

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06746

研究課題名(和文) Reelinシグナルを伝えるDab1の翻訳後修飾による神経細胞移動制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the neuronal migration regulation mechanism by post-translational modification of Dab1

研究代表者

本田 岳夫 (Honda, Takao)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：30365225

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)：Dab1は脳新皮質神経細胞の移動や樹状突起形成に必須の役割を持つ細胞内タンパク質である。これまで、Dab1のチロシン残基の翻訳後修飾がReelinシグナルに必須の役割を持つことが示されてきたが、それ以外のアミノ酸残基の役割についてはほとんど検討されてこなかった。研究代表者らはDab1の一次配列中に、種間で高度に保存された翻訳後修飾を受ける可能性のあるアミノ酸配列を見出し、Dab1の機能制御の可能性を検討した。その結果、神経細胞移動を制御する可能性のある翻訳後修飾部位を新たに同定した。

研究成果の概要(英文)：Dab1 is an intracellular protein that has an essential role in neuronal migration of cerebral cortical neurons and formation of their dendrites. So far, it has been shown that posttranslational modification of tyrosine residues of Dab1 has essential roles in Reelin signaling pathway, however it remains unknown whether other amino acid residues which might be post-translationally modified are involved in Reelin-Dab1 signaling pathway. We found that some amino acids sequences are highly conserved among different species in the primary sequence of Dab1, and thus hypothesized that those sequences might be post-translationally modified. Thus, we examined the possibility of functional control of Dab1 by those amino acids. As a result, we found that the putative posttranslational modification sites are required for the correct neuronal migration.

研究分野：神経発生学

キーワード：Dab1 Reelin 翻訳後修飾 reeler yotari

1. 研究開始当初の背景

発生期の脳新皮質において脳室帯で誕生した神経細胞は、脳表面に向かって移動し、辺縁帯直下で移動を終了させ、樹状突起を発達させた後、皮質と呼ばれる層構造を作る。これまで、辺縁帯にある Cajal-Retzius 細胞から分泌される Reelin が、神経細胞の細胞内の Dab1 のチロシンをリン酸化し、神経細胞の移動や配置に大変重要な役割を果たしている事が、変異マウス (それぞれ *reeler* と *yotari*) の解析等から明らかにされてきた。Reelin-Dab1 シグナルがどのような分子に伝達され、どのように神経細胞の配置を制御し大脳新皮質層形成に関与しているか、つまり Reelin シグナルのアウトプットが何であるのかは永らく明確な答えは得られていなかった。Dab1 のチロシンリン酸化が Reelin シグナルの伝達に必須であることから、リン酸化 Dab1 に結合する分子を手がかりに、下流分子の探索が行なわれ、我々のグループも含め、N-cadherin (Franco et al., Neuron 2011, Jossin et al., Nat. Neuro. 2011) と Integrin 5 1 が、Reelin シグナルに依存した神経細胞の移動過程に必要であることが示された。

研究代表者は、Dab1 の下流のアウトプット分子として同定された分子群が、Reelin シグナルによって制御される神経細胞移動に十分かを調べる為、*dab1* の flox マウスに Cre 発現ベクターをエレクトロポレーション法により子宮内の胎仔脳に導入し、*dab1* をコンディショナルにノックアウトし、さらに野生型 N-cadherin (Reelin により細胞表面に分布する量が増加) や Integrin 1 の活性化型変異体 (Reelin により活性化) も同時に導入した。しかしながら、神経細胞の移動障害を回復させることは出来なかった。さらに、Dab1 のチロシンリン酸化により活性化される様々な細胞内分子 (Rap1, PI3K, Akt) の活性化型変異体を様々な組み合わせで発現させた場合にも移動障害の回復は起らなかった。これらの実験結果は Dab1 のチロシンリン酸化を介する経路のみでは Reelin シグナルの伝達に十分ではない可能性を強く示唆し、Dab1 のチロシンリン酸化以外のシグナル伝達経路が Reelin シグナルの伝達に必要という仮説が、可能性の一つとして考えられるようになった。

