

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590094

研究課題名 (和文) 大脳皮質形成における G タンパク質共役受容体シグナルの機能抗体を用いた解析

研究課題名 (英文) Analysis of GPCR signaling in cortical development using the functional antibody

研究代表者 水野 憲一 (MIZUNO NORIKAZU)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：90212232

研究成果の概要 (和文) : 大脳皮質形成時における G タンパク質共役受容体シグナルを解明するために、神経前駆細胞特異的な GPCR に対する機能抗体を用いて、神経前駆細胞の機能に対する作用およびシグナル伝達系の解析を行った。その結果、Gq および G12/13 シグナルが神経前駆細胞の遊走を阻害するのに対し、Gs-PKA シグナルが doublecortin のリン酸化を介してラメリポディア形成を誘導し、神経前駆細胞遊走を促進する新規の機構を解明した。

研究成果の概要 (英文) : Using the functional antibodies against the neural progenitor cell-specific G protein coupled receptors (GPCRs), we investigated the function and the signal transduction of these GPCRs in cortical development. We elucidated that Gs-PKA signaling regulated the phosphorylation of doublecortin that induced the lamellipodium formation and neural progenitor cell migration, while Gq and G12/13 signals inhibited the migration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：神経科学、脳・神経、薬学

## 1. 研究開始当初の背景

脳の複雑な構造を正常に形成、維持するためには、細胞の分裂、移動が正しく制御されなければならない。一方、ヒトにおける脳形成異常疾患の病理遺伝学的解析から、reelin、LIS-1 や doublecortin (DCX) など神経前駆細胞の移動を制御する分子がいくつか明らかになっており、疾患と神経前駆細胞移動のメカニズムとの関わりも強い。脳における神経

細胞の発生、移動は、脳室帯 (ventricular zone : VZ) に局在する神経幹細胞に端を発する。神経幹細胞の非対称分裂によって生じた神経前駆細胞は、ラジアルグリア細胞に沿って脳表面に向かって放射状に移動し (radial migration)、皮質板 (cortical plate : CP) を形成する。さらに、大脳切片のタイムラプス顕微鏡を用いた観察により、神経前駆細胞が VZ から移動開始し、中間体 (IZ) 付近で

移動を停止、多極性に形態を変化させ、水平方向に移動を行い (tangential migration)、さらに再び IZ から CP に向けて再遊走し、CP で停止するというような、その移動が複雑に制御されていることが示唆される (J. Neurosci. 23: (2003))。しかし、この神経前駆細胞の複雑な移動が、どのようなリガンドや受容体を介したシグナル伝達機構によって制御され、またどのような意味をもつか明らかになっていない。一方、前頭葉の構造に異常を示す両側性前頭頭頂多小脳回症の患者から、オーファン G タンパク質共役受容体 GPR56 の変異があることが報告された (Science 303: (2004))。この報告は G タンパク質共役受容体 (GPCR) の変異により大脳皮質の局所的パターンニングが異常になることを示唆する初めての例であったが、われわれは GPR56 からのシグナルが G12/13 および Rho を介して神経前駆細胞の移動を抑制することを明らかにした (J. Biol. Chem. 283: (2008))。一方、われわれはマウス胎児脳から調製した神経前駆細胞および脳切片培養系とアデノウイルス遺伝子導入系を用いて Gq と JNK を介した GPCR シグナルが神経前駆細胞の遊走を抑制することを明らかにしている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102: (2005))。これらの研究から、GPCR シグナルが神経前駆細胞の遊走制御を担う機構の 1 つであることが示唆される。

大脳皮質形成期における神経前駆細胞の脳周辺部への遊走と分化のメカニズムを知ることは、脳の発達、成体における神経の再生において重要な課題である。大脳皮質形成における神経細胞移動のメカニズムについては古くから研究が行われてきた。また、細胞遊走における G タンパク質の関与については、神経細胞以外のさまざまな細胞において研究がなされている。しかし神経前駆細胞の分化遊走の分子メカニズムの中で、G タンパク質に焦点を絞った研究は数少ない。われわれは、脳切片作成後に脳室周辺部の細胞を蛍光標識し、機能遺伝子の導入を行うことで、タイムラプス顕微鏡による経時的な細胞の移動、細胞分裂などの動態を観察できる *in vitro* のシステムを確立した。神経前駆細胞の移動、細胞分裂における G タンパク質シグナル伝達系に関与する機能分子の解析、さらに神経前駆細胞表面抗原に対する抗体を用いて、未知の細胞膜機能分子の探索を行える。このシステムを用いて、GPCR からのシグナル伝達機構を解明することができる。

