

平成30年6月12日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293066

研究課題名(和文) LIS1-細胞質ダイニンの分子ダイナミクスと滑脳症発症機構の解明

研究課題名(英文) Intracellular logistics of LIS1-cytoplasmic dynein in lissencephaly.

研究代表者

山田 雅巳 (Yamada, Masami)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：10322851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：滑脳症の責任遺伝子の多くが微小管関連因子に分類されることから、微小管上での細胞内輸送を指標に疾患発症に至る分子メカニズムの解明を試みた。まずは、LIS1-細胞質ダイニンと順行性輸送複合体を形成する微小管フラグメント(tMT)との結合因子としてアルファ-シヌクレインを同定し、LIS1含む輸送複合体と挙動を共にしていること、tMTの重合/脱重合を制御していること、この細胞内輸送制御がレビー小体(パーキンソン病、認知症で見られる封入体)形成に関与していることを明らかにした。本研究成果は、これらの神経変性疾患発症に至る共通の分子基盤としての細胞内輸送の重要性を大いに支持するものである。

研究成果の概要(英文)：LIS1 was identified as the gene mutated in individuals with lissencephaly, which is a devastating neurological disorder caused by defective neuronal migration. We previously proposed a model for a mobile tubulin fragments (tMT), in which cytoplasmic dynein is anchored to a short tMT by LIS1 followed by the kinesin-dependent anterograde transport. However, the mechanisms that produce tMTs have not been determined.

Here, we identified α -synuclein by immunoprecipitation method with anti- α -tubulin antibody, which has been linked to Parkinson's disease and dementia. Live-cell imaging showed that α -synuclein co-transported with LIS1, dynein and tMT in the anterograde transport. Our in vitro investigations of microtubule dynamics revealed that α -synuclein regulated the polymerization/depolymerization of short microtubule fragment. Our findings indicate that α -synuclein facilitates to form short, mobile tMTs that play an important role in the axonal transport.

研究分野：細胞生物学、生化学、神経科学

キーワード：滑脳症 神経変性疾患 細胞内物質輸送 微小管モーター 微小管 LIS1 細胞質ダイニン シヌクレイン

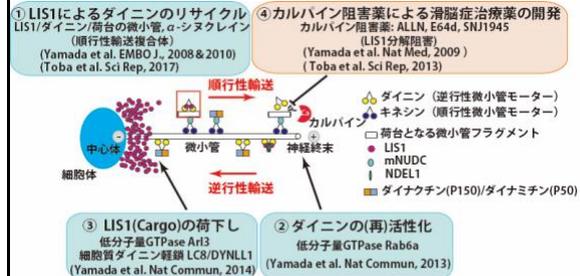
1. 研究開始当初の背景

私たちは、先天性神経疾患の滑脳症について、その疾患発症に至る分子メカニズムの解明と創薬探索の両側面から治療戦略に取り組んできた。滑脳症は、胎児期の神経細胞移動障害に起因した脳回・脳溝(いわゆる脳のしわ)の欠如、脳の層構造の形成異常を特徴とし、重度の精神発達遅滞、運動失調、てんかんを主な臨床症状とする。その発生頻度は、新生児1万5千人に1人の割合で、患者(児)のみならず家族の苦悩や負担は極めて大きくかつ永続的である。現状に於いて、類似疾患を含むこれらの疾患発症に至る分子メカニズムは解明されておらず、根本的な治療法も確立されていないことから、現代医学が解決すべき喫緊の課題のひとつである。

古典的(I型)滑脳症の約60%は染色体17番目にある *Lis1* 遺伝子のヘテロ変異に起因する。この *LIS1* は、細胞内に於いて微小管モーターの1つである細胞質ダイニンと直接結合して、その輸送活性を制御する。*LIS1* の機能不全が、中枢神経細胞内でのダイニンによる核移動、オルガネラ分布、タンパク質輸送の異常あるいは微小管ネットワーク形成の異常をもたらすことで、神経細胞遊走の欠如に繋がることを示唆される。しかしながら、*LIS1* がダイニンあるいはその輸送基質(Cargo)の輸送を制御する際の具体的な役割および詳細な分子機構は明らかではない。

