

令和元年6月12日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15603

研究課題名(和文) 微小管モータータンパク質制御因子NudCの神経系における機能解析

研究課題名(英文) Analysis of microtubule motor protein-regulatory protein NudC in nervous system

研究代表者

松本 早紀子 (Matsumoto, Sakiko)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00789654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、微小管モータータンパク質制御因子NudCの中枢神経系における役割をNudCコンディショナルノックアウト(CKO)マウスを用いて明らかにすることを目的とした。NudC CKOマウスとtau-Creマウスを交配し、得られた胎生期ニューロン特異的NudC欠損マウス胎児の大脳皮質組織を解析したところ、増殖・分化した神経前駆細胞の放射状遊走距離が短くなり大脳皮質が薄くなることが明らかになった。細胞質ダイニンが皮質層構造形成の重要な因子であることから、中枢神経の発生においてもNudCが正常な微小管モータータンパク質の機能を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NudCが属するNudファミリーでは、NudAが細胞質ダイニンに、NudFがLIS1に対応している。LIS1は細胞質ダイニンの制御因子であり、大脳皮質神経細胞の遊走障害によって起こる滑脳症の原因遺伝子でもある。これまでNudCの機能についてはあまり注目されてこなかったが、本研究によってNudCも大脳皮質の発生に重要な因子であることがはじめて明らかとなった。この成果が、滑脳症をはじめとする皮質層構造形成異常の機構解明の足がかりとなり、神経変性疾患のメカニズム解明に資する可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：NudC was recently identified to regulate the distribution of motor protein on microtubules in neuron. This research was performed to clarify the function of NudC in developing central nervous system by using NudC conditional knockout (CKO) mice. We crossed NudC CKO mice with tau-cre transgenic mice to generate developing neuron-specific NudC deficient-mice (KO mice) and observed cerebral cortex morphology and layered structure of NudC KO embryos. We found that NudC-deficiency affected the distance of radial migration of neural progenitor cells but not proliferation and differentiation in embryonic cerebral cortex, which resulted in thinner cortical plate in NudC KO mice compared to wild type mice. Since cytoplasmic dynein, microtubule motor protein, is associated with neural progenitor migration in developing cortex, we suggest that NudC also controls the correct functions of motor protein in cortex development as well as axonal transport.

研究分野：神経科学

キーワード：神経発生 微小管モータータンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

微小管モータータンパク質は、細胞内タンパク質の局在、オルガネラや細胞内小胞の輸送、さらには細胞分裂や細胞の移動などに重要な役割を果たし、その機能制御は極めて厳密に行なわれることが必要である。近年当研究室では、細胞質ダイニンが transportable microtubule (tMT)/LIS1/細胞質ダイニン複合体を形成して微小管上を順行性に輸送され、そこに NudC がアダプタータンパク質として機能していることを明らかにしてきた。Nud ファミリーは、アスペルギルスの細胞核移動の変異体から発見され、NudA が細胞質ダイニンに、NudF が LIS1 に対応している。LIS1 と細胞質ダイニンは発生期脳の神経細胞の遊走に不可欠なタンパク質であり、LIS1 は大脳皮質層構造形成異常を起こす滑脳症の原因遺伝子である。このことから NudC も神経細胞の発生・機能維持に深く関わっている可能性が考えられるが、これまで NudC の機能は大きく謎に包まれたままであった。そこで本研究では、発生期から成熟期の中枢神経系における NudC の機能を新たに探索する。

## 2. 研究の目的

中枢神経系において NudC が関わる新たな現象を探索するため、我々は独自に NudC コンディショナルノックアウト(CKO)マウスを作製した。このマウスを用いて、本研究課題では「胎生期の神経細胞遊走と脳形成」、および「成熟神経細胞の機能維持」に焦点を当て、中枢神経系において NudC がどのような役割を果たしているか、細胞生物学的・組織学的手法を用いて明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1)胎生期の神経細胞遊走と脳形成における NudC の役割の解明

作製した NudC CKO マウスと、発生期ニューロン特異的 tau プロモーター制御下で Cre を過剰発現するトランスジェニックマウスを交配して、神経細胞特異的に NudC を欠損させた。マウスの交配を進めるにつれ、Cre 遺伝子を持った NudC CKO マウスが胎生 17 日以降から生後すぐの間に死亡することが判明した。そこで、本研究では胎生後期の胎児における脳形成過程の表現型について、神経幹細胞の増殖・分化、大脳皮質の層構造形成、細胞死等に注目し、免疫組織化学を用いて解析した。

### (2)成熟神経細胞の軸索輸送と機能維持における NudC の役割の解明

#### ① 後根神経節(DRG)ニューロン一次培養を用いた軸索輸送の評価

NudC がキネシンおよび細胞質ダイニン共通の制御因子であることから、NudC は細胞内輸送の制御にも重要な役割を担うことが予想される。そこで NudC CKO マウスから単離した後根神経節ニューロンに、Cre 遺伝子を強制発現するレンチウイルスを感染させて NudC 欠損一次培養ニューロンを作製し、蛍光標識したモータータンパク質の細胞内輸送をライブセルイメージングによって撮影・解析した。

#### ② 生体内における成熟神経細胞の生存・変性の評価

生後 1 週の NudC CKO マウスの脳室内に Cre タンパク質発現用のアデノ随伴ウイルス(AAV)を注入して NudC 遺伝子を欠損させ、時系列を追って神経細胞の細胞死や組織形態および神経変性の有無を組織学的に評価した。

