

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430042

研究課題名(和文) 神経前駆細胞の形態・移動を制御する新規分子群の機能解明

研究課題名(英文) Identification of novel genes that function in cell division and migration of neural progenitors

研究代表者

神原 伸一 (Sakakibara, Shin-ichi)

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：70337369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々が同定したradmisは哺乳類の神経前駆細胞(NSPC)に強く発現し、NSPCの放射状突起と分裂紡錘体に局在する。強制発現・発現抑制実験、共免疫沈降・プロテオーム解析から、radmisは中心体複製・分離、紡錘体形成、分裂後の放射状突起の再構築・伸長など、NSPCの特性に深く関わることを示された。一方、inka2遺伝子はin situ hybridizationにより胎生期に移動性のオリゴデンドロサイト前駆細胞やニューロンに発現し、培養細胞での機能抑制実験からアクチン骨格の再編成を調節し、細胞形態変化や細胞移動の推進力を発生させるのに必要な新たな分子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Developmental dynamics of neural stem/progenitor cells (NSPCs) are crucial for embryonic and adult neurogenesis, but its regulatory factors are not fully understood. We identified the radmis gene, a novel microtubule associated protein highly enriched in NSPCs. Radmis is a substrate for the E3-ubiquitin ligase, anaphase promoting complex/cyclosome, and is degraded via the KEN box. Radmis was highly expressed in regions of active neurogenesis throughout life. In addition, we identified another NSPC gene, designated as inka2, a putative regulator of actin cytoskeleton reconstruction. Inka2 transcripts were detected in Olig2-positive oligodendrocyte progenitor cells during embryogenesis. In the adult brain, the expression of inka2 was interestingly confined in terminally differentiated neurons in the restricted forebrain regions. Inka2 may be involved in multiple actin-driven processes, including cell migration and establishment of neuronal polarity.

研究分野：神経科学

キーワード：神経前駆細胞 radmis 分裂紡錘体 微小管関連タンパク質 中枢神経系 細胞移動

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の神経幹細胞・前駆細胞 (NSPC) は発生期に豊富に存在するが、一部は成体脳にも受け継がれ、海馬歯状回や側脳室、第3脳室周囲の脳室下帯 (SVZ) に残り、新たなニューロンを生み出し続けることで、記憶や自律神経機能調節などに関係している事が示唆されている。神経幹細胞は特徴的な形態を有し、発生期には神経上皮細胞、放射状グリア (radial glia) と呼ばれ、軟膜に接する特有な放射状の細胞突起 (radial fiber) を伸ばしている。近年、細胞の運命決定にこの放射状突起が重要であることが報告され、放射状突起の機能や、そこに含まれる細胞成分の重要性が注目されつつある。一方、神経幹細胞から産生されニューロンあるいはグリア系譜にコミットした NSPC は、高い増殖能を持ち、脳内のニューロン・グリア供給を直接的にコントロールしている。しかし、この NSPC のダイナミックな細胞移動や形態変化の過程がどのような分子機構を使って遂行されるのか不明な点が多い。

2. 研究の目的

我々はこれまでに suppression PCR-subtraction 法により、マウス胎児期・成体脳の NSPC に強く発現する遺伝子群を同定し解析を進めている。本研究では、これらの中から NSPC の分裂、細胞形態や遊走に関わると考えられる2つの新規遺伝子 radmis と inka2 に焦点を絞り、生体における機能を解明することにより中枢神経系の発生過程の分子機構の一端を解明する。

3. 研究の方法

(1) Radmis と相互作用するタンパク質群の同定: Radmis 抗体によりマウス胎仔脳の抽出液から共免疫沈降・プロテオーム解析を行い radmis と相互作用するタンパク質を同定する。得られたタンパク質については、免疫染色により局在等を検討する。

(2) NSPC 維持における放射状突起の意義と radmis の役割: NSPC の放射状突起維持における radmis の役割を調べるため、マウス胎児 NSPC 初代培養に対して、radmis shRNA を導入し機能抑制実験を行い、放射状突起の形態変化を解析定量する。

(3) ヒト遺伝性小頭症家系における radmis の機能: ドイツケルン大学との共同研究によりヒト遺伝性小頭症家系のコレクションのエキソーム解析を行い、radmis が責任遺伝子である家系の有無、当該家系において機能的な radmis の発現があるか、さらにマウス胚芽において radmis タンパク質の発現があるか検討する。