これまでに私たちは、多くの滑脳症患者で、遺伝的変異がみられる *LIS1* の神経細胞内に於ける機能的役割を、微小管分子モーターを介した物質輸送制御の観点から明らかにした(Yamada et al., *Nat Commun*, 2014 & 2013; Yamada et al., *EMBO J*, 2010 & 2008; Mori & Yamada et al., *Nat Cell Biol*, 2009) [図1.①-③]。さらに、この *LIS1* がタンパク質分解酵素のカルパインによって分解されることを、細胞内物質輸送を手掛かりに独自の方法によって発見し、カルパイン阻害薬が滑

脳症(様)症状を改善させることを、その疾患モデルマウスを作製して、分子から個体に至る各レベルで明らかにした (Yamada et al., *Nat Med*, 2009; Toba et al., *Sci Rep*, 2013) [図1.④]。



[図1.] LIS1による細胞内物質輸送制御とカルパイン阻害薬による滑脳症治療薬の開発。

2. 研究の目的

私たちは、神経細胞移動障害症に分類される滑脳症の発症機構に至るメカニズムを分子レベルで解明する為に、その責任遺伝子産物 *LIS1* による微小管モーター (および微小管関連因子) の「細胞内物質輸送」の制御機構に着目した。これまでの研究成果より、*LIS1*-細胞質ダイニン、および(荷台となる)微小管フラグメント(tMT, transportable microtubule; 以下、tMTと省略する)が輸送複合体を形成してキネシンによって微小管上を順行性に運搬されることを明らかにした [図1. 参照]。そこで、本研究課題に於いては、このtMTが神経特異的なクラスIII β -チューブリンによって如何にして形成されるのかを明らかにすることを目的とした。さらに、滑脳症およびそれに類似した神経変性疾患に共通した分子基盤となり得る「細胞内輸送」の攪乱・破綻の改善・回復を指標にした創薬標的の探索を行い、汎用性の高い治療薬・診断薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) *LIS1*/細胞質ダイニン/tMT からなる順行性輸送複合体形成に関与する新規因子の同定。

これまでに私たちが同定した *LIS1*/細胞質ダイニン/tMT による順行性輸送複合体 [図1. 参照] の形成に関与する因子を新たに同定す

るために、以下のような方法を行った。まず、ラット下肢神経を結紮し（約 6 時間）、その抽出液を用いて tMT を特異的に認識する Tuj1 抗体（抗クラス III β -チューブリン抗体）で免疫沈降を行ない、共沈した因子を MS/MS 質量分析を用いて同定した。

(2) (1) の Tuj1 抗体による免疫沈降の結果、クラス III β -チューブリン抗体と共沈した因子の中でも特に α -シヌクレインに着目し、以下の実験を行った。幼若マウス由来の後根神経節細胞内に、LIS1、細胞質ダイニン中鎖 (DIC1; Cytoplasmic dynein intermediate chain 1)、クラス III β -チューブリン、 α -シヌクレインをそれぞれ mTurquoise (mTQ)、mNeonGreen (mNG)、mCherry の異なる 3 波長領域の蛍光タンパク質で標識した融合タンパクとして発現させた。この際、遺伝子導入は、ピペットチップ型電極によるエレクトロポレーション法 (Neon Transfection System, Thermo Fisher Scientific) にて行った。次に、同細胞を 4%PFA 固定後、超解像蛍光顕微鏡 (N-SIM, Nikon Instech Co.) を用いて、これらの輸送複合体構成因子の詳細な解析を行った。さらに、LIS1/細胞質ダイニン/tMT を含む順行性の輸送複合体の神経細胞内に於ける分子動態は、高速(切り替え)フィルターホイール (SPECTRA X light engine, lumencor) を要する蛍光顕微鏡システム (Ti-E, Nikon Instech Co.) を用いてライブセルイメージングにて観察した。