2. 研究の目的

タンパク質はチロシンのリン酸化以外に、セリン・スレオニンのリン酸化、ユビキチン化、Sumo 化、アセチル化、メチル化等、様々な翻訳後修飾を受けることにより、その機能調節を受けている。そこで、Reelin シグナルを伝達する候補として、翻訳後修飾を受ける可能性のあるアミノ酸残基を検索し、6カ所

の候補部位を見出した。大変興味深いことに候補部位の内、2つのアミノ酸配列周辺が、Dab1 とは異なる種類の細胞内アダプタータンパク質の部分的なアミノ酸配列と非常に高い相同性を示し、進化的に遠縁のグループにも関わらず、翻訳後修飾候補部位の位置が完全に保存されていた。そこで本研究では、Reelin シグナルの伝達に必須な、Dab1 の他の翻訳後修飾候補部位についてその必要性や役割を検討し、Reelin-Dab1 シグナルによる神経細胞の移動制御機構の全体像の解明を目指す。

3. 研究の方法

研究代表者は、*yotari* マウス (*dab1* 変異マウス) の胎仔脳に Dab1 発現ベクターをエレクトロポレーション法で導入した場合、神経細胞が脳の表層まで移動出来ることを明らかにした。Dab1 非存在下では神経細胞は決して脳の表層まで移動出来ないことから、この実験系は、Dab1 の神経細胞移動における機能評価を明確に行う事が出来る非常に有用な系である。そこでこの実験系を用いて、Dab1 が翻訳後修飾を受けると推定されるアミノ酸の、神経細胞移動に関わる役割を明らかにする。

4. 研究成果

異なるタンパク質間で高度に保存された翻訳後修飾候補部位 2カ所 (それぞれ、candidate amino acid 1, 2: *caa1*, *caa2*) について、その両方をアラニンに変異させた、2A 変異体を作成し、胎生 14 日目の *yotari* マウスに発現させ、胎生 18 日目に観察した。その結果 2A 変異体を発現させた神経細胞は、脳表層まで移動出来ていなかった。また *caa1* をアラニンに変異させた変異体を発現する神経細胞は脳表層まで移動していたが、*caa2* をアラニンに変異させた変異体を発現する神経細胞は移動障害が観察された為、*caa2* が移動に重要な役割を持っていることが示唆された。さらに、*caa2* の翻訳後修飾が神経細胞の移動調節に関与しているか検討する為、翻訳後修飾された状態を模倣するような類似構造を持つ様に変異させ、*yotari* マウスに導入した。その結果、この変異体は神経細胞移動を野生型と同様に回復させた。現時点では *caa2* の生体内での翻訳後修飾の有無や、Reelin シグナルとの関連性は不明である。しかしながら、*reeler* と *yotari* がほとんど同じ神経細胞の配置異常を示すことを考え合わせると、*yotari* マウスにおける神経細胞移動を回復出来ないという実験結果は、*caa2* の翻訳後修飾が、Reelin シグナルにとって重要な役割を担っている可能性を強く示唆していると考えられる。

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2件)

1, Takao Honda, Kazunori Nakajima, Proper level of cytosolic Disabled-1, which is regulated by dual nuclear translocation pathways, is important for cortical neuronal migration, Cerebral Cortex, 査読有り, 26(7), 2016, 3219-36, DOI: 10.1093/cercor/bhv162

2, Shigeaki Kanatani, Takao Honda, Michihiko Aramaki, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, Mami Ishida, Daisuke H. Tanaka, Takeshi Kawauchi, Katsutoshi Sekine, Sayaka Kusuzawa, Takahiko Kawasaki, Tatsumi Hirata, Hidenori Tabata, Per Uhlen, Kazunori Nakajima. The COUP-TFII/Neuropilin-2 is a molecular switch steering diencephalon-derived GABAergic neurons in the developing mouse brain, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 査読有り, 112(36), 2015, E4985-94, DOI: 10.1073/pnas.1420701112

