

平成 27 年 11 月 25 日現在

機関番号：31101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590113

研究課題名(和文) 大脳皮質形成における多様なGタンパク質シグナル制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of diverse G protein signaling in cortical development

研究代表者

水野 憲一 (Mizuno, Norikazu)

青森大学・薬学部・教授

研究者番号：90212232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：大脳新皮質形成時の多様なGタンパク質シグナルの制御機能を解明するために、(1) 神経幹細胞における新規非受容体型Gタンパク質活性化因子Ric-8のGタンパク質シグナルに対する機能を解析し、Ric-8A/Bが神経幹細胞の増殖に関与し、さらにRic-8BがGsシグナルを介した神経幹細胞遊走促進効果に寄与することを見出した。(2) 神経前駆細胞に特異的に発現するオーファンGPCRであるGPR56に対する機能抗体の作製を行い、グリオーマ細胞の遊走を抑制する機能抗体を得ることに成功した。さらにヒトGPR56を介した遊走抑制効果はGq/Rhoを介することが解明された。

研究成果の概要(英文)：To analyze the regulatory mechanisms of diverse G protein signaling in cortical development, (1) we investigated the function of Ric-8A/B, which are novel non-receptor type G protein regulators, in neural stem cells. We found that Ric-8A/B was related to the neural stem cell proliferation, and more, Ric-8B was involved in the facilitatory effect of Gs signaling on the cell migration. (2) We generated the functional antibodies against human GPR56, which inhibited the glioma cell migration. These antibodies revealed that human GPR56 inhibited the cell migration through Gq/Rho pathways.

研究分野：生化学、神経科学、細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 神経科学 脳・神経 薬学

1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役受容体 (GPCR) は、脳神経系においては、特に神経伝達物質や感覚受容に対する受容体としてシグナル伝達に欠かすことができない分子であり、GPCR を標的とした神経系治療薬も数多く存在する。しかし脳に発現する数多くの GPCR が、脳発生過程において大脳皮質細胞のどの段階でどのような機能をもつかは不明な点が多い。さらに未だリガンド未知のオーファン GPCR の研究は、創薬の重要なターゲットになるなど臨床研究においても重要な課題となる。オーファン GPCR が神経系遺伝性疾患の原因となる例として、前頭葉の解剖学的形態異常を示し、前頭葉機能不全を呈する両側性前頭頭頂多小脳回症(BFPP)がある。BFPP の患者から発見されたオーファン GPCR である GPR56 の変異は GPCR が脳形成不全疾患の原因であることを示唆する初めての例であった。申請者らは GPR56 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(JBC (2008))。一方、申請者らは培養神経前駆細胞および脳切片培養系を用いて Gq と JNK を介した GPCR シグナルが神経前駆細胞遊走を抑制し(PNAS (2005))、また逆に Gs シグナルが遊走を促進することを見出し、微小管結合タンパク質として同定された Doublecortin が PKA によるリン酸化を受け、微小管から Rho/アクチン骨格系に標的をスイッチングさせることにより遊走を促進するという新たな調節機構を見出した (JBC (2010))。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重要な機構の 1 つであることが示唆された。さらに GPR56 の細胞外ドメインを抗原として作製した抗体が GPR56 シグナルを増強させるアゴニスト抗体であることを明らかにし、特許申請も行った。一方、申請者らは、ショウジョウバエや線虫において神経幹細胞の非対称分裂に参与する新規 G タンパク質活性化因子 Ric-8 の作用メカニズムを解析し、哺乳動物において 2 種類存在する Ric-8 がそれぞれ異なる作用様式で G タンパク質シグナルを調節していることを報告し(Genes Cells (2006), JBC (2010))、GPCR に依存したシグナル制御のみならず GPCR を介さない新たな G タンパク質シグナルの可能性を考えているが、その生理機能、作用機構の解明が今後の課題であった。

2. 研究の目的

大脳新皮質形成時の複雑な機能制御における多様な G タンパク質シグナルの生理機能を解明するために、神経前駆細胞の自己増殖、非対称分裂、移動、分化などの大脳皮質細胞の多様性動態を追跡し、(1)新規非受容体型 G

タンパク質シグナル調節因子、および(2)機能抗体をツールとした神経前駆細胞に特異的に発現するオーファン GPCR の機能解析、シグナル解析を行う。さらに作製した抗体を用いた神経前駆細胞の細胞系譜解析、抗体の結合部位同定をもとにした内在性リガンド探索、構造学的活性化機構解析への応用を検証する。

