

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390052

研究課題名（和文）細胞骨格に係わる新たな分子複合体による細胞移動制御の解明・脳構築機構への展開

研究課題名（英文）Studies on how cytoskeleton-related molecules regulate neuronal migration, the brain formation as well as the maturation.

研究代表者

佐藤 真（SATO MAKOTO）

福井大学・医学部・教授

研究者番号：10222019

研究成果の概要（和文）：

LL5 β 、FILIP ともにアクチン結合蛋白フィラミンに結合し、細胞移動、特に大脳皮質形成期の細胞移動時に機能することが知られている。しかしながら、フィラミンはその脳での発現量が発達とともに減少することもあり、その成体脳での機能は不明であった。今回、ノックアウト動物などの解析を通じ、フィラミンとは異なるアクチン結合蛋白をそれぞれが介し、LL5 β はスパインの成熟に、FILIPは成体でのスパインの形態と機能に関わることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

It has been demonstrated that LL5beta and FILIP bind to filamin A, one of well-known actin-binding molecules, and exert their important activities over cell migration, especially radial migration that is essential for the neocortex development. In the present study, we further pursued the possible roles of LL5beta and FILIP in the adult brain and found that LL5beta plays an important role for spine development and that FILIP for synaptic transmission through modulating the morphology of spines and subcellular localization of glutamate receptors. In addition, we observed that some actin-binding molecules, other than filamin A, are involved in their activities.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞分化・細胞形成・細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質は皮質外からの移動神経細胞で構成される。大脳皮質神経細胞の70%～80%を占めるグルタミン酸作動性神経細胞は、脳室帯にて生まれ法線方向（脳室から脳表方向）に移動し（radial migration）大脳皮質を構成する。一方、GABA作動性神経細胞は基底核原基である ganglionic eminence で生ま

れ、大脳皮質内には法線方向と直交方向に、則ち tangential 方向に移入する。これら移動細胞の移動開始・移動途中の挙動に関わる分子機構については、近年解明が急速に進みつつある。一方、移動を止め、最終的な細胞配置に関わる、さらには移動停止に前後して起こる局所神経回路の形成に関わる仕組みの分子・細胞レベルでの解明はいまだ十分で

はない。そこで本研究では、神経細胞の移動制御機構のさらなる解明に加え、細胞が最終的に大脳皮質内に配置し、さらには回路を形成して機能を開始する仕組みについて分子・細胞レベルで解明することを目指す。ちなみに、radial migration を縦糸に、tangential migration を横糸になぞらえると、大脳皮質が細胞レベルで構築されるさまは縦糸と横糸からなる織物がおられていく様子にも例えられる。そして、大脳皮質はこの織物が幾重にも重なったものともいえようか。近年、この縦糸と横糸の乱れが大脳皮質の機能不全の原因となりうるとの考え、すなわち細胞移動の不全による大脳皮質内の神経細胞配置の乱れが様々な神経・精神疾患の原因（もしくは疾患発症への脆弱性の原因）となりうるとの考えがでてきた。我々は、この細胞の移動・配置と配置後の局所での回路形成の過程の分子機構を明らかにすることは、神経・精神疾患の理解や治療法開発へつながる重要なアプローチと考えている。

我々は、神経細胞移動に注目し、大脳皮質の形成過程の解明に取り組んできた。細胞骨格系のアクチンの動態に注目し、アクチン結合タンパク質であるフィラミンの分解を促進するFILIPを同定し、脳室帯からのradial migration に負の制御機構が存在する可能性を見出してきた。さらにフィラミンの細胞内量が移動途中の神経細胞形態制御に重要であることを報告し、またFILIPのフィラミンに対する働きを、フィラミンの細胞内局在を変化させオフに制御する機構を新たに見出し、その働きを担う分子LL5 β を同定した。同時に、新たなFILIP類似タンパク2種を同定した(未発表)。このうち、少なくとも一種は大脳皮質形成期の脳室帯に発現していた。

