

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18680901

研究課題名（和文） 大脳新皮質の神経前駆細胞におけるG蛋白質シグナリングの役割

研究課題名（英文） Role for G-protein signaling in neural progenitor cells in the developing neocortex

研究代表者

眞田 佳門（SANADA YOSHIKADO）

大阪大学・医学系研究科・独立准教授

研究者番号：50431896

研究成果の概要：

近年の精力的な基礎研究により、中枢神経系の疾患が神経細胞の誕生過程や神経細胞の移動過程の異常と結びついていることが明らかになってきた。神経細胞は神経前駆細胞から生み出されるが、本研究では、この過程にG蛋白質共役受容体を介したシグナリングが重要な役割を担うということを明らかにした。また、新生した神経細胞は最終目的地へと移動するが、この過程にLKB1と呼ばれる蛋白質リン酸化酵素を介した微小管の制御が大きく寄与することを見出した。このような新たな知見は、「脳がいかんして創られるのか」という疑問に対する理解を大きく前進させた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,200,000	0	5,200,000
2007年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
年度			
年度			
総計	17,900,000	3,810,000	21,710,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：三量体G蛋白質、神経前駆細胞、神経細胞移動

## 1. 研究開始当初の背景

大脳新皮質の発生期において、神経細胞は神経前駆細胞から生み出される。私共は従来、マウス大脳新皮質の神経新生の過程に三量体G蛋白質が重要な役割を果たすこと、またAGS3と呼ばれる分子が三量体G蛋白質の活性化を担う候補分子であることを見出していた。発生期の脳新皮質における神経発生や神経分化に三量体G蛋白質を介したシグナリングが重要であるという知見は極めてユニークであった。このことから、G蛋白質シグ

ナリングを制御する分子の役割解析は、神経新生や神経分化に関与する未知の情報伝達機序の発見につながる重要なトピックであると考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) 三量体G蛋白質を活性化する分子としては、7回膜貫通型のG蛋白質共役受容体がよく知られる。しかし、神経前駆細胞におけるG蛋白質共役受容体の分子実体および役割はほとんど知られていない。本研究では、リガ

ンド未知のG蛋白質共役受容体（オーファンG蛋白質共役受容体）に焦点を絞り、神経前駆細胞に発現する受容体の探索およびその役割を解析する。このような解析により、神経前駆細胞の維持や運命決定に関与する新しい情報伝達機構に迫る。

(2) AGS3はリン酸化されて活性が調節されることが知られており、このリン酸化を担う分子としてLKB1と呼ばれるセリン・スレオニンキナーゼが同定されている。そこで、このLKB1に着目して、神経前駆細胞での役割を調べる。さらに、LKB1は成熟中の神経細胞にも発現する。しかしながら、神経細胞の移動や成熟における役割は謎に包まれている。そこで、神経細胞の成熟過程におけるLKB1の機能について解析する。

### 3. 研究の方法

発生期のマウス大脳新皮質における様々な分子の役割を調べるため、神経前駆細胞にshRNAを発現するプラスミドを電気細胞法によりin vivo導入する。さらに、遺伝子導入された神経前駆細胞および神経細胞の性状を発生期の様々な時期に解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 神経新生におけるG蛋白質共役受容体の役割

神経前駆細胞に発現するオーファンG蛋白質共役受容体を探索するため、マウス胎児の大脳新皮質由来のcDNAを用いたPCRおよびマウス胎児の脳切片を用いたin situハイブリダイゼーションを実施した。その結果、神経前駆細胞に特異的に発現するオーファンG蛋白質共役受容体を発見した。この分子の発生期前脳における発現パターンを詳細に解析した結果、神経発生の初期（胎生期10日目）から終期（胎生期15日目）において、神経前駆細胞が局在する脳室帯に強い発現が確認できた。生体内での役割を調べるため、この分子に対するshRNAを作製した。胎生期13日目のマウス大脳新皮質にこのshRNAをインピボ導入してノックダウンした結果、Ngn2およびTbr2を発現する前駆細胞が顕著に減少していた（胎生期15日目に観察）。これら分子は、前駆細胞が神経細胞へと分化する際に発現する分子である。このことから、このG蛋白質共役受容体を介したシグナリングが神経前駆細胞から神経細胞が誕生する際に、重要な役割を果たしていることが判明した。

さらに、これらノックダウン細胞の運命を様々な発生時期において精査した。胎生期14日目の神経前駆細胞においてノックダウンして、18日目に解析したところ、control細胞の大部分は神経細胞に分化しているのに対して、ノックダウン細胞では神経細胞がほとんど観察できなかった。同様の現象は、ノ

ックダウン細胞を培養した場合でも認められた。さらに、出生4日目で調べたところ、約半数のノックダウン細胞がMusashi1（アストロサイト前駆細胞のマーカー）を発現しており、さらに出生14日目で調べると、多くの細胞がS100およびGFAP（いずれもアストロサイトのマーカー分子）を発現するようになった。以上の解析から、神経前駆細胞において、G蛋白質共役受容体を介したシグナリングが神経細胞への分化に重要な役割を果たしていること、さらに、アストロサイトへの分化を抑制している可能性が考えられた。