3. 研究の方法

(1) 大脳皮質形成における新規 G タンパク質制御機構の機能解析
初代神経幹細胞の調製は、胎生 11.5 日マウスより行い、neurosphere 法により培養した。Ric-8A/B に対するノックダウンは、それぞれの shRNA を発現するアデノウイルスを構築することにより行った。神経幹細胞の増殖能は MTT 法により、遊走能はボイデンチャンバー法により測定した。

(2) オーファン GPCR に対する機能抗体の作製

抗原としてヒト GPR56 細胞外ドメイン (hGPR56ECD) のリコンビナントタンパク質をバキュロウイルス-Sf9 昆虫細胞系より単離した。抗原はマウスに免疫し、約 1 ヶ月後にリンパ節より抗体産生細胞を調製した。調製した細胞は、ポリエチレングリコール法によりミエローマ細胞と細胞融合させた。1 次スクリーニングは、単離した hGPR56ECD リコンビナントタンパク質を抗原とした ELISA 法により行い、さらにボイデンチャンバー法による U87-MG 細胞の遊走に対する効果により機能抗体のスクリーニングを行った。U87-MG 細胞の遊走能は、ボイデンチャンバー法により測定した。細胞内 Ca²⁺濃度の測定は Fura-2/AM を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 大脳皮質形成における新規 G タンパク質制御機構の機能解析

Ric-8A/B の細胞内局在

免疫染色法によって bFGF の存在下で未分化状態を維持させた神経幹細胞、増殖因子除去による分化させたニューロンおよびグリア細胞における内在性 Ric-8A/B の局在について検討した。その結果、神経幹細胞においては Ric-8A/B は細胞質及び核に局在した。Ric-8A の発現は、ニューロンの分化に伴い減少し、グリア細胞では発現が維持された (図 1A)。一方 Ric-8B の発現は分化に伴う発現量の減少は見られなかった。

Ric-8A/B のノックダウンが神経幹細胞の増殖に及ぼす影響

神経幹細胞における Ric-8A/B の生理機能を解析するために、内性分子のノックダウンを行った。ノックダウンを行なうため、Ric-8A あるいは Ric-8B に対する shRNA を細胞内に発現させるためのアデノウイルスベクターを作製し、これを実験に用いた。Ric-8A/B のノックダウンが神経幹細胞の増殖に及ぼす効果について MTT アッセイによって検討した。アデノウイルスを培養神経幹細胞に 2 日間感染させ、Ric-8A/B のノックダウンをイムプロットによって確認した。アデノウイルス感染細胞は 96 well プレートにまき、日数経過毎に MTT を添加した。その結果、コントロールの細胞と比較して Ric-8A あるいは Ric-8B がノックダウンされた神経幹細胞では増殖が低下した(図 1B)。

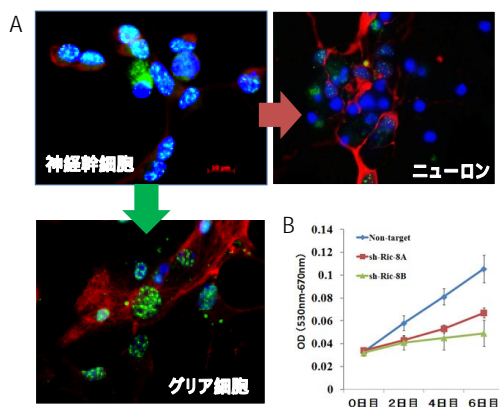


図1 Ric-8の細胞内局在と細胞増殖における機能
A. Ric-8Aの細胞内局在。緑: Ric-8A, 青: ヘキストによる核染色, 赤: 神経幹細胞: nestin, ニューロン: β -tubulin, グリア細胞: GFAP
B. 神経幹細胞の増殖に対する Ric-8 ノックダウンの効果