(4) 細胞周期依存的 radmis タンパク質発現: radmis 発現が細胞周期依存的に制御されている可能性を検討するため、チミジンブロックにより同調培養した細胞を用いて radmis タンパク質の細胞内レベルの変動をウェスタンブロット解析する。

(5) radmis タンパク質の機能ドメインの

同定: radmis タンパク質は細胞分裂時の紡錘体微小管と中心体に局在する微小管関連タンパク質である。そこで radmis cDNA の各種欠失変異体を作製し、細胞に導入し紡錘体微小管や中心体へのタンパク質局在化に必要なドメインを同定する。

(6) in situ hybridization による inka2 mRNA 発現解析: Inka2 遺伝子については in situ hybridization により神経系での詳細な遺伝子発現パターンを明らかとする。

(7) Inka2 特異的抗体を作製し神経系でのタンパク質の発現パターンと細胞内局在を明らかにする。

(8) inka2 遺伝子機能 (in vitro 解析): inka2 の細胞移動における役割を検討するために inka2 shRNA vector を導入した NIH3T3 細胞に対して局所的な物理的剥離を行い、その後の細胞の移動能、剥離面の修復能を定量化 (スクラッチアッセイ) する。さらに全反射照明蛍光顕微鏡法 (TIRF) によるパキシリンの細胞内ライフタイムを計測する。

(9) inka2 遺伝子機能 (in vivo 解析): Inka2 遺伝子の生体内での機能を明らかにするために inka2 のコンディショナルノックアウトマウスを作製する。すでに KOMP において inka2 KO アリルを有する ES 細胞が樹立されているため、本 ES 細胞を米国から輸入し、連携研究者の徳永博士との共同でキメラマウス、ホモ接合マウスの作出を行う。

4. 研究成果

(1) radmis 遺伝子

radmis は、胎児期～成体脳の NSPC の分裂紡錘体極・中心体に局在し、強制発現・発現抑制実験から中心体複製や紡錘体形成を制御することで NSPC の正常分裂進行に必須の機能を担うと推定される (図 1)。共免疫沈降・プロテオーム解析の結果、radmis は胎生期脳において中心体関連タンパク質および中間径フィラメント nestin, vimentin に結合することが明らかとなった。

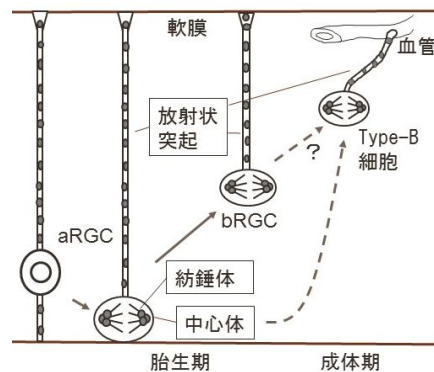


図 1: 胎生期・成体期の radmis 発現 (黒丸)

NSPC 初代培養に shRNA を導入し radmis 発現を抑制すると nestin 陽性の放射状突起の形成が有意に抑制された(図 2 参照)。

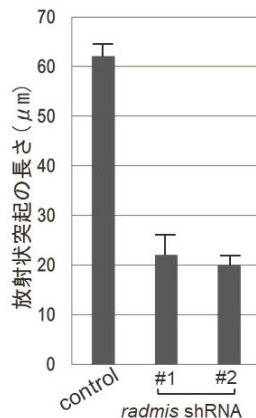


図 2: radmis 発現抑制による NSPC 放射状突起伸展抑制

ヒト遺伝性小頭症家系の全エクソーム解析により, radmis が小頭症, 精神遅滞, 手肢合指症を特徴とする Filippi 症候群の原因遺伝子であることが明らかとなった。Filippi 症候群の家系においては radmis エクソンに塩基置換, 欠失が見られ, その結果機能的な radmis タンパクが作られないことがわかった。さらに実際に Filippi 症候群由来の組織では radmis タンパク質が欠失していることが判明した。本症候群では合指症も主徴として現れるため, マウス胎仔の肢芽組織での発現を調べたところ, 肢芽の mesenchymal cells の分裂紡錘体で radmis 発現が確認された。この肢芽での radmis 機能欠損が細胞の分裂亢進, 細胞死の抑制などを引き起こすことで合指症が発症する可能性が示唆された。