細胞移動開始を負に制御していると当初想定されたFILIPであったが、タンパク質発現を検討すると移動を開始する神経細胞のみならず、移動を終了した神経細胞においても発現が確認された(未発表)。これは同分子が移動停止に関しても何らかの役割を担っている可能性を示唆した。一方、tangential migration を行う神経細胞については、その移動制御についての研究はかなり進んでいるものの、フィラミンなどradial migration で重要な役割を担う分子の関与の可能性は検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では大脳皮質での神経細胞移動に関わるLL5 β 、FILIP及びその類似分子の機能をさらに検討し、あわせて移動停止時などでの働きの有無や役割を解析する。同時に、神経細胞が大脳皮質内に最終的に停止・配置し、

さらに前後して局所回路を形成し機能する際起こる様々な現象の仕組みを分子・細胞レベルで解明することを目的としている。

3. 研究の方法

研究の方法は大きくわけ、次の実験(1)、(2)に分かれる。

(1) LL5 β 、FILIP およびその類似分子の機能解析(特に細胞移動との関連・radial migration での意義について)・機能複合体の構成分子をプロテオーム解析の手法を用い検索・同定する。そして、複合体を構成するそれぞれの分子の機能および、その機能に対するLL5 β による時空間制御の意義を検討する。具体的には、各分子のノックダウンや結合部位変異分子・機能モチーフ部位変異分子の発現に基づく細胞移動変化を培養細胞およびradial migration 細胞に対して検討する。さらに、コンディショナルノックアウトマウスが完成したので、大脳皮質、海馬を中心にその機能解析、特に記憶に重要とされるlong term depression (LTD)、long term potentiation (LTP) との関係も含め、解析を進める。なお、機能解析のアッセイ系として、新たにlattice assay を樹立したので、その系をも用い解析を進める。

(2) 細胞移動停止後の機能する際に生じる諸現象の機構の解明を行う。局所回路の形成を検討できる系の樹立を目指す。

4. 研究成果

以下の成果を得た。研究方法(1)、(2)に対応させ、以下に記す。

LL5 β について～独自に作製したコンディショナルノックアウトマウスをEmx-Creマウスと交配し、ライン化を達成した。そのうえで、表現型を検索し、海馬スパインでの変異を見出した。ノックダウンによる予備的検討では、LL5 β が(回路形成初期に重要である)スパインの成熟を促進する働きがあることを見出した。さらに、その分子的基盤を解明するため、結合分子の検索を実施した。すると、LL5 β の結合相手としてスパインにて受容体動態に関わる分子を同定した。さらに一部の受容体とも結合することを見出した。また、スパイン形成への機構を検討する過程で、スパインの形態制御に関わる(フィラミンとは異なる)アクチン結合蛋白の一つとも結合し、その蛋白の機能を阻害することを見出した。これら結合相手は、独立してLL5 β に結合するというより、LL5 β と大きな複合体を形成している可能性が想定された。現在、その点について検討をすると同時に、LL5 β の機能について論文作成中であり、投稿準備中である。

FILIPについて～独自に作製したノックアウトマウスの表現型を検討し、大脳皮質内細胞配置の軽度の乱れを観察した。あわせて、脳内の局在を検討し、FILIPは大脳皮質では視覚野などの2～3層に散在性に発現すること、一方海馬を除く辺縁系、特に嗅内皮質や扁桃体に多くの発現神経細胞を認めた。FILIPを本来発現する嗅内皮質錐体細胞において、FILIPノックアウトによる形態変化を検討したところ、スパインの成熟過程への作用は観察されなかったが、成熟したスパインの形態への影響は観察された。同時に、機能分子としてグルタミン酸受容体の動態について検討したところ、FILIPのノックアウトによりスパインでの局在様式に変化が(特に化学的にLTPを起こさせた場合)生じていたことを観察した。さらに、膜電位感受性色素により脳(大脳皮質視覚野)での情報伝播を検討したところ、FILIPのノックアウトにより変化を観察し、FILIPが脳での神経回路機能に働くものと考えられた。一方、脳内でのフィラミンの発現量は発達とともに大きく減少しており、フィラミンに変わる別の分子がFILIPの機能に関わっていることが想像された。そのため、新たにFILIPの結合分子の検索を行い、成体ではミオシンの一種とFILIPが結合し働くこと、ノックアウトマウスでの表現型は、同定したミオシンの機能変化として説明しうることを見出した。FILIPの類似蛋白についても検討を進め、予備実験の段階であるが、それらの一つでは発現が海馬に見られること、さらにはFILIPと同様にスパインの形態制御に関わる可能性を見出した。現在もその現象の分子背景を検討している。

