

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07083

研究課題名(和文) 樹状突起内の中心体機能の検証 微小管重合核形成とマイナス端アンカー

研究課題名(英文) Analysis on the centrosomal functions of neural dendrites - microtubule nucleation and minus-end anchoring

研究代表者

林 謙介 (HAYASHI, Kensuke)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：50218567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞のアンテナである樹状突起が成長して張り巡らされるためには微小管が数を増さなくてはならない。神経細胞の中心体は微小管形成の能力を失っており、どこで微小管が作られるのかが不明であった。本研究では、神経細胞では微小管が細胞質で核形成されることを明らかにした。さらに、神経細胞の細胞質の微小管形成を活性化するタンパク質として、CDK5RAP2の神経特異的選択的スプライスアイソフォームを発見した。このアイソフォームを発現させた細胞では細胞質で微小管形成が誘導された。これらの結果は、CDK5RAP2の選択的スプライシングが、発達中の神経細胞における微小管の増加に関与していることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の発達に必要な、神経細胞の樹状突起の成長をコントロールする新しい仕組みが明らかになった。この仕組みを応用して、脳の機能発達に介入するあたらしい技術の開発への道を開いた。

研究成果の概要(英文)：Microtubules must increase in number for dendrite growth. The centrosome of a neuron lacks the ability to form microtubules, and it has been unclear where microtubules are produced in neurons. In this study, we showed that microtubules are nucleated in the cytoplasm in neurons. Furthermore, we found a neuron-specific alternative splicing isoform of CDK5RAP2, as a protein that activates microtubule formation in the cytoplasm of neurons. In cells expressing this isoform, microtubule formation was induced in the cytoplasm. These results indicate that selective splicing of CDK5RAP2 is involved in the increase of microtubules in developing neurons.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脳の発達 神経細胞 樹状突起 微小管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微小管は通常中心体を起点にして放射状に形成され、プラス端を細胞の外側に向けた配向をとっている。一方、ニューロンの樹状突起では微小管は中心体に結合しておらず、プラス端を外側に向けたものとマイナス端を外側に向けたものが混在している。このように中心体から遊離した微小管がどのようにつくられるのかはあまり分かっていない。以前は中心体で微小管が形成されたのち、切り離されて樹状突起へ運ばれると考えられていた。しかし、近年、中心体を除去してもニューロンの微小管の組織化に影響がないことや、ニューロンでは中心体が微小管形成能を失っていることが明らかになった。樹状突起の微小管が数を増やす仕組みとしては、カタニンやスパスチンといった微小管切断酵素が微小管を切断する方法が考えられている。しかし、切断された微小管はもとの微小管と同じ配向をとるため、樹状突起における微小管のランダムな配向を説明することが出来ない。そこで、我々はニューロンでは樹状突起内で微小管形成が起きるのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、ニューロンにおいて中心体以外の場所で微小管形成が起きる可能性を検証し、また、その分子機構を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞内での微小管形成を可視化するため、培養細胞に微小管重合阻害剤であるノコダゾルを作用させて細胞内の既存の微小管を破壊したのちに、ノコダゾルを除いて新たに形成される微小管を顕微鏡で観察した。

(2) CDK5RAP2 のスプライシング、および発現量はリアルタイム PCR によって測定した。

4. 研究成果

(1) マウス胎児の脳から採取したニューロンでは、再形成された微小管は細胞質全体で観察された(図1)。その先端に γ -tubulin と MZT2 が結合していたことにより、それらが γ -TuRC を起点としていることが確認された。また、再形成微小管とゴルジ体の分布は一致しなかったため、ニューロンでは中心体やゴルジ体以外の場所で微小管重合核形成が起こることが分かった。このことは、樹状突起の微小管がランダムな極性を持っていることをよく説明する。次に培養日数による微小管形成能の変化を調べた。培養 3, 5, 7 日目にかけて、再形成を起さず細胞の割合は減少した。すなわち微小管形成能はニューロンの成熟過程で低下することが分かった。