一方, 同調培養細胞を用いた解析から, 細胞内の radmis タンパク質レベルは細胞周期依存的に厳密に制御されていて, M 期にそのタンパクレベルが上昇し, M 期脱出により急速にタンパク量がユビキチン化により消失することが明らかとなった。このユビキチン化は Cdh1 との共発現で促進されること, radmis の KEN ボックス変異体では radmis のユビキチン化が起きないことから, M 期後期に APC/C・Cdh1 により radmis の KEN ボックスがユビキチン化されることで細胞から消失すると考えられる。

以上の結果から, NSPC の細胞分裂の進行過程で radmis は APC/C・Cdh1 依存的に厳密に発現制御されていて, M 期において中心体タンパク質と複合体を形成し, 細胞周期進行・中心体複製・分離に重要な機能を担うこと, さらに radmis タンパク質が nestin と結合し, 放射状突起の維持・形成に必須の役割を持つことが示唆された。

(2) inka2 遺伝子

inka2 は Inka ドメイン(神経堤細胞の移動に必要とされる Inka1 にみられる機能不明ド

メイン)を持つことから, 細胞移動などに関与することが推定される。in situ hybridization の結果, inka2 mRNA は胎生期では延髄, 脊髄の腹側部脳室周囲のオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)など高い遊走能を持つ細胞に発現していることが示された。HEK293 培養細胞に inka2 を強制発現させると, アクチン線維の細胞内配置の異常が起こり, 細胞形態が球状に変化し細胞接着の阻害や, 過剰な数のフィロポディアが形成される。逆に, NIH3T3 細胞で shRNA による inka2 発現抑制, スクラッチアッセイを行うと, 細胞の遊走能は有意に増大し, 細胞移動が促進された。さらに shRNA によって inka2 を抑制するとフォーカルアドヒージョン分子であるパキシリンのライフタイムが減少することから, Inka2 はアクチン骨格の再編成, フォーカルアドヒージョン動態変化を起こし細胞移動を調節する新たな分子であることが示唆された。

一方, 生後のシナプス形成期においては, inka2 mRNA はニューロンで急速に発現が上昇していた。inka2 抗体による免疫染色観察から inka2 タンパク質は生後の大脳皮質, 海馬領域ニューロンの樹状突起のシナプス部位に局在していることが示唆された。inka2 と相互作用するタンパク質を同定するために, 培養細胞及びマウスの脳タンパク抽出液から GST プルダウンにより inka2 結合タンパク質を単離プロテオーム解析したところ, 細胞増殖, 移動などのシグナル伝達に関わるセリン/スレオニンホスファターゼおよび細胞骨格制御によりシナプス伝達や軸索突起伸長に関係する分子が単離された。以上の結果から, Inka2 は新たなアクチン関連タンパク質として, シナプスでのアクチン骨格を再編成することにより, スパイン形成・維持にも関与する可能性が示唆された。

個体レベルの脳形成, シナプス形成において inka2 遺伝子が果たす役割を明確にすることを目的とし, inka2 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウス(inka2 cKO)を作製した。cKO マウスにおいてエクソン間に LacZ 挿入されていることを利用して inka2 プロモーター活性を組織レベルで解析したところ, 海馬, 大脳皮質などの前脳領域のニューロンに特異的に遺伝子発現が制御されていることが明らかとなった。さらに inka2 cKO ヘテロ変異マウスに CAG-Cre マウスを交配し, inka2 遺伝子欠損ホモマウスを作製した。ホモ欠損マウスは肉眼的には正常な発生を遂げ, 脳の形態に大きな異常は認められなかった。しかし組織学的な解析の結果, inka2 欠損マウスの成体脳では側脳室の拡大, 大脳皮質, 海馬錐体細胞の樹状突起(apical および basal dendrite)の低形成が観察された。現在スパイン形態・数の変化など詳細な組織学的解析が進行中である。今後の解析により inka2 遺伝子がアクチン骨格再編成を介する神経発生期の細胞移動のみならず, 生後ニューロンのシナプス構造維持・可塑性など多様な脳

形成の局面に關与する可能性が明らかになると期待される。

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6件)

Akiyama H, Nakadate K, Sakakibara S. Synaptic localization of the SUMOylation-regulating protease SENP5 in the adult mouse brain. *J Comp Neurol*. 526:990-1005 (2018)

Akiyama H. and Sakakibara S. Cytoskeletons in neuronal development. *Review, Phys Fitness Sports Med*. 5: 131-142 (2016)