Ric-8A/B のノックダウンが神経幹細胞の遊走に及ぼす影響

次に、Ric-8A/B のノックダウンが神経幹細胞の遊走に及ぼす影響についてポイデンチャンパー法によって検討した。神経幹細胞の遊走能は、ポイデンチャンパー法により測定した。実験の結果、コントロールの細胞と Ric-8A がノックダウンされた細胞の間で遊走した細胞数に有意差は認められなかった。一方、Ric-8B がノックダウンされた細胞ではコントロールの細胞と比較して遊走した細胞数が有意に減少した(図 2A)。われわれは、これまでに培養神経幹細胞において脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド (PACAP) による刺激が Gs シグナルを介して PKA を活性化させることによって神経幹細胞の遊走を促進すること (JBC (2012))、Ric-8B が Gs を安定化させることによって Gs シグナルを増強すること (JBC (2010)) を報告していることから、Ric-8B のノックダウンによる遊走阻害効果が Gs シグナルの低下に起因すると予測し、神経幹細胞における Ric-8B と Gs シグナルの関係について検討した。Gs シグナルを活性化させるリガンドである PACAP を添加し、その遊走促進効果について検討した。実験の結果、コントロールの細胞におい

ては PACAP の添加によって約 1.7 倍の遊走促進効果が認められた。一方、Ric-8B がノックダウンされた細胞では PACAP による遊走促進効果が阻害された(図 2A 左)。また、アデニル酸シクラーゼの下流から Ric-8B のノックダウンによる遊走阻害効果をレスキューできるか検討するため、Ric-8B をノックダウンした細胞に細胞膜透過性 cAMP アナログである dbcAMP を添加して遊走能を測定した。その結果、Ric-8B がノックダウンされた細胞において dbcAMP 添加により遊走能は約 3 倍に増加した(図 2A 右)。これらの結果より、Ric-8B は神経前駆細胞の遊走において PACAP 受容体などに共役する Gs の安定化などに寄与することにより、Gs シグナルを増強することで、神経前駆細胞の遊走を促進することが示唆された(図 2B)。

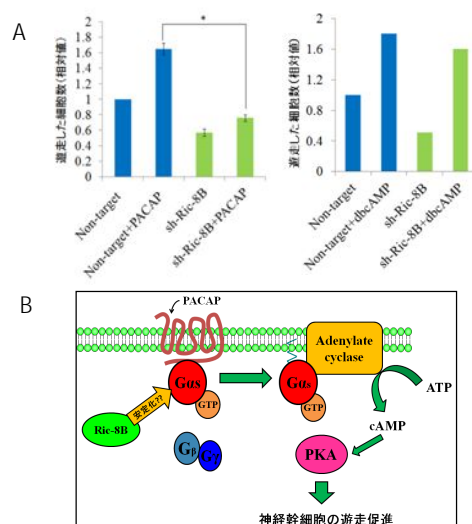


図2 Ric-8Bの細胞遊走における機能
A. 神経幹細胞の遊走に対する Ric-8B ノックダウンの効果
左: Ric-8B のノックダウンと PACAP の効果. 右: Ric-8B のノックダウンと dbcAMP の効果
B. 神経幹細胞遊走促進に対する Gs シグナルと Ric-8B のモデル図

(2) オーフアン GPCR に対する機能抗体の作製

U87-MG 細胞遊走に対する効果による機能的スクリーニング

われわれの先行研究により、マウス GPR56 の細胞外ドメインに対するポリクローナル抗体が、共役する G12/13、Rho を活性化し SRE 転写因子の活性化を介して、神経前駆細胞の細胞遊走を抑制するリガンド様の機能抗体であることを発見した (JBC (2008))。本研究では、ヒト GPR56 に対する機能抗体を作製し、その抗体を用いてどのようなメカニズムで GPR56 を活性化するかを詳細に解析した。抗原としてヒト GPR56 細胞外ドメイン (hGPR56ECD) のリコンビナントタンパク質をバキュロウィルス-Sf9 昆虫細胞系より単離した。ELISA 法により 256 の陽性クローンを選択し、さらに機能的スクリーニングを行っ

た。機能抗体のスクリーニング法として、GPR56 の発現が上昇しているヒトグリオーマ細胞腫 U87-MG 細胞を用い、この細胞の遊走能に対する抗体の効果を検討した。その結果、細胞遊走に対し強く抑制効果を示す抗体 17CC、4C3、11E9 の三種類が得られた(図 3A)。

