導入して神経前駆細胞における増殖や神経細胞への分化に対する影響を in vivo で解析した。

4. 研究成果

1) マウス大脳皮質形成過程における G 蛋白質活性制御因子の発現部位や時期の解析

Rho ファミリー G タンパク質は、GTP が結合することにより活性型に、GDP が結合することにより不活性型になることで、細胞内シグナル伝達の分子スイッチとして働いている。その活性制御において、Rho ファミリー G タンパク質はグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) の働きによって GDP-GTP 交換反応が引き起こされ活性化される一方、GTPase 活性化因子 (GTPase-activating protein, GAP) によって GTP の加水分解反応が促進され不活性化される。大脳皮質の発生過程において各 RhoGAP が大脳皮質形成時に発現しているかどうかを調べるために、半定量的 RT-PCR 法を用いて発達段階のマウス脳における mRNA の発現を調べた。その結果、12 種類の RhoGAP のうち、srGAP3 を含む 9 種類の RhoGAP について mRNA の発現が認められた。そこでこれら 9 種類の RhoGAP に対してそれぞれ特異的な RNA プローブを作成し、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて mRNA がマウス脳のどの部位に発現しているかについて詳しく調べた。その結果、9 種類の RhoGAP のうち、srGAP3 mRNA が胎生 12 日齢および胎生 16 日齢のマウス大脳皮質の脳室帯に強く発現していることが明らかになった。脳室帯で srGAP3 の発現が見られた時期は、神経前駆細胞が豊富に存在し、増殖が起こりつつ神経細胞へと分化する時期になっていることから、srGAP3 が神経前駆細胞の増殖や分化に何らかの機能を担っている可能性が考えられた。

2) マウス子宮内エレクトロポレーション法を用いた胎児大脳皮質神経前駆細胞における各 G 蛋白質活性制御因子の in vivo における機能解析

胎生 16 日齢のマウス大脳皮質の脳室帯に強く発現していることが認められた srGAP3 について、まず、野生型である srGAP3b-WT、および GAP 活性を欠失させた変異体である srGAP3b-R518I を、それぞれ EYFP と同時に発現できるベクターに組み込むことにより、srGAP3 発現細胞にどのような変化が見られるか可視化できるようにした。また、コントロールとして EYFP のみを発現するベクターを用いた。これらを生体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

駆細胞に導入し、その後の神経前駆細胞の増殖や神経細胞への分化に対する影響を調べた。srGAP3 は Rac1 に対する GAP 活性を持つタンパク質であり、脳ではスプライシングバリエーションの srGAP3a、srGAP3b が発現している。これまでに統合失調症や 3p-症候群など遺伝的脳疾患に強い関連が示唆されているタンパク質ではあるものの、生体内における機能についてはあまりよく解明されていない。そこで我々は、子宮内エレクトロポレーション法を用いてこれらのベクターを胎生 14 日齢の胎仔マウスの神経前駆細胞へと遺伝子導入し、胎生 18 日齢に脳を摘出、その後観察を行った。その結果、コントロール群は胎生 18 日齢においてほとんどのニューロンが皮質板 (CP) へと正常な放射状移動を示したのに対し、野生型 srGAP3b-WT を導入されたニューロンは放射状移動が遅くなっていることがわかった (図 3)。一方、GAP 活性欠失変異体 srGAP3b-R518I も同様に神経前駆細胞へ導入したところ、srGAP3b-WT で観察されていたニューロンの放射状移動の遅れが認められなかった。以上の結果から、srGAP3 は大脳皮質形成過程において、GAP 活性を介してニューロンの放射状移動の制御に関わっている可能性が示唆された。

次に、srGAP3a、b 両方に対するショートヘアピン RNA (shRNA) を大脳皮質神経前駆細胞に導入したところ、神経細胞の移動の著しい遅延が見られた。また移動中の神経細胞の先端端が、コントロール群に比べてより長く伸長することが示された。逆に野生型の srGAP3a 及び b を過剰発現させると、双方ともにコントロール群に比べて短い先端端が見られた。これらの結果から、srGAP3 は大脳皮質発生初期の神経細胞の移動に関わっ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 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

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤裕教 (KATOU, 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

山内淳司 (YAMAUCHI, Junji)

独立行政法人国立成育医療研究センター

・室長

研究者番号：20335483