## 4. 研究成果

### (1)研究の主な成果

NudC の中枢神経発生における機能を明らかにするため、発生期ニューロン特異的 NudC 欠損マウスを作製し、胎児の形態学的な解析を行った。その結果、NudC 欠損マウスでは野生型マウスと比較して、脳室の拡大と大脳皮質全体の厚みの低下が認められた。また大脳皮質に関しては、皮質層構造そのものは維持しているものの主に皮質板(CP)と中間層(IZ)が薄くなる傾向が形態学的に明らかとなった(図 a)。そこで、神経前駆細胞の増殖・分化マーカーを用いて免疫染色を行ったところ、胎生 14 日の胎児脳では皮質板の将来 V・VI 層を形成する細胞層の厚みが野生型と比較して低下し、これらの細胞数も少なかった(図 b)。一方で、脳室帯(VZ)および脳室下帯(SVZ)に局在する増殖中もしくは増殖直後の細胞群は、細胞数および層の厚みに変化はなかった(図 c)。さらにこのような NudC 欠損マウスに認められる表現型は、胎生 14 日以降に顕著であるが、層構造自体は正常に形成され、胎生 16 日頃には将来 II-IV 層となる細胞層も形成された。一方、胎生 13 日以前では異常がほぼ認められなかった。これらの結果から、NudC は、増殖・分化した神経前駆細胞が Basal 側へ放射状に移動する時の速度や距離の制御因子の一つとして機能している可能性が示唆された。神経細胞遊走時の核移動(nuclear translocation)は微小管上のダイニンと LIS1 の動態によって制御されていることがわかっているため、NudC がこの機構と深く関連している可能性が極めて高い。

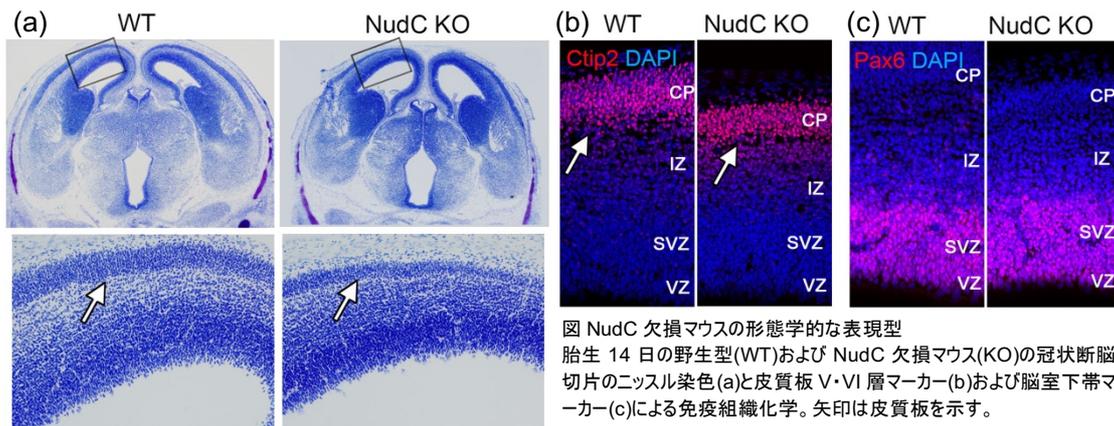


図 NudC 欠損マウスの形態学的な表現型  
胎生 14 日の野生型(WT)および NudC 欠損マウス(KO)の冠状断脳切片のニッスル染色(a)と皮質板 V・VI 層マーカー(b)および脳室下帯マーカー(c)による免疫組織化学。矢印は皮質板を示す。

次に、NudC CKO マウスから調整した DRG ニューロン一次培養を *in vitro* で NudC を欠損させ軸索輸送を観察した。その結果、NudC 欠損 DRG ニューロンではキネシンの順行性輸送およびダイニンの逆行性輸送速度が低下し、この現象は NudC の強制発現でレスキューされた。このことから、NudC がキネシン・ダイニンの制御を介してニューロンの軸索輸送システムを調節することが明らかとなった。そこで次に、NudC を欠損させた成熟ニューロンを *in vivo* で組織学的に解析するために、AAV を用いて生後の NudC CKO マウスをニューロン特異的にノックアウト後 20-30 週のマウス脳を観察した。その結果、野生型と比べて脳室の拡大は認められたものの、目立った神経変性や細胞死は認められなかった。

以上の研究結果から、NudC は神経細胞遊走および軸索輸送において微小管モータータンパク質のはたらきを正常に維持するための重要な制御因子であることが示唆された。

### (2)得られた成果の国内外における位置付けとインパクト、および今後の展望

本研究成果は、マウス脳における NudC の機能を *in vivo* ではじめて証明したという点でこれまでの NudC 研究に新たな知見をもたらすものである。これまであまり注目されなかった NudC が、本研究成果によって、滑脳症をはじめとする皮質層構造形成異常機構解明の足がかりの一つになっていくことが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Toba S, Jin M, Yamada M, Kumamoto K, **Matsumoto S**, Yasunaga T, Fukunaga Y, Miyazawa A, Fujita S, Itoh K, Fushiki S, Kojima H, Wanibuchi H, Arai Y, Nagai T, Hirotsune S. Alpha-synuclein facilitates to form short unconventional microtubules that have a unique function in the axonal transport. (2017) *Sci Rep.* 27;7(1):16386. DOI: 10.1038/s41598-017-15575-3. 査読有
2. Aoi Kaneko, Sumiko Kiryu-Seo, **Sakiko Matsumoto**, Hiroshi Kiyama. Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) enhances axonal regeneration potential of retinal ganglion cells after optic nerve injury. (2017) *Cell Death Dis.* 1;8(6):e2847. DOI: 10.1038/cddis.2017.212. 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 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

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 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。