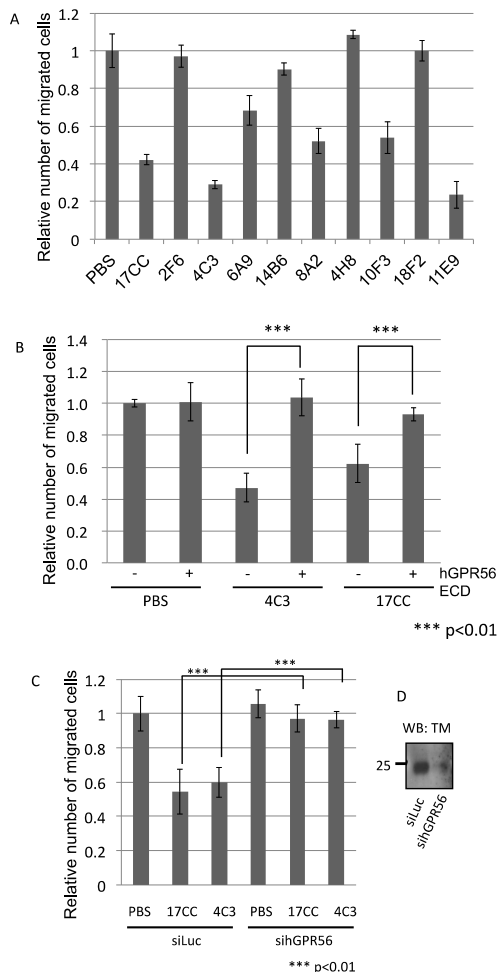


図3 U87グリオーマ細胞遊走を阻害する機能抗体
A. 機能抗体のスクリーニング
B. 抗原タンパク質により機能抗体の遊走抑制効果は阻害される
C. GPR56ノックダウンによる、機能抗体の遊走抑制活性の変化

機能抗体による遊走抑制は GPR56 を介して起こっている

これらの抗体による遊走抑制効果が GPR56 を介して行われているかの検討を行うために二つの実験を行った。まず、抗原である hGPR56ECD を抗体と競合させたときの抗体の効果について検討した。17CC および 4C3 による細胞遊走抑制効果は、抗原であるヒト GPR56 リコンビナントタンパク質によりキャンセルされることがわかった(図 3B)。次に、GPR56 を siRNA でノックダウンしたときの抗体の効果を検討した。コントロールとして si-ルシフェラーゼ (si-Luc) を導入したものと比較した。結果、hGPR56 に対する siRNA (si-h56) を導入した細胞では抗体の効果はなくなることがわかった(図 3C)。si-h56 により内在性の GPR56 が発現抑制されていることを、GPR56 抗体を用いて Western blot により確認した(図 3D)。以上のことから 17CC、4C3

の抗体は GPR56 に結合することにより、U87-MG 細胞の遊走を抑制していることが明らかになった。

アゴニスト様抗体は、Gq、Rho を介して細胞遊走を抑制する

ヒト GPR56 は Gq とのタンパク質相互作用は示されていたが、実際に Gq を活性化するかどうかは示されていなかった。そこで、Gq の特異的阻害剤である YM-254890 を用いて抗体の U87-MG 細胞の遊走抑制に対する効果を