(3) *In vitro* 微小管重合/脱重合アッセイ

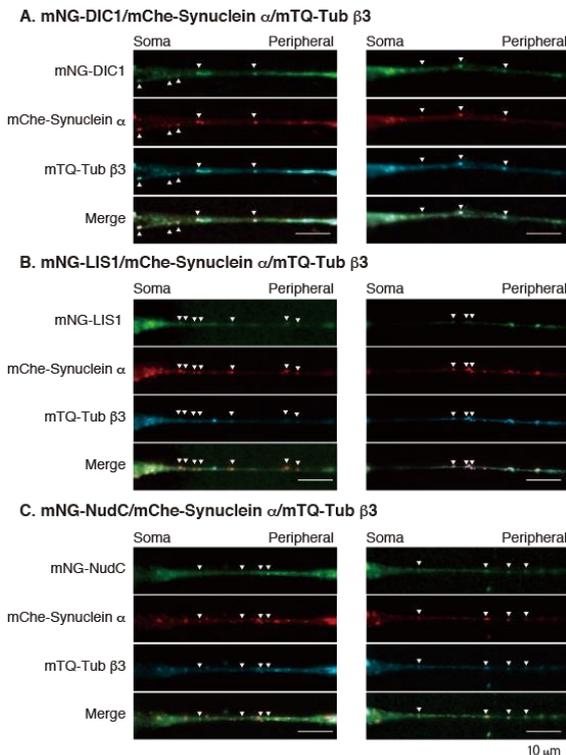
以前に私たちが報告した方法によって (Yamada et al., *EMBO J*, 2008 & 2010)、ブタ脳よりチューブリンを生化学的に精製し、テトラメチルローダミン (TMR) にて蛍光標識すると共に *in vitro* で重合させた。この際に、 α -シヌクレインおよびいくつかの変異型 α -シヌクレイン (α -Syn S129A, α -Syn

S129E, α -Syn A30P, α -Syn E46K) を反応系に添加して、微小管の重合/脱重合に及ぼす効果を高感度蛍光顕微鏡システム (IX71 inverted microscope, Olympus; EM-CCD C9100-13, Hamamatsu Photonics K.K.) を用いて観察した。

4. 研究成果

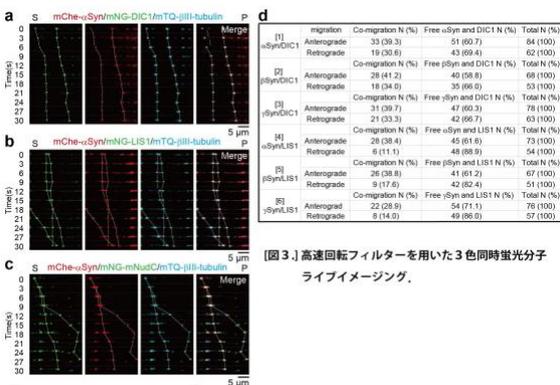
本研究は、滑脳症の責任遺伝子の一つである LIS1 の細胞内の於ける機能的役割を微小管上での物質輸送を指標に解析し、滑脳症の疾患発症に至るメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目指した。これまでに私たちは、LIS1、細胞質ダイニン、(荷台となる) 微小管フラグメント (tMT) を含む順行性輸送複合体を同定した。本研究に於いては、この順行性輸送複合体の形成過程に着目した。特に、いわゆる細胞骨格を形成するモータータンパク質のルールとなる微小管とは異なり、神経特異的クラス III β -チューブリンによって構成される (荷台となる) 微小管フラグメント (tMT) の形成過程を明らかにすることを試みた。まず、ラット下肢神経を結紮して、上記の順行性輸送複合体を濃縮して、Tuj1 抗体 (抗クラス III β -チューブリン抗体) を用いて免疫沈降を行い、MS/MS 質量分析法にていくつかの因子を同定することができた。中でも、パーキンソン病や (レビー小体型) 認知症の患者の神経細胞で見られる異常な円形状の構造物 (封入体) であるレビー小体 (Lewy body) の構成成分の一つとして知られる α -シヌクレインに着目し、以下、それが果たす機能的役割の解明を試みた。