本研究成果は、神経前駆細胞の運命決定にG蛋白質共役受容体に関与するという、極めて重要かつ新規性の高い現象を見出したものである。現在、神経系の疾患や損傷に対する治療法として神経移植治療が注目されている。本研究で得られた知見は、神経幹細胞を神経細胞へと人為的に分化させる際にG蛋白質共役受容体のリガンドが使用できる可能性を示唆するものであり、新たな治療戦略の確立に寄与する可能性がある。

#### (2) 神経発生および分化におけるLKB1の役割解析

LKB1は様々な細胞腫において極性形成に重要な役割を果たすSer/Thrキナーゼである。発生期のマウス脳におけるLKB1の発現を調べた結果、神経前駆細胞が存在する脳室帯、移動中の細胞が局在する中間帯、および成熟中の神経細胞が存在する皮質板に*Lkb1*遺伝子の発現が認められた。そこで、LKB1に対するshRNA発現ベクターを構築し、神経前駆細胞においてLKB1をノックダウンした。その結果、神経前駆細胞の細胞周期が遅延した。このことから、神経前駆細胞においてLKB1は細胞周期の調節に寄与していることが推察できた。

一方、神経前駆細胞から誕生した神経細胞の分布を調べたところ、コントロール細胞の多くは脳表層側に移動するのに対して、ノックダウン細胞の多くは中間体に蓄積していた。このことから、LKB1は神経細胞移動に必要な不可欠であることが明らかになった。移動中の神経細胞は、移動方向に短い先導突起を持ち、その根元に中心体が局在する。移動する際は、先導突起が進行方向に伸長すると共に中心体が前方に移動し、その後、核が中心体の方向に移動することが知られている

（図1）。従来の研究から、この中心体と核との協調動作が神経細胞の移動に重要であることが知られていた。驚いたことに、LKB1が発現抑制された神経細胞では、中心体の配置および核移動が異常を呈していることが判明した。このことから、LKB1は核と中心体との共役を制御することによって、適切な神経細胞移動を達成していると推察できた。

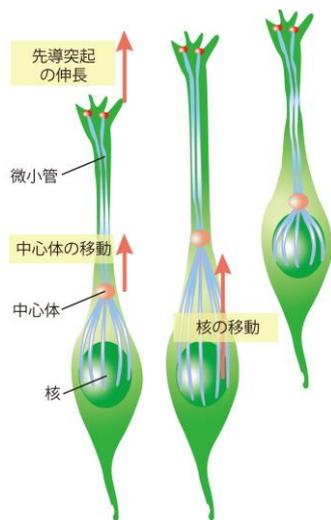


図1 神経細胞の移動に伴うイベント

次に、*in vivo*において神経細胞の成熟におけるLKB1の役割を解析した。成熟段階にある神経細胞は皮質板に位置し、脳膜側に太い樹状突起を伸ばすと同時に、脳室側に細く長い軸索を伸ばす。興味深いことに、LKB1に対するshRNAを導入した場合、多くの細胞が逆転した配向を呈し、脳室側に樹状突起を形成していた。さらに、中心体の位置を精査すると、逆転した配向を持つ神経細胞では、核に対して通常とは反対の位置に中心体が配置していた。これらの結果から、LKB1は、中心体を適切な位置に配置することによって、樹状突起・軸索の形成方向を制御していることが示唆された。

以上の解析からLKB1は、中心体の局在やダイナミクスを空間的に制御することによって、神経細胞の移動および成熟に寄与すると考えられた。本研究は、LKB1が神経細胞の極性確立に必要であることを明らかにしたのと同時に、神経発生において中心体の位置制御が重要であることを示している。これらの知見は、神経系の構築メカニズムを理解するうえで極めて重要であると考えられた(Asada et al., *J. Neurosci.* 2007)。

さらに私共は、移動中の神経細胞におけるLKB1の下流シグナリングを探索した。その結果、LKB1はGSK3 $\beta$ のSer9のリン酸化を担い、GSK3 $\beta$ の不活性化に寄与することを見出した。興味深いことに、Ser9リン酸化型のGSK3 $\beta$ は先導突起の先端に濃縮して存在し、このリン酸化を抑制すると中心体の移動が顕著に停滞した。このことから、LKB1はGSK3 $\beta$ の不活性化を介して、中心体の移動および神経細胞の移動に貢献していることが示唆された。また、GSK3 $\beta$ の標的分子を精査したところ、GSK3 $\beta$ のSer9リン酸化の阻害に伴って、(1)APCが微小管のプラス端に結合できなくなること、さらに(2)先導突起内の微小管が不安定化することを見出した。APCは微小管のプラス端と結合して、微小管の膜