Iwasaki Y, Yumoto T, Sakakibara S. Expression profiles of inka2 in the murine nervous system. *Gene Expr. Patterns*. 19:83-97 (2015)

Hussain MS, Battaglia A, Szczepanski S, Kaygusuz E, Toliat MR, Sakakibara S, Altmüller J, Thiele H, Nürnberg G, Moosa S, Yigit G, Beleggia F, Tinschert S, Clayton-Smith J, Vasudevan P, Urquhart JE, Donnai D, Fryer A, Percin F, Brancati F, Dobbie A, Smigiel R, Gillissen-Kaesbach G, Wollnik B, Noegel AA, Newman WG, Nürnberg P. Mutations in CKAP2L, the human homolog of the mouse Radmis gene, cause Filippi syndrome. *Am J Hum Genet*. 95:622-632 (2014)

Hasegawa Y, Yoshida D, Nakamura Y, Sakakibara S. Spatiotemporal distribution of SUMOylation components during mouse brain development. *J Comp Neurol*. 522:3020-3036 (2014)

Yumoto T, Nakadate K, Nakamura Y, Sugitani Y, Sugitani-Yoshida R, Ueda S, Sakakibara S. Radmis, a novel mitotic spindle protein that functions in cell division of neural progenitors. *PLoS One* 8:e79895 (2013)

[学会発表](計10件)

α -tubulin の SUMO 化による微小管動態の制御 武正 夏実, 秋山 博紀, 榊原 伸一
第40回日本分子生物学会(2017年度生命科学系学会合同年次大会), 神戸ポートアイランド, 2017年12月7日

脱SUMO化酵素 SENP5 の新規アイソフォームの機能解析
秋山 博紀, 中舘 和彦, 榊原 伸一
第40回日本分子生物学会(2017年度生命科学系学会合同年次大会), 神戸ポートアイランド, 2017年12月7日

STAND ファミリー新規遺伝子 NWD1 の中枢神経系における局在・機能解析
山田 晴也, 秋山 博紀, 榊原 伸一
第40回日本分子生物学会(2017年度生命科学系学会合同年次大会), 神戸ポートアイランド, 2017年12月6日

Expression profile of SENP5 in the central nervous system

中枢神経系における SENP5 の局在解析

Hiroki Akiyama, Mikoto Nomura, Kazuhiko Nakadate, Shin-ichi Sakakibara
第39回日本神経科学学会大会, パシフィコ横浜, 2016年7月20日

Expression pattern of a novel gene inka2 in nervous system and analysis of its function in cell motility.

Yumi Iwasaki, Hiroki Akiyama, Shinichi Sakakibara
第39回日本神経科学学会大会, パシフィコ横浜, 2016年7月20日

Neural progenitor cells in the anterior medullary velum of the adult mouse

Mana Nagasawa, Sayaka Kato, Shin-Ichi Sakakibara
第39回日本神経科学学会大会, パシフィコ横浜, 2016年7月20日

他4件

[図書](計2件)

Ehara, A, Sakakibara S, Ueda S. The Role of Attractin in Neurodegeneration Caused by Oxidative Stress. "Free Radicals and Diseases", (Chapter 9) INTECH, Eds Ahmad R (2016). (ISBN978-953-51-2747-5)
<http://dx.doi.org/10.5772/63330>

Ueda S, Ehara A, Inoue K, Masuda T, Sakakibara S, and Yoshimoto K. Comparison of Neuroprotective Effect of Melatonin in the Nigrostriatal and Mesolimbic Dopaminergic Systems of the Zitter Rat. MELATONIN Therapeutic Value and Neuroprotection. Edts Srinivasan V, Gobbi G, Shillcutt SD, Suzen S (2014) CRC Press p179-188 (Chapter 15)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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

6．研究組織

(1)研究代表者

榊原 伸一 (SAKAKIBARA, Shin-ichi)
早稲田大学・人間科学学術院・教授
研究者番号：70337369

(2)研究分担者

()

(3)連携研究者

徳永 暁憲 (TOKUNAGA, Akinori)
国立長寿医療研究センター・室長
研究者番号：70549451

中舘 和彦 (NAKADATE, Kazuhiko)
明治薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：80372895

西田 有 (NISHIDA, Tamotsu)
三重大学・学内共同利用施設等・助教
研究者番号：50287463

(4)研究協力者

()