

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06543

研究課題名(和文) Reelinによるゴルジ体構造制御が脳神経系の動的恒常性維持に果たす役割

研究課題名(英文) Roles of Golgi apparatus dynamics regulated by Reelin signaling in neuronal homeostasis

研究代表者

松木 亨 (Matsuki, Tohru)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・細胞病態研究部・主任研究員

研究者番号：90332329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳形成時においてStk25をノックダウン(KD)やコンディショナルノックアウト(cKO)すると神経細胞移動障害が生じるが、cKOマウスでも最終的に皮質構造は正常であることから、神経細胞移動の回復には代償機構が働いている事が予想された。本研究からMST3は大脳皮質形成においてSTK25の役割を代償する事が明らかとなった。加えて、STK25はARHGEF6,7との相互作用を介してRac1の活性化すると同時にCul3-Bacurd1複合体との相互作用を介したRhoAの積極的分解を行う事で、正常な神経細胞移動を制御し、大脳皮質形成に重要な役割を果たしている事が分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質形成時においてRho-GTPaseファミリーが重要な役割を果たしている事はこれまでに明らかにされていたが、STK25がRac1とRhoAの機能調節両方に関与する事を初めて示す事が出来た。また、今回の研究成果ではgenetic compensationについても言及しており、その代償機構の一端を明らかにする事が出来た。本成果は、genetic compensationが働いていると考えられる他の分子を研究上で重要な視点を与えるとともに、大脳皮質形成機構の解明を前進させる事に貢献できたと確信している。

研究成果の概要(英文)：During cortical lamination, neuronal migration is precisely regulated and critical for functional brain development. Here we resolve the conundrum that although the acute disruption of Stk25 causes a defect in neuronal migration, constitutive Stk25-null mice have no histological aberrations. MST3, a member of the GCKIII subgroup of the Ste20-like kinase family, compensates for STK25 by playing similar roles in several biological functions. In vivo, MST3 overexpression in Stk25-knockout neurons rescued neuronal migration and axonogenesis. Mechanistically, we find that STK25 acts through the Cul3/Bacurd1 complex to activate Rac1 and degrade of RhoA, through in vivo rescue experiments. Collectively, our findings demonstrate that STK25 and MST3 have redundant roles to regulate Rho GTPases and provide a detailed link between STK25 and regulation of the actin cytoskeleton.

研究分野：神経解剖学

キーワード：STK25 Rac1 RhoA 神経細胞移動 大脳皮質形成 genetic compensation

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体の中で最も複雑な構造と機能を担う脳は、シナプス連絡による神経細胞間の複雑なネットワークを基盤とした情報伝達機構によって認知・学習・情動といった高次脳機能の実現を可能としている。このような神経細胞間の情報伝達は、一般的には神経細胞の形態的特長である一本の軸索と多数の樹状突起が基盤となっている。そのため、正常な脳構造の構築に加え、軸索や樹状突起の正常な発達が阻害されることは、しばしば発達障害や統合失調症などの神経疾患の発症要因となる。軸索形成や樹状突起形成は、神経細胞移動による大脳皮質構築時になされる事は多くの先行研究からも明らかであるにもかかわらず、その分子機構の全貌は完全には明らかになっていない。しかし近年、神経細胞における極性制御機構が、軸索や樹状突起形成に重要な役割を担っている事が次第に明らかとなってきた(Barnes AP, et al., Cell. 2007, Shelly M, et al., Cell. 2007, Matsuki T, et al., Cell. 2010)。また、皮質層における樹状突起形成直後の神経細胞では、樹状突起内部へのゴルジ体伸長が観察されており(Horton AC, et al., Neuron. 2005, Matsuki T, et al., Cell. 2010)、ゴルジ体伸長が樹状突起伸長に重要な役割を果たしている事が示唆されていた。加えて申請者が研究を進めてきた STK25 と同じファミリー分子に属する MST3 が Rho-GTPase の一つである RhoA の機能制御を通して大脳皮質構築時の神経細胞移動を制御している事が報告された(Tang et al., J Neurosci. 2014)。