## 2. 研究の目的

本研究は、大脳皮質形成時の神経前駆細胞の制御機構における GPCR シグナルを解明することを目的とし、神経前駆細胞特異的な GPCR の同定を行い、同定された GPCR に対す

る機能抗体の作製を行う。大脳皮質切片培養系を用いたタイムラプス顕微鏡観察により、機能抗体の神経前駆細胞の機能に対する作用、シグナル伝達系の解析を行う。また機能抗体を用いた GPCR の活性化および不活性化機構の解析を行う。

われわれは、神経前駆細胞の遊走において G タンパク質シグナルによる正と負の二重制御機構が存在することを見出している。この制御機構が、複雑な radial migration のメカニズムの解明に結びつく可能性が高い。また本研究の手段として用いる機能抗体は、神経前駆細胞の機能を調べる良いツールとなるのみならず、疾患に対する治療薬の開発にもつながる可能性がある。GPCR に対する機能抗体は、ムスカリン作動性受容体、 $\beta$  アドレナリン受容体で同定されており、また自己免疫疾患において甲状腺刺激ホルモン受容体を恒常的に活性化する自己抗体が発見されている。一方、リガンドがない状態でも、受容体のアミノ酸変異により恒常的活性型受容体になること、GPCR の過剰発現によって活性化受容体が増大しうることが報告されている。われわれは、神経前駆細胞に発現している G タンパク質共役受容体として GPR56 に注目し、GPR56 の過剰発現が、G12/13 シグナルにより serum responsive element (SRE) を介した転写の活性化を引き起こすことを明らかにした。さらに GPR56 の細胞外ドメインを抗原とした抗体作製を行い、GPR56 を発現させた細胞の転写活性をさらに増加させるアゴニスト抗体を得て、特許申請も行っている (特願 2007-284829)。GPR56 に対する機能抗体の例を応用し、神経前駆細胞に特異的に発現する GPCR の機能解析を機能抗体により行う。

## 3. 研究の方法

(1) 大脳皮質培養による神経前駆細胞移動アッセイシステムを用いたシグナル伝達系の解析

GPCR シグナル伝達系が神経前駆細胞の機能をどのように制御しているのかを解明するために、胎生 11 日目マウス脳から調製した培養前駆細胞、あるいは胎生 16 日目マウス大脳皮質組織培養によるアッセイシステムを用いて解析を行った。大脳皮質切片の組織培養を用いたアッセイシステムは、脳室帯の神経前駆細胞を、アデノウイルスを用いた GFP 発現ベクターの導入により標識し、タイムラプス共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡により生きたまま脳切片における細胞の動態をリアルタイムで観察できる。これらのシステムを用いて、各種リガンド、活性化剤、阻害剤などの薬剤投与による効果を検討した。また、種々の細胞内シグナル伝達分子の遺伝子をアデノウイルスにより発現させる

ことで下流の分子を特定し、大脳皮質形成における遊走の制御機構、さらには脳形成異常疾患の原因を追求した。さらに JNK や PKA などのタンパク質リン酸化酵素の標的分子の同定を行い、神経前駆細胞の遊走の分子機構を解明した。

#### (2) 脳発生過程におけるオーファン GPCR の発現と機能抗体の作製および活性化機構の解析

GPR56 の細胞外ドメインのリコンビナントタンパク質を抗原とした抗体作製を行った。機能抗体の評価系としてボイデンチャンパー法などの *in vitro* における神経前駆細胞の移動や、レポーター遺伝子を用いた転写活性、細胞内 Ca 濃度測定などを用いて、機能抗体の効果を検討した。さらに機能抗体の GPR56 における認識部位を同定するために、GPR56 の細胞外ドメインの部分欠損変異体の作製、さらに GPR56 の予測糖鎖修飾部位の点変異体の作製を行い、抗体を用いたイムノブロット、細胞免疫染色およびフローサイトメトリーにより GPR56 の活性化機構の解明を目指した。