[学会発表](計14件)

1, 本田岳夫、仲嶋一範、Dab1 haploinsufficiency causes invasion of superficial cortical neurons into layer I and splitting of CA1 pyramidal cell layer、第123回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018年

2、本田岳夫、仲嶋一範、dab1のハプロ不全是表層神経細胞の大脳皮質第一層への侵入とCA1錐体細胞層の分離を引き起こす(Haploinsufficiency of dab1 causes invasion of superficial-layer neurons into the cortical layer I and splitting of the CA1 pyramidal cell layer)、2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会)、2017年

3, 本田岳夫、仲嶋一範、Dab1 haploinsufficiency causes reduction of layer I thickness and splitting of CA1 pyramidal cell layer、第60回日本神経学会大会、2017年

4, 本田岳夫、仲嶋一範、Dab1 haploinsufficiency causes superficial shift of later-born cortical neuron positioning and splitting of the CA1 pyramidal cell layer (Dab1のハプロ不全是

大脳新皮質遅生まれニューロンの脳表層側配置と海馬CA1錐体細胞層の分離を引き起こす)、第40回日本神経科学大会、2017年

5, Kimiko Deguchi, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Kazunori Nakajima, and Ken Inoue, Reelin coupled with myelin may play a role in long term maintenance of myelin (リーリンは、ミエリンの長期維持の役割を果たしている)、第58回日本小児神経学会学術集会、2016年

6, Kimiko Deguchi, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Kazunori Nakajima, and Ken Inoue, Reelin coupled with myelin may play a role in long-term maintenance of myelin、21st Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN2016)、2016年

7, Takao Honda and Kazunori Nakajima, Analysis of the role of Dab1 nucleo-cytoplasmic transport for migration of excitatory neurons (Dab1の核細胞質間輸送が興奮性神経細胞の移動に果たす役割の解明)、第9回神経発生討論会・難治疾患共同研究拠点共同開催学術集会、2016年

8, Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori, C-terminal region of Reelin is required for development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its functions are regulated by specific proteolysis、新学術領域研究「神経細胞の多様性と大脳新皮質の構築」第3回国際シンポジウム「Neocortical Organization 3」、2016年

9, 本田岳夫、仲嶋一範、Dab1核細胞質間シヤトリングの大脳新皮質層形成における役割の解明、日本解剖学会関東支部第103回学術集会、2015年

10、本田岳夫、仲嶋一範、二つの核移行経路による細胞質Dab1量の適切な調節が興奮性神経細胞移動に重要である、第50回慶應ニューロサイエンス研究会、2015年

11, Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori, Importance of Reelin C-terminal region in the development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its regulation by specific proteolysis、

Society for Neuroscience, Neuroscience
2015 meeting, 2015 年

1 2 , 本田岳夫、仲嶋一範、二つの核移行経路による細胞質 Dab1 量の適切な調節が脳皮質ニューロンの移動に重要である (Proper level of cytosolic Disabled-1, which is regulated by dual nuclear translocation pathways, is important for cortical neuronal migration)、第 38 回日本神経科学大会、神戸国際会議場・神戸国際展示場、2015 年

1 3 , 河野孝夫、本田岳夫、久保健一郎、中野良美、土屋綾香、村上達郎、阪野英 幸、仲嶋一範、服部光治、巨大分泌蛋白質リーリンの C 末端領域を介した脳皮質形成機構、第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会、2015 年

1 4 , Mai Yamakawa, Daisuke Ito, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Mariko Noda, and Kazunori Nakajima, and Norihiro Suzuki、Evidence of a link between TDP-43 and dipeptide repeat protein in c9FTD/ALS、第 56 回日本神経学会学術大会、2015 年

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本田 岳夫 (HONDA, Takao)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師
研究者番号 : 30365225

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者