上に示したように、申請者は神経細胞の位置決定や樹状突起伸長を制御している Reelin シグナルとその修飾因子である、STK25 (Serine/Threonine Kinase 25)に着目し、脳神経系における生理的役割を *in vitro* および *in vivo* について解析してきた(Matsuki T, et al., J Cell Sci. 2008, Cell. 2010, PLoS One. 2012)。その結果、Reelin シグナルの活性化により、ゴルジ体の樹状突起内への伸長と樹状突起の伸長が誘導されることが明らかとなっている。このような経緯から、申請者は Reelin シグナルの新たな役割としてのゴルジ体ダイナミクス制御が、樹状突起伸長機構と直接結びついているだけでなく、STK25 シグナルと共に細胞骨格制御や極性輸送制御を通して神経細胞移動から樹状突起形成、さらにはシナプス可塑性時に見られるスパイン形成に重要な役割を担っているとの仮説を立ててきた。この仮説や上記に示した同分野の知見から、発定期におけるマウス脳において Reelin シグナルによるゴルジ体の伸長促進が神経細胞の正常な発達に重要な役割を果たしているのに加えて、ゴルジ体伸長において Reelin シグナルと拮抗的に機能する STK25 が大脳皮質構築時の神経細胞移動に非常に重要な役割を果たしているとの仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が世界に先駆けて明らかにした、Reelin シグナルによるゴルジ体ダイナミクス制御とその生理的意義の解明にある。しかしながらその詳細な分子機構は殆ど明らかになっていない。また、生体内では Reelin シグナルによるゴルジ体伸長と樹状突起伸長が生じている場所は一致しており、両者には強い相関が見られるが、ゴルジ体伸長と樹状突起伸長の関係についても詳細は不明のままである。加えて、ゴルジ体ダイナミクス制御と神経細胞移動制御による大脳皮質形成機構との関連性もまた解明すべき点が多い。そのため、本研究では、Reelin シグナルと STK25 シグナルがゴルジ体ダイナミクスを中心として、大脳皮質形成にどのような役割を果たしているのかを明らかにするとともに、最終的には神経機能におけるこれらのシグナルの役割を明らかにする事を目指す。

3. 研究の方法

- 1) これまでの研究からゴルジ体構造制御に STK25 が関与しており、加えて *Stk25* ノックダウンやコンディショナルノックアウト(cKO)神経細胞では、胎生期の脳皮質において神経細胞移動が阻害される事を見出し、報告していた(Matsuki et al., Neural Dev. 2013)。多くの先行研究が脳皮質層構造の異常と知的障害などの発達障害の関連性を占めていることから、STK25 についてもまず、脳皮質構築時における役割を明らかにする事を目指した。しかし、*Stk25* の null mutant では cKO マウスが示すような脳皮質構築異常は認められないため、未知の代償機構あるいは代償機能をもつ分子の存在が想定された。この未知分子の同定をはじめに行う必要性が生じたが、上記の先行研究(Tang et al., J Neurosci. 2014)が示す様に STK25 が属する Ste20-like kinase family の GCKIII subgroup の kinase が候補分子として考えられた。GCKIII subgroup には MST3, MST4 が STK25 のほかに属しているが、これらはタンパク質の構造だけでなくアミノ酸配列の相同性が非常に高いため、これらが STK25 の機能を代償する可能性を明らかにするため、免疫組織化学染色、STK25 との結合分子との相互作用を生化学的解析によって確認する。
- 2) 以前に作成した STK25 抗体はウエスタンブロットにおいて非常に高い特異性を示したが、細胞染色では抗原賦活化が必要な事が分かっていた。そのため、STK25、MST3、MST4 の組織内における発現分布を明らかにするには、パラフィン切片を用いる免疫組織化学染色が最適であるため、胎生 15-18 日目のマウス胎仔を用いて行う事にする。
- 3) MST3、MST4 に関して STK25 の結合分子との相互作用については、エピトープタグを付加したものを HEK293FT 細胞に発現させ、免疫沈降法を用いた生化学的解析によって確認する。特に、先行研究で報告された Rho-GTPase との相互作用に関しては優先的に確認を行う。
- 4) MST3 あるいは MST4、または両方が STK25 の脳皮質形成における役割を代償するかどうかを確認するために、*Stk25* floxed allele を用いた in utero electroporation で確認を行う。この場合、homozygote に Cre, *Mst3*, あるいは *Mst4* の発現プラスミドを同時に導入する事で神経細胞移動障害がレスキューされるかどうかを検証する。また、逆側の検証には *Mst3* あるいは *Mst4* の発現を抑制する shRNA プラスミドと *Stk25* 発現プラスミドを同時に導入する事で行う。
- 5) STK25 は神経細胞移動のみならず、神経極性制御を通し軸索形成、伸長に関与する。この際、STK25 は LKB1-STRAD シグナル経路の下流で GM130 と複合体を形成して機能している事が分かっている。そこで、MST3 や MST4 についても LKB1 シグナル経路の上で機能しているかを W4 細胞株を用いて検証する。この W4 細胞株は、LKB1 を恒常的に発現し、Doxycycline により STRAD の発現を制御できる。加えて Dox 処理により LKB1-STRAD シグナル経路が活性化されると W4 細胞膜の一部に F-actin から構成される brush border が形成されるため、細胞極性制御の有無を視覚的に確認できる。また、神経極性制御による軸索形成に対する役割を明らかにするために、hippocampal neuron culture を用いた軸索形成についても確認する。In vivo における軸索形成の役割については、前項で示した in utero electroporation で得られた胎仔脳の免疫染色像の解析を行う。
- 6) 成体におけるゴルジ体構造制御と脳機能の役割を明らかにするため、ゴルジ体構造制御、特に胎生期から出生後の脳皮質や海馬の錐体細胞で見られるゴルジ体伸長に関与すると考えられる、PKC の flox マウス、GM130 のリン酸化不全マウスを用い、主に免疫組織化学染