そこで、今回私たちが同定したこの α -シヌクレインが、上記の LIS1-細胞質ダイニンを含む (順行性) 輸送複合体の構成因子であることを超解像蛍光顕微鏡像によって確認した [図 2.]。



【図2】超解像顕微鏡 (N-SIM) による後根神経節細胞の観察像。

次に、生細胞を用いたライブ観察によって、 α -シヌクレインは、LIS1 を含む輸送複合体の構成因子、つまり、細胞質ダイニン、tMT および mNUC (LIS1-細胞質ダイニン-tMT による順行性輸送複合体とキネシンとのアダプタータンパク質) と順行性輸送に於ける微小管上での挙動が一致していることが明らかになった[図3.]。



【図3】高速回転フィルターを用いた3色同時蛍光分子ライブイメージング。

また、*in vitro* 微小管重合/脱重合アッセイの結果、この α -シヌクレインは、tMT とほぼ同サイズの長さの微小管フラグメントの形成に関与していた。一方で、レビー小体(封入体)内の α -シヌクレインはリン酸化していることが知られているが、脱リン酸化型変異体 (α -Syn S129A)、リン酸化型変異体 (α -Syn S129E)、パーキンソン病患者に

て見られる変異体 (α -Syn A30P, α -Syn E46K) について同様に調べたところ、形成された重合微小管の長さは、tMT の微小管フラグメントよりも有意に長いものであり、輸送複合体を形成は難しいことが示唆された(データ省略、雑誌論文①参照)。

これらの実験結果より、私たちが同定した LIS1 を含む順行性輸送複合体と α -シヌクレインが細胞内での挙動を共にすること、 α -シヌクレインが tMT の重合/脱重合の制御に関与していること、 α -シヌクレインの細胞内輸送がレビー小体の形成に関与していることが示唆された。 α -シヌクレインの蓄積は、脳幹ではパーキンソン病、大脳皮質ではレビー小体型認知症などの神経変性疾患で見られる所見である。本研究に於いて、これまでに私たちが発見した微小管輸送複合体と α -シヌクレインとの関連が明らかになったことは、神経変性疾患の発症に至る共通の分子基盤としての細胞内物質輸送の重要性を大いに支持するものであり大きな意義がある。

今後は、 α -シヌクレインの神経細胞内での機能的役割を手掛かりに、滑脳症およびそれに類似した神経変性疾患に共通した分子基盤となり得る「細胞内輸送」の攪乱・破綻の改善・回復を指標にした創薬標的の探索を行い、汎用性の高い治療薬・診断薬の開発を目指す。

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)

① Shiori Toba, Mingyue Jin,

Masami Yamada, Kanako Kumamoto,

Sakiko Matsumoto, Takuo Yasunaga,

Yuko Fukunaga, Atsuo Miyazawa, Sakiko

Fujita, Kyoko Itoh, Shinji Fushiki,

Kojima Hiroaki, Hideki Wanibuchi,

Yoshiyuki Arai, Takeharu Nagai,

Shinji Hirotsune:

