

神経細胞の活動とネットワーク構築のメカニズムの解析

The analysis of neuronal activity and the mechanism of neuronal network construction.

研究代表者 大阪市立大学 大学院医学研究科 講師 豊岡和人

Osaka City University
Graduate School of Medicine
Assistant Professor, Kazuhito Toyo-oka

和文アブストラクト

「認知」及び「記憶」という高度な脳機能は神経細胞が発生プログラムに従って大脳皮質及び海馬において緻密なネットワークを構築することにより達成される。この過程には様々な分子群が関与しているが Lis1、Ndel1、14-3-3ε及び細胞質ダイニンが重要な役割を担っていることは間違いない。そこで私はこれら分子の機能解析を進めてきたが、本研究では特に分子モーターである細胞質ダイニンの制御機構について解析を進める。この分子は自動車のように小胞という荷物を載せて動き出し、停止と発進を繰り返しながら目的地まで小胞を運搬する。そこで、私はどのような分子がどのようなメカニズムにより細胞質ダイニンの発進・停止を制御しているのかを明らかにすることを目指す。この解析によって神経細胞のネットワーク形成機構の一端を解明し、「認知」及び「記憶」という高度な脳機能のメカニズムにせまる。

Abstract

The construction of neuronal network is an important event to exercise the sophisticated functions of brain, such as recognition and memory. This comes from an appropriate development of cerebellar cortex and hippocampus along with a developmental program. There are many molecules involved in development of cerebellar cortex and hippocampus. Ndel1, 14-3-3 epsilon and cytoplasmic dynein have crucial roles in these process. The purpose of this study is to clarify the structure, function and regulatory mechanism of cytoplasmic dynein activity, which details have not been analyzed well because of its huge molecular size. Cytoplasmic dynein is a molecular motor, which binds to cargos and transport them from minus end of microtubules into plus end. However, how cytoplasmic dynein motor activity is regulated has not been clear. That's

why I try to make clear what molecules are important for the regulation of cytoplasmic dynein motor activity. These results contribute to the profound understanding of molecular mechanism of the regulation of cytoplasmic dynein function.

1. 研究目的

脳が高度な機能を発揮するためには綿密な神経細胞間の回路網の構築が重要である。そのためには神経細胞が綿密に制御されたメカニズムに従って正しく移動することが必要不可欠である。綿密な神経細胞間の回路網の構築は神経細胞の移動と正しい位置での停止、正しい細胞間でのシナプス形成により達成される。私は Lis1, Ndel1, 14-3-3ε 及び細胞質ダイニンが神経細胞の移動に重要であることを明らかにしてきた。しかし、これら分子間のシグナル伝達に関しては詳細は明らかではない。特に、エフェクターである細胞質ダイニンのモーター活性の制御機構は不明のままである。そこで私は Lis1, Ndel1, 14-3-3 ε による細胞質ダイニンの活性制御機構の解明を目指した。

2. 研究経過

(1) 細胞質ダイニン、LIS1、14-3-3ε および NDEL1 の相互作用解析のための新しい実験系の開発

私は Lis1, Ndel1, 14-3-3 ε による細胞質ダイニンの活性制御機構の解明を目指して新しい実験系の開発を試みてきた。すなわち、活性を有するタグ分子付きのリコンビナント細胞質ダイニンの作成と精製である。細胞質ダイニンと同様なモーター活性を有する分子であるキネシンとは異なり、細胞質ダイニンは 1000-200kDa の巨大分子である。その活性中心である細胞質ダイニン重鎖は 500kD 以上もあるため精製やリコンビ

ナント分子の作製が困難であり、細胞質ダイニンの詳細な機能解析は非常に困難であった。よって Lis1, Ndel1, 14-3-3 ε による細胞質ダイニンの活性制御機構についてより詳細な解析を行うためには、リコンビナントの細胞質ダイニンを大量に精製し、細胞質ダイニンの活性を *in vitro* で再現できる系を確立することが重要である。そこで、私は細胞質ダイニンのどの部位が活性に重要であるのかを調べるために、細胞質ダイニンのさまざまな領域からなる変異分子を昆虫細胞にて作成・精製した。その結果、GFP タグをつけた全長の細胞質ダイニン重鎖の作成に成功し、活性を持つことも確認した。この細胞質ダイニンを用いればこれまで困難であった細胞質ダイニンの制御機構を解析できる。すなわち、この系を応用して LIS1, 14-3-3ε さらには NDEL1 が細胞質ダイニンの滑走にどのように作用しているのかを明らかにすることができる。

(2) 細胞質ダイニンおよび微小管の活性制御における脱リン酸化の役割

細胞質ダイニンの活性発現にはさまざまな分子との結合とリン酸化・脱リン酸化が重要である。リン酸化に関しては多くの分子が同定され、メカニズムの一端が明らかにされているが、脱リン酸化に関してはあまり解析は進んでいない。私は NDEL1 の脱リン酸化を介して細胞質ダイニン・微小管の活性化をコントロールしている脱リン酸

化酵素、Protein Phosphatase 4 (PP4) を同定した。

PP4は三つのサブユニットから構成され、そのうち二つの分子が活性を制御していることが明らかにされている。しかし、これまでのところ機能はほとんど明らかにされておらず、特に高等動物での機能は不明のままである。そこでPP4の機能を解析するために活性中心であるPP4cサブユニットのノックアウトマウスを作成してその機能解析を行った。興味深いことにPP4cサブユニットは細胞骨格の維持に重要であることがわかった。