色と行動実験を行い明らかにする。

4. 研究成果

- 1) 胎生 15 日目のマウス胎仔のパラフィン切片を用いた免疫組織化学染色から、STK25 と MST3 は中枢および末梢神経系に強く発現している事が確認できた。一方で、MST4 は一部の末梢神経節に発現が認められたものの、大脳、脳幹、小脳、延髄、脊髄の中枢神経系には発現が認められなかった。STK25 と MST3 の発現パターンは非常に似ていることから、STK25 の機能を代償する候補分子として MST3 が最も高いと考えられた。
- 2) *Stk25* cKO neuron に MST3 を発現させると WT では神経細胞移動の改善が見られたが、kinase inactive mutant では改善されなかった。神経細胞移動には MST3 のキナーゼ活性が必要であるとの先行研究の報告とも整合性が取れていた。一方で *Mst3* shRNA による移動障害を示す神経細胞に STK25 を発現させた場合では、キナーゼ活性非依存的に移動障害の回復が見られた。この事実は、STK25 と MST3 と非常に似た分子であるが、完全には一致していない事を示している。
- 3) *In vitro* における神経極性制御を軸索形成を指標に解析したところ、我々が以前に報告したように、*Stk25* KD 神経細胞では約 50% で軸索形成不全を示していた。*Mst3* KD の場合も同様に約 50% で軸索形成不全を示していた。これらの神経細胞に代償分子を発現させた場合には神経細胞移動とは異なり、STK25、MST3 とともにキナーゼ活性は必要ない事が示された。これらの事実は、神経細胞移動と神経極性制御では GCKIII 分子が形成する複合体のコンポーネントも異なっている可能性があり、そのことがキナーゼ活性非依存的な回復を示したと考えられる。*In vivo* における軸索形成についても調べたが、*in vitro* と同様に GCKIII 分子は軸索形成においてキナーゼ活性非依存的な代償関係にあることが分かった。
- 4) 一方で、STK25 と同様に MST3 が LKB1-STRAD シグナルの下流で細胞極性制御に関係しているかを調べた結果、神経細胞における軸索形成と同様に LKB1-STRAD シグナルの下流でキナーゼ活性非依存的に brush border 形成に関与することが明らかとなった。
- 5) STK25 と MST3 が関与する代償機構において、タンパク質の発現量の変化を伴うのかどうかを mRNA の発現量とともに調べた結果、これらの代償機構においては mRNA の転写は関係しておらず、タンパク質の翻訳、あるいは安定性の上昇が関与することで片方の分子が減少した場合にはもう一方のタンパク質量が増加する事が明らかとなった。加えて、このタンパク質量の増加による代償機構は、大脳皮質の全層で起こるのではなく、intermediate zone から cortical plate へ入った後に起きていることが分かった。すなわち、cortical plate へのエントリーには一定量の GCKIII 分子が必要である事が推測された。
- 6) 次に、先行研究の報告にもあった Rho-GTPase との相互作用を確認したところ、単純な co-expression assay の場合、先行研究の結果とは異なり STK25、MST3 とともに *Rac1*、*Cdc42* との相互作用は確認できたが *RhoA* との相互作用は確認出来なかった。加えて、GCKIII 分子と *RhoA* を共発現した場合には、*RhoA* の発現が認められなくなった。このため、最も強い相互作用を示した *Rac1* との複合体形成がさらに下流のシグナルを正に動かし、アクチン骨格制御に働いた結果神経細胞移動を制御しているとの仮説に至った。実際、*Stk25* cKO 神経細胞に *Rac1* の常活性型変異体(V12)を導入した場合には神経細胞移動が改善されたが、ドミナントネガティブ変異体(N17)では移動障害は改善されなかった。そこで、皮質内を移動中の *Rac1* の活性化状態をモニターするために FRET assay を行ったところ、野生型では *Rac1* の活性上昇が

見られたのに対し、*Stk25* cKO 細胞では Rac1 の活性上昇は認められなかった。このことは、急激に STK25 の発現量が低下した場合、神経細胞移動に必要な Rac1 を介した細胞内アクチン骨格制御機構が働かなくなり、移動障害が生じると考えられる。