(2) 細胞質における微小管形成がリン酸化によって制御される可能性を検討するため、各種リン酸化酵素阻害剤の微小管再形成に対する影響を調べた。培養ニューロ

ンにおいて K-252a, staurosporine, H-7 を作用させた後に再形成実験を行ったところ、微小管再形

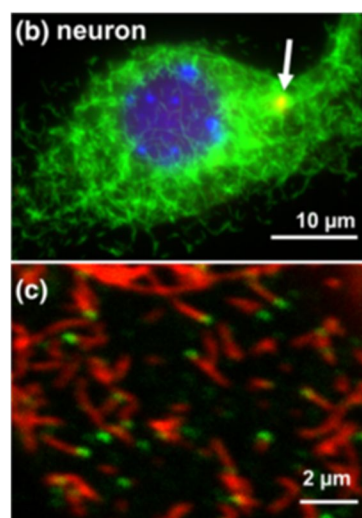


図1. 上、ニューロンの細胞質で再形成された微小管(緑)。下、再形成された微小管(赤)の一端に γ -TuRC(緑)が結合していた

成は減弱した。そこで、微小管形成に対する BDNF の効果を調べると、BDNF の濃度と処理時間依存的に微小管再形成が増強した。樹状突起の形成が BDNF によって制御を受けることは良く知られている。今回の結果は、その制御が γ -TuRC の活性化による微小管形成を介している可能性を示唆する。

(3) 細胞質の γ -TuRC が何によって活性化されるのかを調べるため、各種の γ -TuRC 活性化タンパク質について調べた。 γ -TuRC 活性化タンパク質の一つである CDK5RAP2 に神経細胞特異的なスプライシングバリエントが存在することを発見したので、このバリエントの発現と機能について調べた。エキソン 17 をスキップした mRNA ($\Delta e17$ タイプ) が