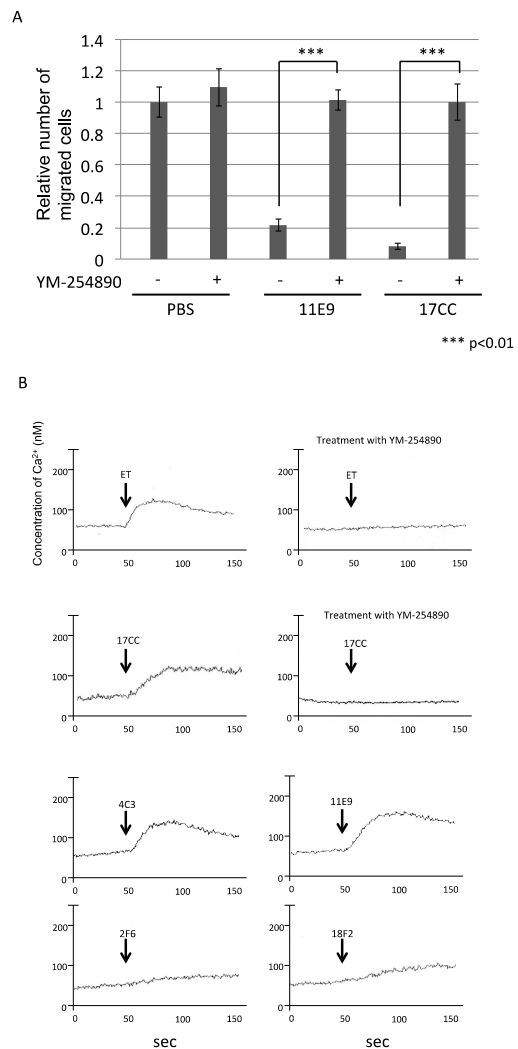


図4 機能抗体はGq/Rhoを介してU87グリオーマ細胞遊走を阻害する
A. U87グリオーマ細胞遊走におけるGq特異的阻害剤YM-254890の効果
B. 機能抗体による細胞内Ca²⁺濃度変化
C. U87グリオーマ細胞遊走におけるRhoキナーゼ阻害剤Y 27632の効果

検討した。1 μ M YM-254890 存在下、非存在下で、10 μ g/ml 17CC あるいは 30 μ g/ml 11E9 を作用させたときの U87-MG 細胞の遊走能を測定した。すると、両方の抗体による細胞遊走抑制効果を YM254890 はキャンセルできた (図 4A)。

上記の結果より、ヒト GPR56 は Gq と共役していることが示唆された。そこで、Gq の下流で応答する細胞内カルシウム濃度の測定を行った (図 4B)。その結果、U87-MG 細胞遊走において抑制活性を示した 17CC、4C3、11E9 によってポジティブコントロールである Endothelin (ET) と同様の細胞内カルシウム濃度の上昇が引き起こされた。一方、遊走抑制活性を示さなかった 2F6、18F2 ではその効果が見られなかった。また、抗体による細胞内カルシウム濃度上昇の応答は Gq 特異的な阻害剤である YM-254890 によって抑制されることがわかった。このことから、これらの抗体が GPR56 を介し、Gq を活性化し細胞内のカルシウム応答を引き起こすことが明らかになった。

また、10 μ g/ml 17CC に対して Rho キナーゼの阻害剤である Y27632 を処理すると、YM-254890 と同様に抗体による遊走抑制効果をキャンセルできた (図 4C)。このことから、アゴニスト様抗体による遊走抑制効果は、Gq/Rho 経路を介しているということが示唆された。

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3件)

Ohta S., Sakaguchi S., Kobayashi Y., Mizuno N., Tago K., Itoh H. Agonistic Antibodies Reveal the Function of GPR56 in Human Glioma U87-MG Cells. *Biol Pharm Bull.* 38, 594-600 (2015). doi: 10.1248/bpb.b14-00752.

Saito Y., Kaneda K., Suekane A., Ichihara E., Nakahata S., Yamakawa N., Nagai K., Mizuno N., Kogawa K., Miura I., Itoh H., Morishita K. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1-regulated GPR56. *Leukemia.* 27, 1637-1649 (2013). doi: 10.1038/leu.2013.75.

Jenie R.I., Nishimura M., Fujino M., Nakaya M., Mizuno N., Tago K., Kurose H., Itoh H. Increased ubiquitination and the crosstalk of G protein signaling in cardiac myocytes: involvement of Ric-8B in Gs suppression by Gq signal. *Genes Cells.* 18, 1095-1106 (2013). doi: 10.1111/gtc.12099.

[学会発表](計5件)

水野憲一、太田茂之、小林祐希、坂口さやか、伊東 広 機能抗体を用いた癌細胞における GPR56 の機能解析 Functional analysis of GPR56 in tumor cells using the monoclonal antibodies 第 66 回日本細胞生物学会大会 2014 年 6 月 奈良県奈良市

水野憲一、Riris Istighfari Jenie, 仲 矢道雄、多胡憲治、黒瀬等、伊東広. 心筋細胞での Gq シグナルによる Gs 抑制機構に対する Ric-8B の関与 第 86 回日本生化学会年会 2013 年 9 月 11-14 日 神奈川県横浜市

野島悠佑、水野憲一、伊東広 神経細胞の分化に伴う GPR56 の発現パターンの変化 第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 3-5 日 兵庫県神戸市

根岩直希、水野憲一、小林哲夫、伊藤友里、伊東広 LGR5 の発現とシグナル伝達の解析 第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 3-5 日 兵庫県神戸市

鯉森貴行、小林哲夫、水野憲一、伊東広 G s ユビキチン修飾を制御する分子機構の解析 第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 3-5 日 兵庫県神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 憲一 (MIZUNO, Norikazu)
青森大学・薬学部・教授
研究者番号：90212232