#### (3) doublecortin リン酸化による神経前駆細胞遊走の制御機構の解析

Gs シグナルからどのような機構で神経前駆細胞の遊走を促進するかを検討するため、微小管結合タンパク質 doublecortin (DCX) に注目して解析を行った。DCX のリン酸化変異体あるいは内在性 DCX をノックダウンする shRNA を発現するウイルスベクターを用いて切片培養や胎生マウス脳室にウイルスベクターを注入し、*in vivo* での大脳皮質における細胞移動の観察、また *in vitro* での培養神経前駆細胞によるボイデンチャンパー法により解析した。DCX の微小管に対する親和性は、HEK293 細胞や培養神経前駆細胞における微小管分画法により分析した。またラメリポディアの形成および動態は GFP 融合アクチンおよび mCherry 融合 DCX 変異体を神経前駆細胞に発現させ、タイムラプス顕微鏡により観察した。Rac の活性化は PAK-CRIB を用いたプルダウン法により検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 大脳皮質培養による神経前駆細胞移動アッセイシステムを用いたシグナル伝達系の解析

大脳皮質培養による神経前駆細胞アッセイシステムを用いて、神経前駆細胞の radial migration における GPCR の機能を解析した。われわれはすでに培養神経前駆細胞を用いてエンドセリンが Gq シグナルを介して細胞遊走を抑制することを報告しているが、細胞遊走のどの過程に作用して遊走を阻害して

いるのか明らかになっていない。本研究において、培養神経前駆細胞および大脳皮質組織培養によるタイムラプス顕微鏡を用いた解析により、神経前駆細胞の細胞同士の接着性を高めることで遊走を阻害していることが示唆された。また、リガンド未知である GPR56 は、機能抗体により G12/13 を介して同様に遊走を阻害するが、GPR56 に対する機能抗体では、エンドセリンでみられたような細胞凝集はみられなかった。このことから、Gq と G12/13 による遊走抑制機構は異なるものであることが示唆された。

さらに神経前駆細胞の遊走における G タンパク質の関与を調べるために、G タンパク質と GPCR の共役を特異的に阻害する各種 G タンパク質  $\alpha$  サブユニット C 末端ペプチドをアデノウイルスベクターにより脳切片に過剰発現させ、細胞移動の変化を調べた。その結果、G $\alpha$ s-C 末端ペプチド (G $\alpha$ s-ct) 特異的に神経前駆細胞遊走の阻害がみられた。一方、他の G $\alpha$ i, G $\alpha$ q, G $\alpha$ 12 に対する C 末端ペプチドは効果がみられなかった。さらに、G $\alpha$ s-ct による遊走阻害は、アデニル酸シクラーゼ活性化剤であるフォルスコリン (Fsk) や cAMP アナログであるジブチリル cAMP (dbcAMP) に解除された (図 1)。また Gs 共役 GPCR のリガンドである下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) は、脳切片においても遊走促進活性を示し、

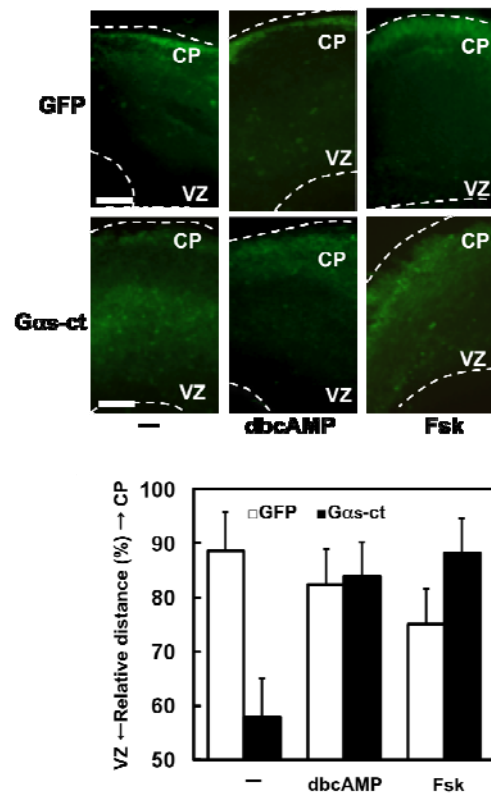


図1 Gsシグナルによる神経前駆細胞遊走制御

PACAP アンタゴニストは遊走を阻害した。これらの結果より、Gs/cAMP/PKA シグナルは神経前駆細胞遊走に対して促進的に働くことが示唆された。

Gタンパク質サイクルを調節する因子として、Ric-8が報告されている。Ric-8AはGqやGiと相互作用し、グアニンヌクレオチド交換因子として作用することが報告されているが、Gsと相互作用するRic-8Bの機能はまだ不明であった。われわれは、Ric-8BはRic-8Aとは異なり、Gsと相互作用することでプロテオソーム系におけるGsの分解を阻害する働きがあることを新たに見出し、Gsシグナルの調節に関与することを報告した。培養神経前駆細胞にアデノウイルスベクターを用いてRic-8の発現抑制を行ったところ、Ric-8BのノックダウンはPACAPによる遊走促進活性を減少させた。