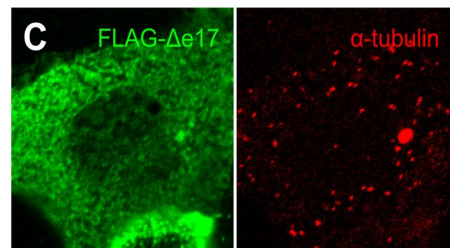


図2 . 左、培養細胞に発現させた CDK5RAP2 アイソフォーム (緑)、右、その細胞の細胞質で再形成された微小管 (赤)。

マウスの脳と精巣に特異的に検出された。リアルタイム RT-PCR によって定量的に調べると、通常タイプの CDK5RAP2 の発現は脳の発達に伴って急激に低下するのに対し、 $\Delta e17$ タイプは胎生期にはほとんどなく、樹状突起形成時期である出生前後に急激に上昇していた。初代培養ニューロンにおいて $\Delta e17$ タイプが発現する時期は、細胞質における微小管形成が観察される時期に一致していた。このエキソンスキップはフレームシフトを起こし、 γ -TuRC 活性化部位は持つが中心体結合ドメインを欠くタンパク質を発現すると考えられる。実際、マウス脳及び精巣から、ほぼ予想どおりの分子量のタンパク質が検出された。 $\Delta e17$ タイプの機能を調べるために HEK293T 細胞に発現させて局在を観察すると、通常タイプの CDK5RAP2 は中心体に強く局在したが、 $\Delta e17$ タイプは中心体に弱く局在すると同時に細胞質に局在した。微小管再形成実験を行うと、本来は微小管形成の起こらない細胞質に多数の再形成微小管が観察された。従って、 $\Delta e17$ タイプ CDK5RAP2 が細胞質の γ -TuRC を活性化することが示唆された。 $\Delta e17$ タイプ発現 HEK293T 細胞の微小管を免疫染色して蛍光強度を測定したところ、蛍光強度がコントロールに比べて上昇していた。細胞質からの微小管形成によって細胞が持つ微小管の総量が増加したものと考えられる。同様にアセチル化 tubulin を免疫染色し蛍光強度を測定したところ、アセチル化微小管は減少していることがわかった。 $\Delta e17$ タイプ CDK5RAP2 の発現によって新しい微小管の形成が増加したことを示唆している。さらに、Neuro2A 細胞の突起伸長に対する $\Delta e17$ タイプの影響を調べた。 $\Delta e17$ タイプを発現させた後にレチノイン酸で分化誘導すると、伸長する突起長がコントロールに比べて短くなった。これは、細胞質での微小管形成が活発であるために、突起先端における tubulin 重合が非活発になったためと考えられる。本研究から、ニューロンでは選択的スプライシングにより細胞質局在性の CDK5RAP2 バリエントが発現し、細胞質中の γ -TuRC を活性化していると考えられる。細胞質での微小管形成は、細胞全体の微小管に大きな変化をもたらし、樹状突起の成長に関与していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyata Kaho, Hayashi Kensuke	4. 巻 -
2. 論文標題 The difference in the cytoskeletal machinery of growth cones of growing axons and leading processes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000522200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ide Koyo, Muko Mika, Hayashi Kensuke	4. 巻 156
2. 論文標題 The Golgi apparatus is the main microtubule-organizing center in differentiating skeletal muscle cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 273 ~ 281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-021-01999-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Yumiko, Otake Ayana, Ueno Satoshi, Hayashi Kensuke, Ishii Hirosuke, Miyoshi Nao, Kuroiwa Kenta, Tachikawa Masashi, Fujimaki Yuki, Nishiyama Kotaro, Manabe Kei, Yamazaki Ryuta, Asai Akira	4. 巻 11
2. 論文標題 Discovery of a Potent Anticancer Agent PVHD303 with in Vivo Activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1287 ~ 1291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmchemlett.0c00119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Mimori, Hayashi Kensuke	4. 巻 76
2. 論文標題 Microtubule nucleation in the cytoplasm of developing cortical neurons and its regulation by brain derived neurotrophic factor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytoskeleton	6. 最初と最後の頁 339 ~ 345
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cm.21550	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hatakeyama Eiko, Hayashi Kensuke	4. 巻 507
2. 論文標題 KATNAL1 is a more active and stable isoform of katanin, and is expressed dominantly in neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 389 ~ 394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kojima Wataru, Hayashi Kensuke	4. 巻 149
2. 論文標題 Changes in the axo-glia junctions of the optic nerves of cuprizone-treated mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 529 ~ 536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-018-1654-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Suzuki S. and Hayashi K.
2. 発表標題 Difference between two katanin isoforms in the neuronal expression and ubiquitination
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakayama M. and Hayashi K.
2. 発表標題 Interaction between cytosolic dynein and neuronal cytosolic isoform of microtubule anchoring protein, ninein.
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 朱里 林 謙介
2. 発表標題 ニューロンの細胞質からの微小管形成と微小管形成タンパクCDK5RAP2のエキソンスキップ
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田夏帆 林謙介
2. 発表標題 軸索突起の伸長と先導突起の移動におけるフィロポディアおよびラメリポディアの役割
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Moeka Hara and Kensuke Hayashi
2. 発表標題 Changes of microtubule arrangement induced by neuron-specific ninein isoform
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koyo Ide, Kensuke Hayashi
2. 発表標題 Changes in the microtubule organizing center during differentiation of muscle cells
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M. Yamada , K. Hayashi
2. 発表標題 Microtubule nucleation in the cytoplasm of developing neurons
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 E. Hatakeyama and K. Hayashi
2. 発表標題 Characterization of microtubule severing enzyme, katanin A-like1, highly expressed in neurons
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井出晃陽、林謙介
2. 発表標題 筋細胞の分化過程におけるゴルジ体からの微小管形成
3. 学会等名 日本動物学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田美森、林謙介
2. 発表標題 ニューロンの細胞質で微小管を形成するgamma-TuRC
3. 学会等名 日本動物学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畠山瑛子、林謙介
2. 発表標題 神経の発生における微小管切断酵素katanin A-like1の役割
3. 学会等名 日本動物学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原 萌夏、林 謙介
2. 発表標題 ニューロン特異的nineinアイソフォームの発現と機能
3. 学会等名 日本動物学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村朱里、林 謙介
2. 発表標題 神経細胞の微小管形成とCDK5RAP2スプライシングバリエント
3. 学会等名 日本動物学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮田夏帆、林 謙介
2. 発表標題 移動性ニューロンの先導突起形成におけるdrebrinの働き
3. 学会等名 日本動物学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------