

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：24402

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24113007

研究課題名(和文)神経発生、ネットワーク形成に果たす中心体の役割の解明

研究課題名(英文)Explore of roles of the centrosome in neurogenesis

研究代表者

広常 真治(Hirotsune, Shinji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80337526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 67,200,000円

研究成果の概要(和文)：微小管とモータータンパク質である細胞質ダイニンが細胞分裂や神経細胞の移動に重要な役割を果たしている。研究機関中に細胞質ダイニンがカーゴと結合する際に低分子量Gタンパク質であるRab6が、またカーゴを遊離する際にLC8とArl3が必須であることを明らかにした。また細胞質ダイニンが微小管のプラス端に移動する際に非定型微小管と結合し、運搬されることを明らかにした。滑脳症・小脳症の原因遺伝子・カタニンP80は細胞質ダイニンとNuMAと協調的に働き、中心体に微小管を集積させる役割があり、この機能が神経幹細胞の分裂、神経細胞の移動に必須であることを解明した。

研究成果の概要(英文)：Microtubules, the main cytoskeletal components in eukaryotic cells, comprise globular α -tubulin dimers stacked head-to-tail to form protofilaments (pfs) that run lengthwise along the cell wall, thereby conferring structural polarity. Lis1 fixed the conformation of cytoplasmic dynein bound to a microtubule regardless of the nucleotide condition. This suggests that the NUDC (mNUDC) interacts with kinesin-1 and is required for the kinesin-1-idling state of cytoplasmic dynein on microtubules induced by Lis1 occurs through the Lis1-dependent arrest of dynein chemomechanical coupling. Mammalian mediated anterograde transport of a cytoplasmic dynein complex. Upon reaching the plus end of MTs, the small GTPase Rab6a releases LIS1 from the LIS1-dynein complex to allow the resumption of dynein motor activity. On the other hand, ADP-ribosylation factor-like 3 (Arl3) and the dynein light chain LC8 induce the dissociation of dynactin from cytoplasmic dynein to allow cargo unloading.

研究分野：分子生物学

キーワード：微小管 中心体 モータータンパク質 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

中心体は分裂期の微小管重合中心として、また、静止期にある細胞では繊毛基底小体として働くことが知られるが、近年、様々な生化学シグナルあるいは機械的シグナルの発生・伝達・整流に関与していることが明らかにされつつある。一方、中心体-繊毛構造は細胞内シグナルの流れや細胞の分化にも重要な役割を果たすことが示唆されている。例えば、神経幹細胞や生殖幹細胞の非対称な細胞分裂によって生じた娘細胞の運命が中心体の新旧と相関があり、さらに、最近、増殖細胞の間期に起こる一時的な繊毛形成が細胞周期と分化の制御に関与するという意外な事実も報告されている。また、細胞の変形・移動などの形態変化にも中心体-繊毛系が重要な役割を果たすことはよく知られていることである。態変化にも中心体-繊毛系が重要な役割を果たすことはよく知られていることである。たとえば、脳の形成過程における神経細胞の遊走や神経突起の伸展の際には、中心体における微小管ネットワークの制御が重要な役割を果たしている。また、その破綻は脳の形成不全や神経細胞ネットワークの形成・維持に障害をもたらす。本研究は、中心体-繊毛系という細胞の内外を貫くダイナミックな構築を生体情報の制御の場として捉え、細胞内外の情報フローの制御を体系的に理解することをめざす。

2. 研究の目的

中枢神経系脳では(特に大脳では)様々な機能を持った種々のニューロンが層構造を作って配列されることで高度なネットワーク/計算機能を発揮している。この層構造を作るのに際して、脳の最も内側に存在する神経幹細胞から「順々に」様々なニューロンが産まれては外側に移動することが重

要である。我々は神経細胞の遊走障害によって起こる中枢神経系の形成不全である滑脳症の研究に取り組んできた。中でも、LIS1はモータータンパク質である細胞質ダイニンの制御因子であり、細胞質ダイニンを微小管上に固定する機能がすることを明らかにした(Toba and Yamada et al. EMBO J. 2008)。本研究計画では中枢神経系の形成における中心体-繊毛系の果たす神経幹細胞の分裂と分化、さらには神経細胞の遊走と中枢神経系の構築のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

