

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 24 日現在

機関番号：83902

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25890026

研究課題名(和文) Reelinシグナルによるゴルジ体伸長が神経系の発達に果たす役割

研究課題名(英文) Roles of Golgi deployment regulated by Reelin-Dab1 signaling in brain development

研究代表者

松木 亨 (Matsuki, Tohru)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・研究員

研究者番号：90332329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳の発達には神経細胞の正常な発達が不可欠であり、神経細胞の発達期にはその形態が大きく変化し、成熟する事が知られている。発達初期に見られる形態的な変化として樹状突起形成があるが、その際、通常は細胞質にあるゴルジ体が突起内へ長く伸長することが明らかとなっている。本研究では、このゴルジ体の伸長を制御するリーリンシグナルの役割と、それにより構造変化に関与すると考えられるゴルジ体蛋白質、GM130のリン酸化に着目し、研究を行った。本研究の結果から、リーリン刺激によりGM130のセリン300が特異的にリン酸化を受け、ゴルジ体構造の変化に重要な役割を担っている事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The formation of proper brain architecture requires the normal development of neuronal cells. Neurons, especially, changes its cell shape dramatically from the unpolarized to the polarized cell morphology during the neuronal differentiation. The typical hallmark in neuronal differentiation is axonogenesis and dendritogenesis. Golgi apparatus in neuron extend its size and shape; shows the extension into the apical dendrite. This golgi apparatus deployment is regulated by Reelin-Dab1 signaling. We focused on the mechanisms underlying this golgi deployment and performed the proposed research projects during past 1.5 years. Interestingly, mass-spec analysis could find the phosphorylation on GM130, a cis-Golgi protein by Reelin stimulation. This phosphorylation is on Ser300 and may contribute to the development of brain.

研究分野：発生神経科学

キーワード：リーリンシグナル 発生神経科学 ゴルジ体

1. 研究開始当初の背景

脳は体の中で最も複雑な構造を持つ器官であり、神経細胞間の複雑なネットワークを介した情報伝達機構によって認知学習機能を制御している。このように脳機能は、シナプスを介した神経細胞間の情報伝達によって実現され、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、正常な軸索や樹状突起の発達が阻害されることは、発達障害や統合失調症などの神経疾患の要因となる。しかし、極性を持つ神経細胞の形態形成の制御機構についてはあまり分かっていない。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。

これまで申請者は、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、リーリン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や極性輸送制御を通して樹状突起形成に重要な役割を担っていると考えている。

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。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にどのように関与しているのかを明らかにするとともに、神経細胞の発達に対する生理的役割を明らかにする事を目指す。

3. 研究の方法

1) Reelin 刺激後 30 分以内に神経細胞のゴルジ体は伸長することから、ゴルジ体ダイ

ナミクスに關与する標的蛋白質は、Dab1 のチロシンリン酸化依存的に機能する Src キナーゼや PI3K 等の影響を受けてリン酸化される事が予想される。そのため、免疫沈降法と質量分析を用いて Reelin 刺激に 応答してリン酸化される蛋白質を同定する。本研究では、まずゴルジ体タンパク質に焦点を当て、解析を行う。

2) Stk25 の相互作用因子である α および β は、生体膜輸送や神経突起伸長への関与が報告されている事から、 α および β のゴルジ体伸長機構への関与が示唆される。そのため、Stk25 シグナルに着目し、シグナル分子のゴルジ体ダイナミクスに対する生理的役割を明らかにする。

4 . 研究成果

本研究では、リーリンシグナルにより制御される神経細胞のゴルジ体構造制御機構を明らかにするために、まず、ゴルジ体を構成するタンパク質に着目して研究を進めてきた。研究計画に従い、まず WT のマウスから神経細胞を培養し、Reelin 刺激を行った後、ゴルジ体タンパク質 X, Y, Z についてリン酸化状態を免疫沈降物を用いて確認した。興味深いことに、X のリン酸化は、30 分の Reelin 刺激によって若干増加していた。そこで更にリン酸化の変化が Reelin 刺激によって誘導されたものかどうかを明らかにするために、reelin KO 神経細胞を用いて同様の試験を行った結果、X と Y で見られたリン酸化の変化は、Reelin シグナ

ルの影響である可能性が非常に高いことが判った。

次に、X のリン酸化部位の同定を質量分析装置を用いて行った。その結果、Reelin 刺激により X のリン酸化アミノ酸の同定に成功した。そこで、このアミノ酸残基のリン酸化がゴルジ体伸長に対する鍵となるのかを明らかにするためにリン酸化阻害変異体およびリン酸化模倣変異体を作製して培養神経細胞に導入した結果、リン酸化阻害変異体では Reelin 刺激によってゴルジ体が伸長せず、逆にリン酸化模倣変異体では Reelin 刺激なしに伸長が見られた。この結果から、X のリン酸化は、Reelin シグナルにより制御される神経細胞の発達に重要な役割を担っている事が示唆された。

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 0 件)

[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 :

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松木 亨 (MATSUKI TOHRU)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所

発生障害学部・研究員

研究者番号：90332329

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：