Radial migrationの際には、脳室帯などで生まれた神経細胞は突起を多く出した、いわゆる多極性の形態をとり、その後双極性に形態を変化させ、radial gliaの突起上を法線方向に移動する。この過程を詳細に検討するには、radial gliaの突起を明確に同定したうえで、移動のようすを検討する必要がある。一方、器官培養法では、そのような解像度は得られない。そこで、我々はradial gliaの突起(類似)構造を分散培養中の培養液に追加することで形成させることに成功した(lattice assay)。我々は、このアッセイを特定の層を作る神経細胞とradial gliaとの関連を検討する系として用い、その際、成長円錐の活動がradial gliaの突起と神経細胞がinteractし、移動し始める現象に重要な役割を担うことを見出した(発表論文1)。具体的には、我々は、in utero electroporation法により、特定の層となる神経細胞を標識し、そのうえでlattice assayを行い、神経細胞の挙動をタイムラプス法にて検討した。

脳内の神経回路の形成については、大脳皮質において層特異的な回路構築が想定されるので、解析の基盤となる層特異的な分子を検索し、いくつかの候補分子を同定した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

- ① Xie, M.-J., Yagi, H., Kuroda, K., Wang C.-C., Komada, M., Zhao, H., Sakakibara, A., Miyata, T., Nagata, K., Oka, Y., Iguchi, T. and Sato, M. WAVE2-Abi2 complex controls growth cone activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration. *Cerebral Cortex* (in press). doi: 10.1093/cercor/bhs123. (査読有).
- ② Urano, T., Shiraki, M., Yagi, H., Ito, M., Sasaki, N., Sato, M., Ouchi, Y. and Inoue, S. GPR98/Gpr98 Gene Is Involved in the Regulation of Human and Mouse Bone Mineral Density. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97(4):E565-74. doi: 10.1210/jc.2011-2393. (2012) (査読有).
- ③ Iguchi, T., Yagi, H., Wang, CC. and Sato, M. A tightly controlled conditional knockdown system using the tol2 transposon-mediated technique. *PLoS ONE* 7(3):e33380, doi: 10.1371/journal.pone.0033380. (2012) (査読有).
- ④ Komada, M., Asai, Y., Morii, M., Matsuki, M., Sato, M. and Nagao, T. Maternal bisphenol A oral dosing relates to the acceleration of neurogenesis in the developing neocortex of mouse fetuses. *Toxicology.* 16;295(1-3):31-8, doi: 10.1016/j.tox.2012.02.0132012. (2012) (査読有).
- ⑤ Takabayashi, T., Xie, M.-J., Takeuchi, S., Kawasaki, M., Yagi, H., Okamoto, M., Tariqur, R.M., Malik, F., Kuroda, K., Kubota, C., Fujieda, S., Nagano, T. and Sato, M. LL5 β directs the translocation of Filamin A and SHIP2 to sites of PtdIns(3,4,5)P3 accumulation and PtdIns(3,4,5)P3 localization is mutually modified by co-recruited SHIP2. *J. Biol. Chem.* 285(21):16155-16165, doi:10.1074/jbc.M109.081901. (2010) (査読有).
- ⑥ Yamada, M., Yoshida, Y., Mori, D., Takitoh, T., Kengaku, M., Umeshima, H., Takao, K., Miyakawa, T., Sato, M., Sorimachi, H., Wynshaw-Boris, A. and Hirotsune, S. Inhibition of calpain increases LIS1 expression and partially rescues in vivo phenotypes in a mouse model of

lissencephaly. *Nat. Med.* 15(10): 1202-1207, doi: 10.1038/nm.2023. (2009) (査読有).