脳の形成過程における神経細胞の遊走や神経突起の伸展の際には、中心体における微小管ネットワークの制御が重要な役割を果たしている。一方、その破綻は脳の形成不全や神経細胞ネットワークの形成・維持に障害をもたらす。我々の研究から、中心体の構成タンパク質や微小管中心としての機能は、神経細胞の発生の過程でダイナミックに変化していることが分かってきた。本計画では(1)神経細胞における中心体構成の特殊性をプロテオーム解析することにより明らかにする。特に神経細胞の遊走異常の原因遺伝子と相互作用するタンパク質を明らかにし、原因遺伝子の変異に伴う神経細胞遊走のメカニズムを解明する。(2)中枢神経系の形成時の微小管ネットワークを制御するタンパク質を同定し、電子顕微鏡を用いた解析で微小管との相互作用、モータータンパク質との関連、細胞内物質輸送における役割を明らかにする。(3)中心体構成因子の中枢神経系形成における役割を明らかにするために候補遺伝子のノックアウトマウスを作成する。特に、神経細胞変性疾患に注目し、機能喪失に

伴う神経細胞変性をきたす遺伝子の探索を行う。

4. 研究成果

(1) プロテオーム解析では滑脳症-小脳症の原因遺伝子・カタニン P80 と相互作用するタンパク質として NuMA を同定した。さらにカタニン P80 は細胞質ダイニンを微小管上にアイドリング状態にする機能があり、NuMA とともに神経幹細胞分裂時や神経細胞遊走における微小管ネットワークの中心体への集積を制御する機能があることを証明した。さらに細胞質ダイニンが中心体周辺でカーゴを遊離させるメカニズムとして低分子量 G タンパク質の Arl3 と LC8 が強制的に働くことを明らかにした。

(2) 細胞質ダイニンは微小管のマイナス端に向かうモータータンパク質であるが、LIS1 は微小管-細胞質ダイニン-LIS1 の複合体を形成させ、細胞質ダイニンをアイドリング状態にする。この複合体がキネシンによって微小管のプラス端に運ばれることを証明した。さらにこの細胞質ダイニンの順行性の運搬に必要な微小管の形成にアルファシヌクレイン必須であることを突き止めた。特に、我々は in vitro 再構成実験からアルファシヌクレインが微小管の中でも従来の細胞骨格としての微小管とは異なりプロトフィラメント 14 の非定型微小管に選択的に結合することを発見した。(3) 中心体構成因子の中樞神経系形成における役割を明らかにするために脱リン酸化酵素・PP4 とキネシンがカーゴと結合する際のアダプタータンパク質として機能する NudC のコンディショナルノックアウトマウスを作成した。PP4 のノックアウトマウスは胚性致死であり、中心体からの微小管ネットワークが維持できず、微小管の断片化が見られた。また、NudC のノックアウ

トマウスも胚性致死であり、キネシン依存的な細胞内物質輸送が著しい障害を受けるため、成熟した固体でアデノ随伴ウイルス (AAV) でノックアウトマウスしても神経細胞の脱落が見られた。

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 11 件)

1. Jin M, Pomp O, Shinoda T, Toba S, Torisawa T, Furuta K, Oiwa K, Yasunaga T, Kitagawa D, Matsumura S, Miyata T, Tan TT, Reversade B, Hirotsune S (2017) Katanin p80, NuMA and cytoplasmic dynein cooperate to control microtubule dynamics. *Scientific reports* **7**: 39902 (査読有)
2. Inaba H, Goto H, Kasahara K, Kumamoto K, Yonemura S, Inoko A, Yamano S, Wanibuchi H, He D, Goshima N, Kiyono T, Hirotsune S, Inagaki M (2016) Ndel1 suppresses ciliogenesis in proliferating cells by regulating the trichoplein-Aurora A pathway. *The Journal of cell biology* **212**: 409-423 (査読有)
3. Saito A, Taniguchi Y, Kim SH, Selvakumar B, Perez G, Ballinger MD, Zhu X, Sabra J, Jallow M, Yan P, Ito K, Rajendran S, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A, Snyder SH, Sawa A, Kamiya A (2016) Developmental Alcohol Exposure Impairs Activity-Dependent S-Nitrosylation of NDEL1 for Neuronal Maturation. *Cerebral cortex* **26**: 1-12 (査読有)
4. Okamoto M, Iguchi T, Hattori T, Matsuzaki S, Koyama Y, Taniguchi M, Komada M, Xie MJ, Yagi H, Shimizu S,