(3) *Ndel1* ノックアウトマウスの表現型解析

私は LIS1 の結合分子として NDEL1 を同定し、*Ndel1* の生体内での機能を明らかにするためにノックアウトマウスを作成した。そして大脳皮質形成における機能、特に神経細胞の移動における *Ndel1* の役割について解析を行った。その結果、*Ndel1* ノックアウトマウスの大脳皮質では階層構造に形成異常が認められた。これらは *Ndel1* 欠損神経細胞の移動における異常だけでなく、細胞死も関わっていることを明らかにした

(図 1)。また、*Ndel1* 欠損細胞では微小管の形成に異常が見られ、細胞内小器官の細胞内分布にも異常が見られた。この細胞内小器官の細胞内での輸送に細胞質ダイニンが重要であることが明らかにされていることから *Ndel1* 欠損によって細胞質ダイニンの機能にも異常をきたすことを示した。

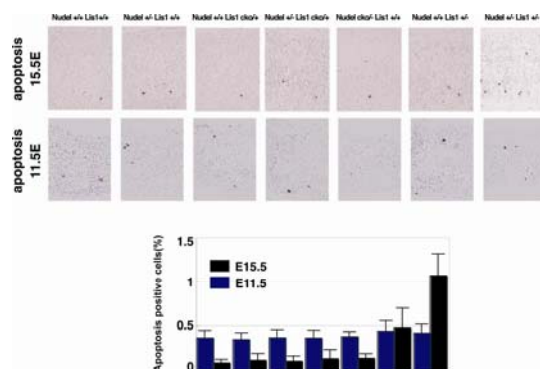
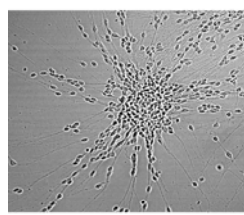


図 1 NDEL1 の欠損した神経細胞ではアポトーシスが引き起こされる。

Ndel1 ヘテロノックアウトマウス及び *Lis1/Ndel1* ダブルヘテロノックアウトマウスの大脳皮質において TUNEL アッセイを行いアポトーシスを起こしている細胞を検出した。

(4) NDEL1 の新たな結合分子の同定

我々は *Lis1*, *Ndel1*, 14-3-3 ε による細胞質ダイニンの活性制御機構について長年解析を行ってきた。そして両分子が結合して同じシグナル伝達経路において機能し、細胞質ダイニンの活性制御に関与していることは疑う余地がない。しかしながら、両分子のノックアウトマウスの解析をとおして、表現型の多くは共通しているが一部に差があることを明らかにした。このことは NDEL1 が LIS1 を介さないシグナル伝達にも関与していることを示唆している。そこで私は NDEL1 の新たな結合分子の同定を試みた結果、微小管の切断活性を有する Katanin p60 を同定した。リン酸化 NDEL1 が Katanin p60 と結合し、Katanin p60 の細胞内における局在を制御する事によって Katanin p60 の機能発現を制御していること、Katanin p60 が神経細胞の移動に重要であることを明らかにした (図 2)。



移動中の小脳顆粒神経細胞
(位相差顕微鏡)

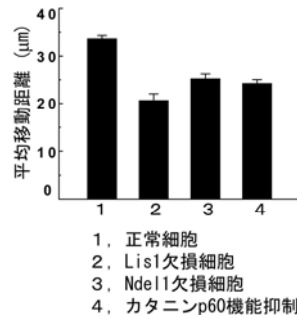


図2 Katanin p60は神経細胞の移動に重要である。

小脳顆粒神経細胞を用いて *in vitro* での神経細胞の Migration Assay を行った。Katanin p60 に対する RNAi を導入した細胞では有意に細胞の移動が抑制された。

3. 研究成果

細胞質ダイニン重鎖は 500kDa を越える巨大分子であるため精製やリコンビナント分子の作製が困難であり、活性を保持した GFP タグ付きのリコンビナント細胞質ダイニン重鎖の作成は報告されていなかった。そこで私は活性を持つリコンビナント細胞質ダイニン重鎖の精製を行った。その結果、活性を持つ GFP タグ付きの細胞質ダイニン重鎖の作成に成功した。このようにこれらの系は、これまで細胞内での詳細な機能が明らかになっていない細胞質ダイニンの機能及び Lis1, Ndel1, 14-3-3 ε による細胞質ダイニンの活性制御機構を *in vitro* 及び *in vivo* の系で解析可能にする。よってこれらの系は当該研究分野に新たな可能性をもたらすものである。

4. 今後の課題と発展

私が新たに作成した活性を保持したリコンビナント細胞質ダイニン重鎖は細胞への

導入効率が低く、今後は更に導入効率の改良が必要である。そうすれば今後細胞質ダイニンの更に詳細な *in vivo* での機能解明に貢献するものと考えられる。さらに細胞質ダイニンの活性を制御している LIS1、NDEL1 および 14-3-3ε 等の分子の機能を *in vitro* で解析するためにも有用である。これらの解析を通して長年不明であった細胞質ダイニンの機能解析は新たな局面へと前進できるものと考えられる。

5. 発表論文リスト

1. Recruitment of Katanin p60 by Phosphorylated NDEL1, an LIS1 interacting protein, is essential for mitotic cell division and neuronal Migration. Toyooka K., Sasaki S., Yano Y., Mori D., Kobayashi T., Toyoshima Y. Y., Tokuoka M. S., Ishii S., Shimizu T., Muramatsu M., Hiraiwa N., Yoshiki A., Wynshaw-Boris A. and Hirotsune S., Hum. Mol. Genet. 14:3113-3128, 2005.
2. Complete Loss of Ndel1 Results in Neuronal Migration Defects and Early Embryonic Lethality. Sasaki S., Mori D., Toyooka K., Chen A., Garrett-Beal L., Muramatsu M., Miyagawa S., Hiraiwa N., Yoshiki A., Wynshaw-Boris A. and Hirotsune S., Mol. Cell Biol. 25:7812-7827, 2005.