アンカーおよび安定化に寄与することが知られていることから、先導突起において、(1)GSK3 $\beta$ がLKB1によってリン酸化されて不活性化し、(2)その結果としてAPCが微小管プラス端に結合でき、(3)さらにAPCを介して微小管が膜にアンカーして安定化する、というモデルが得られた。さらに、これら一連の過程が中心体の移動に必須であることから、微小管が膜にアンカーすることによって進行方向に引っ張られていることが推察できた(図2参照)。

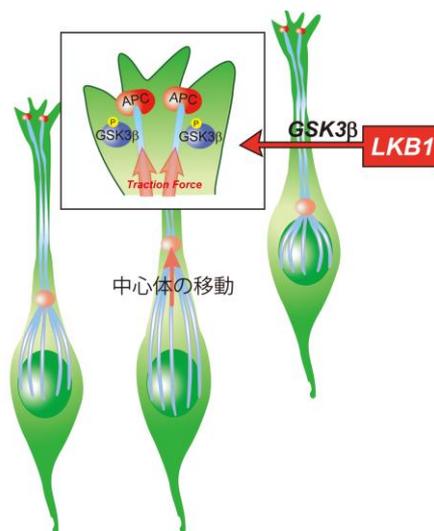


図2 LKB1シグナリングの役割のモデル

本研究により、神経細胞の移動に関与する新規分子を発見すると共に、これまで未知であった中心体の移動メカニズムに深く切り込むことができた。神経変性疾患には、神経細胞の移動が異常を呈するものがあり、神経細胞移動の動作基盤に関する知見は、それら疾患の発症機構を考える上で極めて重要であると考えられる。

最後に、私共はカルガリー大学のNyguan博士との共同研究により、p60と呼ばれる分子の神経細胞における役割を解析した。神経細胞においてp60は微小管および小胞体と結合しており、微小管依存的な小胞体の輸送に関与していることを見出した。培養した神経細胞において小胞体は神経突起に集積しているが、p60のノックダウンに伴って小胞体の神経突起内への集積が減弱し、さらに軸索の短縮・変性が引き起こされた。p60は移動中の神経細胞にも発現していることから、神経細胞移動におけるp60の役割を精査した。移動中の神経細胞では、小胞体为先導突起に集積しているが、p60のノックダウンに伴って小胞体が核周辺に配置するようになり、これと同時に先導突起がジグザグの形態を呈した。また、神経細胞の移動が顕著に停滞することを見出した。これらのことから、神経細胞においてp60は、小胞体の適切な配置

に参与しており、この小胞体の配置が神経細胞の形態維持および移動に重要な役割を果たしていることが示唆できた (Shim et al., J. Neurosci 2008)。

#### 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5件)

1. Tamai S., Sanada K., & Fukada Y.\* (2008) Time-of-day-dependent enhancement of adult neurogenesis in the hippocampus. **PLoS ONE** 3, e3835. **\*corresponding authors.** 査読有
2. Shim S. Y., Wang J., Asada N., Neumayer G., Tran H. C., Ishiguro K., Sanada K., Nakatani Y., & Nguyen M. D. (2008) Protein P600 is a microtubule/endoplasmic reticulum-associated protein in CNS neurons. **J. Neurosci.** 28, 3604-3614. 査読有
3. 眞田佳門 (2008). 神経前駆細胞の増殖と分化のコントロール～細胞分裂軸の制御と非対称分裂～ 脳2 1 Vol.11, No.4 105-110. 査読無
4. Asada N., Sanada K., & Fukada Y.\* (2007) LKB1 regulates neuronal migration and neuronal differentiation in the developing neocortex through centrosomal positioning. **J. Neurosci.** 27, 11769-11775. **\*corresponding authors.** 査読有
5. Xie Z, Moy L. Y., Sanada K., Zhou Y., Buchman J. J., & Tsai L. H. (2007) Cep120 and TACCs control interkinetic nuclear migration and the neural progenitor pool. **Neuron** 4, 79-93. 査読有

[学会発表] (計5件)

1. 眞田佳門  
成体脳の海馬におけるニューロン新生の日内変動、頭部形成研究会 2008、阿蘇、2008年4月15日
2. 眞田佳門  
大脳新皮質における神経細胞の移動および分化におけるLKB1の役割、日本発生生物学会 秋季シンポジウム、岡崎、2007年11月6日
3. 浅田直行、眞田佳門、深田吉孝  
大脳新皮質の発生過程でLKB1は神経細胞移動と分化を制御する、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大

- 会 合同大会、横浜、2007年12月11日
4. 玉井総一、眞田佳門、深田吉孝  
海馬の神経新生部位における神経幹細胞の分裂の日内制御、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、横浜、2007年12月11日
5. Sanada K. : Control of Neuronal Progenitor Differentiation by Heterotrimeric G-proteins in the Developing Neocortex. The 5<sup>th</sup> Catholic International Stem Cell Symposium: Cutting Edges & Workshop, Seoul, South Korea, July. 13, 2007

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/neuro/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞田 佳門 (SANADA YOSHIKADO)

大阪大学・医学系研究科・独立准教授

研究者番号：50431896

(2) 研究分担者

該当なし。

(3) 連携研究者

該当なし。