さらに、大脳皮質形成期の神経前駆細胞遊走におけるGPCRの機能を解析することを目的に、培養神経前駆細胞を用いてGsシグナルが細胞遊走を促進する機構を解明することに重点をおき実験を進めた。まず微小管結合タンパク質doublecortin(DCX)に注目して解析を行った。神経前駆細胞の内在性DCXを、アデノウイルスを用いたshRNA発現によりノックダウンし、さらに、DCXの疑似リン酸化型変異体および非リン酸化型変異体を神経前駆細胞に過剰発現させ、ボイデンチャンパー法により遊走能を評価した(図2)。その結果、野生型DCX(WT)を発現すると、Fsk依存的な遊走促進がみられ、その効果はPKA阻害剤(KT)により抑制された。一方、非リン酸化型変異体(S47A)ではFskによる遊走促進がみられなかった。疑似リン酸化型変異体(S47E)はFskによる刺激がなくても遊走促進がみられ、さらにPKA阻害剤はこの促進効果を抑制しなかった。このことから、Gs/cAMP/PKAの経路によりDCXがリン酸化され、遊走を促進することが示唆された。

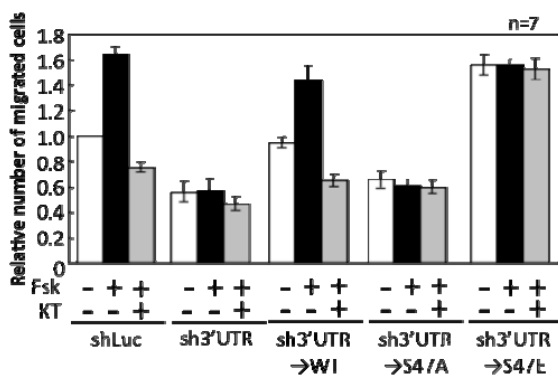


図2 リン酸化DCXによる神経前駆細胞遊走制御

(2) GPR56 に対する機能抗体の作製および

#### GPR56 活性化機構の解析

まずヒトGPR56に対する機能抗体の作製を行った。その結果、GPR56を内在的に発現するU87グリオーマ細胞の細胞内Ca増加を引き起こし、またボイデンチャンパー法による細胞遊走を阻害する抗体を新たに得ることに成功した。一方、マウスGPR56に対するモノクローナル機能抗体をラットに対して免疫を行い、モノクローナル機能抗体を作製した。その結果、機能抗体を得ることはできなかったが、イムノプロット、免疫沈降、細胞免疫染色やフローサイトメトリーに用いることができる抗体を数種類得ることができた。

これらの抗体を用いて、GPR56の活性化機構について調べた。GPR56の細胞外ドメインに対する欠損変異体を作製し、HEK293細胞にSREレポーター遺伝子とともに過剰発現をさせ、ルシフェラーゼ活性を指標にSRE転写活性の変化を調べた。その結果、細胞外ドメイン欠損変異体は、野生型に比べて活性が高いことが示唆された。このことは、細胞外ドメインが抑制的に作用していることを示唆している。さらにGPR56の糖鎖修飾の役割を調べるために、糖鎖修飾の予測部位に対する点変異体を作製し実験を行った。6つの予測部位すべての変異体は、SRE転写活性の増加を引き起こさなかった。また、GPR56個体を用いたフローサイトメトリーや細胞免疫染色の結果、糖鎖修飾部位の点変異体は、細胞表面へのGPR56の移行が抑制されていることが