- ⑦ Yagi, H., Noguchi, Y., Kitamura, K. and Sato, M. Deficiency of *Vlgr1* resulted in deafness and susceptibility to audiogenic seizures while the degree of hearing impairment was not correlated with seizure severity in C57BL/6- and 129-backcrossed lines of *Vlgr1* knockout mice, *Neurosci Lett.* 18; 461(2): 190-195, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.012>. (2009) (査読有).

[学会発表] (計 29 件)

- ① 佐藤 真 : 大脳皮質形成とスパイン形成の新たな共通分子基盤とその展開. シンポジウム (S19-3) 「神経発生・形成における細胞骨格の意義」第 117 回日本解剖学会全国学術集会, 2012 年 3 月 28 日, 甲府市.
- ② 佐藤 真 : Molecular aspects shared by the cortical development and the spine formation, and their potential involvement in the network remodeling. AAACL -2011 (Asian Aging Core for Longevity) 長崎シンポジウム Japan-Korea Joint Conference on Brain Aging and Neurodegeneration 2011 年 11 月 21 日, 長崎.
- ③ Xie, M.-J. et al. : Dendritic growth cone activities, regulated by Abl kinase and Cdk5 via WAVE2-Abi2, are essential for completing multipolar-bipolar transition and starting glia-guided locomotion. Society For Neuroscience 2011, 2011 年 11 月 15 日, ワシントン.
- ④ 佐藤 真 : dendritic growth cone activity regulated by Abl kinase and Cdk5 via WAVE2-Abi2 is essential for completing the multipolar-bipolar transition and initiating glia-guided locomotion. シンポジウム (S06-2) 「神経形態制御から機能へ-スペーシャルセルバイオロジーの観点から」第 54 回日本神経化学学会大会, 2011 年 9 月 27 日, 石川県山代.
- ⑤ 佐藤 真 : 破綻から学ぶ脳形成・発達のしくみ: 細胞分化・遊走から代謝、精神疾患まで. 特別講演, 日本薬学会北陸支部特別講演会, 2010 年 6 月 9 日, 富山.
- ⑥ 佐藤 真 : 大脳皮質において棘形成・発達と神経細胞遊走を司る新たな分子機構 (S1-3) 神経の発生・再生・移植研究会 第 25 回学術集会, 2010 年 5 月 22 日, 大阪.
- ⑦ Xie, M.-J., Yagi, H., Iguchi, T. and Sato, M. : Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate associated factor 1L5 β regulates

morphology and maturation of dendritic spines. ポスター 大阪大学グローバル COE フロクラム "System Dynamics of Biological Function", 2009 年 10 月 9 日, 淡路島

[図書] (計 1 件)

- ① 黒田一樹, 佐藤 真 : iPS 細胞研究とその周辺技術、「特集 1 神経系における iPS 細胞 (iPS 細胞の活用も含めた神経機能修復の現状と将来)」: 脳 21 Vol.14 №3. 金芳堂, 30(234)-34(238), 2011 年 7 月.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-fukui.ac.jp/KAIBOU2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 真 (SATO MAKOTO)
福井大学・医学部・教授
研究者番号: 10222019

(2) 研究分担者

八木 秀司 (YAGI HIDESHI)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10303372
謝 敏カク (XIE MIN-JUE)
福井大学・医学部・助教
研究者番号: 40444210
猪口 徳一 (IGUCHI TOKUICHI)
福井大学・医学部・特命助教
研究者番号: 60509305
池田 弘 (IKEDA HIROSHI)
福井大学・工学研究科・教授
研究者番号: 80377473