Alpha-synuclein binds unconventional

- microtubules that have a unique function.
Scientific Reports, 7, 査読有
doi:10.1038/s41590-017-15575-3(2017).
- ② 山田雅巳
先天性神経疾患に対する新しい治療戦略、ブレインサイエンス・レビュー-2017、査読無、2017、pp283-304.
- ③ 山田雅巳
神経細胞遊走障害を伴う遺伝性疾患に対する創薬探索、上原記念生命科学財団・研究報告集、査読無、Vol. 30(063)、2016、pp1-7.
- ④ 山田雅巳
神経細胞遊走障害を伴う先天性神経疾患に共通する細胞内物質輸送機構の解明、第一三共生命科学振興財団研究報告集・研究助成成果論文、査読無、Vol. 32、2016、pp232-246.
- ⑤ 山田雅巳、新井由之、永井健治
神経細胞内ロジスティクスと神経疾患発症メカニズムの関係、物質・デバイス領域共同研究拠点・平成 28 年度研究成果報告書、査読無、2016、p31 (20161191).
- ⑥ 山田雅巳
LIS1 の微小管モーター制御と滑脳症発症機構の解明、月刊「化学工業」、査読無、2015、Vol. 66, pp44-50.
- ⑦ 山田雅巳
LIS1 の微小管モーター制御と滑脳症発症機構の解明、物質・デバイス領域共同研究拠点・平成 27 年度研究成果報告書、査読無、2015、p26 (2014334).
- [学会発表] (計 11 件)
- ① Masami Yamada
Intracellular logistics of LIS1, cytoplasmic dynein, and unconventional microtubules.
2017 ASCB (American Society of Cell Biology) Annual Meeting
Philadelphia, PA, USA (Pennsylvania Convention Center, Philadelphia),
2017 年 12 月 07 日.
- ② Masami Yamada
Intracellular logistics of LIS1 and cytoplasmic dynein and lissencephaly.
2017 EMBO/EMBL Symposium (Seeing is Believing), Heidelberg, Germany
(EMBL; 欧州分子生物学研究所),
2017 年 10 月 06 日.
- ③ Masami Yamada
Intracellular logistics of LIS1 and cytoplasmic dynein in lissencephaly.
2016 ASCB (American Society of Cell Biology) Annual Meeting,
San Francisco, CA, USA (Moscone Center)、2016 年 12 月 06 日.
- ④ 山田雅巳
インビトロ神経細胞遊走活性を指標とした新規創薬探索、ライフサイエンスワールド 2016 第 13 回アカデミックフォーラム、東京ビッグサイト (東京江東区)、
2016 年 05 月 12 日.
- ⑤ 山田雅巳
LIS1 の微小管モーター制御と滑脳症発症機構の解明、第 89 回日本薬理学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)、
2016 年 03 月 11 日.

⑥ 山田雅巳
インビトロ神経細胞遊走活性を指標とした新規創薬探索、「メディカルジャパン2016」セミナー関西広域連合・研究成果発表会（招待講演）、インステックス大阪センタービル（大阪府大阪市）、2016年02月24日.

⑦ 山田雅巳
インビトロ神経細胞遊走活性を指標とした新規創薬探索、DSAN 疾患別商談会大阪産業創造館（大阪府大阪市）、2016年01月29日.

⑧ 山田雅巳
インビトロ神経細胞遊走活性を指標とした新規創薬探索、第35回バイオ技術シーズ公開会（招待講演）、大阪科学技術センター（大阪府大阪市）、2015年12月02日.

⑨ 山田雅巳
ARL3 および LC8 による細胞質ダイニン・ダイナクチン輸送複合体からの Cargo 荷下しの分子制御機構、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会年会合同大会、神戸国際展示場（兵庫県神戸市）、2015年12月01日.

⑩ 山田雅巳
インビトロ神経細胞遊走活性を指標とした新規創薬探索、イノベーション・ジャパン2015-大学見本市、東京ビッグサイト（東京都江東区）、2015年08月27日～2015年08月28日.

⑪ 山田雅巳
A regulatory mechanism of cargo unloading: ARL3 and LC8 coordinately induce dissociation of the dynein

-dynactin. 第67回日本細胞生物学会大会、タワーホール船堀（東京都江戸川区）、2015年07月02日.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：神経細胞遊走を伴う遺伝疾患治療薬のスクリーニング法

発明者：山田雅巳

権利者：大阪市立大学

種類：特許

番号：6128677（特許願2013-020620）

出願年月日：2013年01月19日

国内外の別：国内

〔その他〕

福井大学学術研究院医学系部門・医学科領域・生命情報医科学講座・分子生体情報学分野ホームページ

<https://www.seika2.med.lab.u-fukui.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 雅巳 (YAMADA, Masami)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号: 10322851