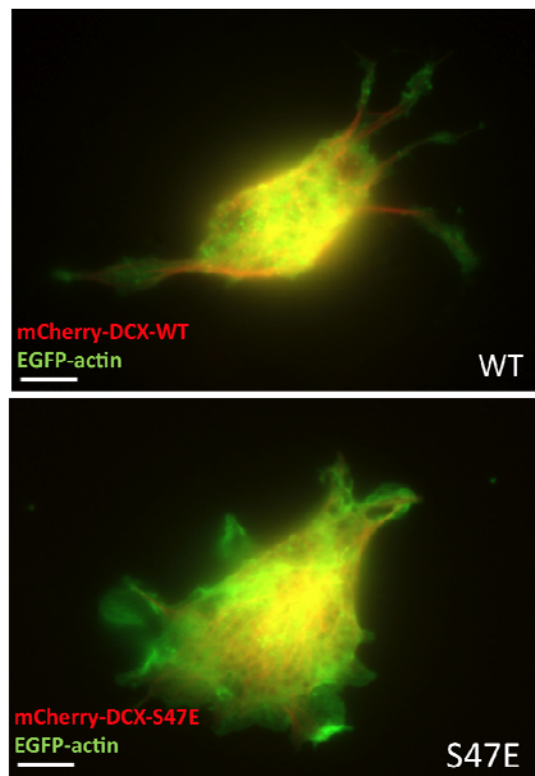


図3 リン酸化DCXによるラメリポディア形成促進

示唆された。さらにイムノブロット、細胞免疫染色およびフローサイトメトリー解析の結果、糖鎖修飾部位の点変異体は、adhesion GPCRの共通構造であるGPS(GPCR proteolytic site)での切断が起こらず、膜への移行が行われないことがわかった。

(3) Doublecortinリン酸化による神経前駆細胞遊走の制御機構の解析

DCXリン酸化の微小管における機能を解析した。その結果、PKAシグナルはDCXの微小管への親和性を減少させ、また野生型に比べ、リン酸化型変異体はチューブリン重合能が減少していることが明らかとなった。しかし、PKAシグナルによるリン酸化DCXの微小管に対する効果だけでは、遊走能促進効果が説明できず、アクチン系に対する効果を調べたところ、疑似リン酸化型DCXは、ラメリポディア形成を促進し、さらにその運動性を増加させることがわかった(図3)。

ラメリポディアの形成は、Racの活性化によって行われる。Racの優性抑制型変異体を発現させたところ、リン酸化DCXによるラメリポディアの形成は阻害された。さらにRacの活性化をPAK-CRIBを用いたプルダウン法により検出した。培養神経前駆細胞をPACAPで刺激するとRacの活性化がみられ、この活性化はPKA阻害剤により抑制された。またPACAPによるRacの活性化はDCXのノックダウンにより抑制された。また、Racの活性化はDCXリン酸化変異体によってもみられた。これらの結果から、Gs-PKAシグナル伝達系がDCXのリン酸化を介してRacを活性化することがわかった。さらに、リン酸化DCXがRacのグアニンヌクレオチド交換因子であるAsef-2と相互作用することを見いだした。以上の結果から、微小管結合タンパク質として微小管の機能を調節するDCXが、Gタンパク質シグナルによりリン酸化されることで、微小管から離れ、Racを介してアクチン繊維のダイナミクスを調節するという新しい機構を見いだした(図4)。

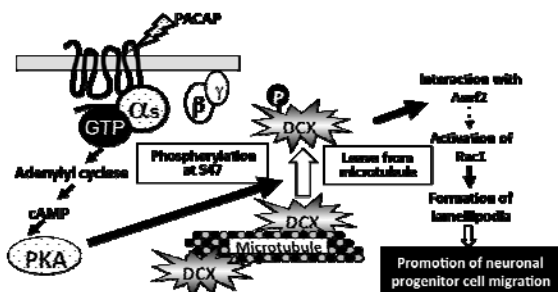


図4 Gs/PKAシグナルによるDCXリン酸化の神経前駆細胞遊走促進機構

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 Toriyama M, Mizuno N, Fukami T, Iguchi T, Toriyama M, Tago K, Itoh H. Phosphorylation of doublecortin by protein kinase A orchestrates microtubule and actin dynamics to promote neuronal progenitor cell migration. J. Biol. Chem. 査読有 287 (2012) 12691-12702
- ② Nishimura A, Kitano K, Takasaki J, Taniguchi M, Mizuno N, Tago K, Hakoshima T, Itoh H. Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 査読有 107 (2010) 13666-13671
- ③ Tago K, Funakoshi-Tago M, Sakinawa M, Mizuno N, Itoh H.  $\kappa$ B-Ras is a nuclear-cytoplasmic small GTPase that inhibits the NF- $\kappa$ B activation through the suppression of transcriptional activation of p65/RelA. J. Biol. Chem. 査読有 285 (2010) 30622-30633
- ④ Nakata A, Urano D, Fujii-Kuriyama Y, Mizuno N, Tago K, Itoh H. G-protein signalling negatively regulates the stability of aryl hydrocarbon receptor. EMBO Rep. 査読有 10 (2009) 622-628
- ⑤ Nagai Y, Nishimura A, Tago K, Mizuno N, Itoh H. Ric-8B stabilizes the alpha subunit of stimulatory G protein by inhibiting its ubiquitination. J Biol Chem. 査読有 285 (2010) 11114-11120