- 7) 他方で、GCKIII 分子と RhoA 分子を共発現させると RhoA 分子の発現が認められなくなる、という疑問を明らかにするため、GCKIII プラスミド量をスライドさせた場合の RhoA の発現量を解析した。その結果、GCKIII の発現量と RhoA の発現量には逆相関が認められた。このことは、GCKIII 分子が RhoA の安定性に関与している事を示唆した。そこで、タンパク質の安定性に関与する、Proteasome 経路と Lysosome 経路による分解系の可能性を検証した。Proteasome inhibitor である MG-132 と Lysosomal inhibitor である Chloroquine 存在下で共発現実験を行ったところ、STK25 との共発現では両阻害剤で RhoA の発現が回復したのに対し、MST3 との共発現では Chloroquine 処理のみ RhoA の発現回復に効果が見られた。これらの結果は GCKIII 分子が Proteasome 経路と Lysosome 経路を使い、RhoA の量を適切に調節している事を示している。RhoA は神経細胞移動に重要であるが発現量が多いと移動障害を示す事もわかっている。そのため、GCKIII による RhoA のクリアランスが重要な役割を担うとともに、アクチン骨格制御をドライブさせる事で神経細胞移動を正常に進めている事が分かった。
- 8) 神経細胞移動において STK25 が Rac1, RhoA の活性制御に重要な役割を担っている事が明らかになったが、Rho-GTPase の活性化には Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF)が関与している事から、Rac1 GEF の中で移動中の神経細胞内で Rac1 の活性化を担っている GEF の同定に加え、RhoA の分解に関わるユビキチンプロテアソーム複合体の構成分子の同定を試みた。その結果、STK25 と複合体を形成し Rac1 の活性化には ARHGEF6 と ARGEF7 (α -PIX および β -PIX)が関与する事が分かった。加えて RhoA の分解には E3 Ubiquitin Ligase 複合体のコンポーネントとして Cullin 3 と Bacurd1 が関与している結果が得られた。
- 9) 本研究で得られた結果は北米神経科学学会の学会誌「The Journal of Neuroscience」に 2021 年 9 月に掲載された。
- 10) 本研究の基礎である、Reelin シグナル下で PKC により引き起こされる GM130 のリン酸化とゴルジ体伸長との関係については本研究で設定した最終目標を達成するために今後も継続して研究する必要があるが、Reelin シグナルと拮抗してゴルジ体伸長に関わる STK25 の神経細胞移動における役割について詳細な解明を果たした事は、残された課題である GM130 のリン酸化とゴルジ体伸長機構の解明にも十分貢献できる成果であるといえる。今後、現在作成中の変異体マウス等を駆使して Reelin シグナルと STK25 が関与するゴルジ体構造制御機構の解明を進める事で、ゴルジ体構造のダイナミクスと脳神経系の機能的恒常性の維持の間の関係性を明らかにすることが出来ると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shisui Fujita, Satomi Yoshida, Tohru Matsuki, Manoj Kumar Jaiswal and Kenjiro Seki	4. 巻 32
2. 論文標題 The 1-adrenergic receptors in the amygdala regulate the induction of learned despair through protein kinase C-beta signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Behavioural Pharmacology	6. 最初と最後の頁 73-85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/FBP.0000000000000605	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 該当する
1. 著者名 Masashi Ueda, Tohru Matsuki, Masahide Fukada, Shima Eda, Akie Toya, Akio Iio, Hidenori Tabata and Atsuo Nakayama	4. 巻 13:80
2. 論文標題 Knockdown of Son, a mouse homologue of the ZTTK syndrome gene, causes neuronal migration defects and dendritic spine abnormalities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-020-00622-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsuki Tohru, Iio Akio, Ueda Masashi, Tsuneura Yumi, Howell Brian W., Nakayama Atsuo	4. 巻 41
2. 論文標題 STK25 and MST3 Have Overlapping Roles to Regulate Rho GTPases during Cortical Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8887 ~ 8903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0523-21.2021	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 Kasama Emi, Moriya Miho, Kamimura Ryuma, Matsuki Tohru, Seki Kenjiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Formation of False Context Fear Memory Is Regulated by Hypothalamic Corticotropin-Releasing Factor in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6286 ~ 6286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23116286	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松木亨
2. 発表標題 Stk25 acts as a hub protein for the Rho-GTPases regulation in an MST3 compensation manner during cortical development
3. 学会等名 日本神経科学会第42回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松木亨、飯尾明生、上田昌史、戸谷明恵、中山敦雄
2. 発表標題 Stk25 and MST3 act on neuronal polarization and migration in a compensation manner.
3. 学会等名 日本神経科学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松木亨、飯尾明生、上田昌史、常浦裕未、中山敦雄
2. 発表標題 STK25が関与する大脳皮質形成機構
3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本組織培養学会編	4. 発行年 2020年
2. 出版社 じほう	5. 総ページ数 161
3. 書名 細胞培養実習テキスト 第2版	

〔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
研究 分 担 者	中山 敦雄 (Nakayama Atsuo) (50227964)	愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・細胞病態研究部・部長 (83902)	

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