Konishi Y, Omi M, Yoshimi T, Tachibana T, Fujieda S, Katayama T, Ito A, Hirotsune S, Tohyama M, Sato M (2015) DBZ regulates cortical cell positioning and neurite development by sustaining the anterograde transport of Lis1 and DISC1 through control of Ndel1 dual-phosphorylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **35**: 2942-2958 (査読有)

5. Toba S, Koyasako K, Yasunaga T, Hirotsune S (2015) Lis1 restricts the conformational changes in cytoplasmic dynein on microtubules. *Microscopy* **64**: 419-427 (査読有)

6. Jin M, Yamada M, Arai Y, Nagai T, Hirotsune S (2014) Arl3 and LC8 regulate dissociation of dynactin from dynein. *Nature communications* **5**: 5295 (査読有)

7. Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, Kataoka Y, Azuma M, Hayasaka K, Amamoto M, Tominaga K, Wynshaw-Boris A, Wanibuchi H, Oka Y, Sato M, Kato M, Hirotsune S (2013) Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Scientific reports* **3**: 1224 (査読有)

8. Xie Y, Juschke C, Esk C, Hirotsune S, Knoblich JA (2013) The phosphatase PP4c controls spindle orientation to maintain proliferative symmetric divisions in the developing neocortex. *Neuron* **79**: 254-265 (査読有)

9. Yamada M, Kumamoto K, Mikuni S, Arai Y, Kinjo M, Nagai T, Tsukasaki Y, Watanabe TM, Fukui M, Jin M, Toba S,

Hirotsune S (2013) Rab6a releases LIS1 from a dynein idling complex and activates dynein for retrograde movement. *Nature communications* **4**: 2033 (査読有)

10. Yan J, Chao DL, Toba S, Koyasako K, Yasunaga T, Hirotsune S, Shen K (2013) Kinesin-1 regulates dendrite microtubule polarity in *Caenorhabditis elegans*. *eLife* **2**: e00133 (査読有)

11. Sebe JY, Bershteyn M, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A, Baraban SC (2013) ALLN rescues an in vitro excitatory synaptic transmission deficit in Lis1 mutant mice. *Journal of neurophysiology* **109**: 429-436 (査読有)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：滑脳症治療剤

発明者：広常 真治

権利者：大阪市立大学

種類：特許

番号：15/074142

出願年月日：2016/3/18

国内外の別：国外 (米国)

名称：抹消神経障害の治療及び / 又は予防用組成物

発明者：広常 真治

権利者：大阪市立大学、千寿製薬株式会社

種類：特許

番号：特願 2016-102878

出願年月日：2016/5/23

国内外の別：国内

取得状況（計4件）

名称：滑脳症治療剤

発明者：広常 真治

権利者：大阪市立大学

種類：特許

番号：6016638

取得年月日：2016/10/7

国内外の別：国内

名称：滑脳症治療剤

発明者：広常 真治

権利者：大阪市立大学

種類：特許

番号：'201180064328.4

取得年月日：2015/9/30

国内外の別：国外（中国）

名称：滑脳症治療剤

発明者：広常 真治

権利者：大阪市立大学

種類：特許

番号：9371359

取得年月日：2016/6/21

国内外の別：国外（米国）

名称：滑脳症治療剤

発明者：広常 真治

権利者：大阪市立大学

種類：特許

番号：9539298

取得年月日：2017/1/10

国内外の別：国外（米国）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 広常 真治

(HIROTSUNE SHINJI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80337526