[学会発表] (計16件)

- ① Manami Toriyama Doublecortin orchestrates microtubule and actin dynamics to promote neuronal progenitor cell migration in a manner dependent on phosphorylation by PKA 2011 Annual meeting, ASCB 2011年12月4日 DENVER, U.S.A.
- ② Kenta Takami Analysis of non-receptor type of G protein regulator Ric-8 involved in Drosophila gastrulation 第34回日本分子生物学会 2011年12月16日神奈川県横浜市

- ③ Naoto Sasai N-terminal fragment of Latrophilin1 negatively regulates the adhesion GPCR-induced signals 第34回日本分子生物学会 2011年12月16日 神奈川県横浜市
- ④ Riris Jenie Involvement of Ric-8 in the  $G\alpha_q$ -induced suppression of Gs signaling 第34回日本分子生物学会 2011年12月16日 神奈川県横浜市
- ⑤ Kenji Tago Functional involvement of an atypical nuclear-cytoplasmic small GTPase K-Ras in oncogenic signaling pathway 第34回日本分子生物学会 2011年12月16日 神奈川県横浜市
- ⑥ Shigeyuki Ota Glycosylation of GPR56 extracellular domain affects on the signaling and the GPS cleavage 第34回日本分子生物学会 2011年12月15日 (ポスター) 16日 (口頭) 神奈川県横浜市
- ⑦ 多胡憲治 Gタンパク質シグナルにより制御される SUMO化とその分子機構の解析 第84回日本生化学会 2011年9月24日 京都府京都市
- ⑧ 鳥山真奈美 微小管結合タンパク質 doublecortin の PKA によるリン酸化を介した新規アクチン骨格制御 第84回日本生化学会 2011年9月24日 京都府京都市
- ⑨ 鳥山真奈美 Gs-PKA シグナルによる微小管結合タンパク質 doublecortin の新規機能の獲得 第58回日本生化学会近畿支部例会 2011年5月21日 大阪守口市
- ⑩ Norikazu Mizuno Multi-regulation of neuronal progenitor migration by G protein signaling American Society for Neurochemistry 42nd Annual Meeting 2011年3月22, 23日 St. Louis, Missouri USA
- ⑪ Manami Toriyama Phosphorylation of doublecortin by G protein-PKA signaling regulates neuronal progenitor cell migration American Society for Neurochemistry 42nd Annual Meeting 2011年3月20, 21日 St. Louis, Missouri USA

- ⑫ 水野憲一 大脳皮質形成における神経前駆細胞移動の G 蛋白質シグナルによる多重制御機構 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010) 2010年12月7, 10日 兵庫県神戸市
- ⑬ 鳥山真奈美 Doublecortin のリン酸化を介した Gs-PKA シグナルによる神経前駆細胞の遊走促進 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010) 2010年12月10日 兵庫県神戸市
- ⑭ Yusuke Nagai Ric-8B accelerates Gs signaling through the stabilization of the  $\alpha$  subunit of stimulatory G protein The American Society for Cell Biology 49th annual meeting 2009年12月7日 San Diego, CA, USA
- ⑮ 吉田真奈美 Gタンパク質シグナルによる doublecortin のリン酸化と細胞遊走の解析 第82回日本生化学会大会 2009年10月22日 兵庫県神戸市
- ⑯ 永井裕介三量体 Gタンパク質  $G\alpha_s$  のユビキチン化は Ric-8B との結合により抑制される 第82回日本生化学会大会 2009年10月24日 兵庫県神戸市

[図書] (計1件)

① Norikazu Mizuno, and Hiroshi Itoh LANDES BIOSCIENCE Adhesion-GPCRs Structure to Function  
CHAPTER 14: Signal transduction mediated through adhesion-GPCRs (2010) 157-166

[その他]

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/itoh/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野 憲一 (MIZUNO NORIKAZU)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：90212232