

# 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

自動車化が進んだ現代において交通事故の減少は我々にとって取り組まなければならない重要な課題である。車の運転は、「認知」、「判断・予測」、「操作」の繰り返しであるが、事故はこれらの手順のどこかでミスをするにより起こると考えられる。特に「認知」の段階でのミスが最も多く、運転手の過去の経験・記憶によって得られた基礎情報、つまり「思いこみ」は「認知ミス」の主な原因の一つである。本研究では「認知」と「記憶」に関わる脳の活動、特に大脳皮質と海馬における神経細胞の発生と活動について細胞レベル、分子レベルのみならず、個体レベルでの解析を行う。特に個体レベルの解析ではノックアウト(遺伝子破壊)マウスの系を用いて「認知」や「記憶」に関わる遺伝子の解明と神経細胞ネットワークの構築メカニズムを生体内で明らかにすることを目指す。

## Abstract

It is an important issue that we decrease a traffic accident. A drive consists of three continuous processes, "recognition", "judgment" and "operation". The mistake in these processes, especially recognition, causes a traffic accident. The information from past experiences and memories, this is, prejudice is a primary cause of mistakes in recognition process. The purpose of this study is to clarify the genes that contribute to recognition or memory process, and the construction mechanism of neuronal network in brain by using *in vitro* and *in vivo* techniques. These studies contribute to understanding of the mechanisms of recognition or memory process.

## 1. 研究目的

本研究の目的は認知と記憶のメカニズムを利用した人工知能・人工頭脳による危険回避システムの開発につながる神経細胞の活動とネットワーク構築機構の解析である。「認知」と「記憶」の場である大脳皮質および海馬の機能を分子レベル、細胞レベルさらには個体レベルで解明する。特に大脳皮質と海馬の神経回路の形成に異常がみられる *Lis1* および *14-3-3ε* ノックアウトマウスの解析により「認知」および「記憶」という神経細胞の活動のメカニズムを個体レベルで明らかにする。また、LIS1 および *14-3-3ε* と結合することが明にされている NUDEL(NDEL1)のノックアウトマウスを作成しその解析を行う。

## 2. 研究経過

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

私は細胞質ダイニン、LIS1 および *14-3-3ε* の相互作用解析を行うために新しい実験系の開発を試みた。「認知」や「記憶」を含むすべての脳の活動は千数億個にも及ぶ神経細胞の緻密なネットワークによるものである。細胞質ダイニンは膨大な脳の神経細胞がネットワークを構築する上で大変重要な役割を担っていることが明らかにされている。それ故、分子生物学的、細胞生物学的な側面から多くの研究がなされてきた。しかし、細胞質ダイニンは 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、細胞質ダイニンの詳細な機能解析の障害となっていた。よって細胞質ダイニン、LIS1 および *14-3-3ε* さら

には NUDEL の相互作用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試験管内で再現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。そして、作成したリコンビナントの細胞質ダイニンを用いて微小管上における滑走試験を行い、活性を持つ細胞質ダイニンの精製に成功した。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微小管上での滑走に重要な個々のドメインを分離して解析できる。そしてこの系を応用して LIS1, *14-3-3ε* さらには NUDEL 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。私は細胞質ダイニン・微小管の制御分子である NUDEL 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もちろんのこと、発現様式についても詳細な解析はなされていなかった。そこでタンパク質レベルでの発現様式を解析するためにPP4の各サブユニットに対する抗体を作成して各サブユニットの細胞内局在について解析を行った。興味深いことに活性を持つPP4cサブユニットは細胞周期における核膜崩壊直前に核膜にダイナミックに集積してくることを明らかにした。

### (3) NUDEL ノックアウトマウスの作成と解析

我々は LIS1 の結合分子として NUDEL を同定し、リン酸化 NUDEL が 14-3-3ε と結合することを明らかにした。さらに私は NUDEL 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機能解析、特に大脳皮質および海馬形成における機能について解析を行った。その結果、NUDEL ノックアウトマウスの大脳皮質および海馬では階層構造の形成異常が認められた。さらに LIS1 ノックアウトマウスとのダブルノックアウトマウスを作成することでその症状が重症になることを明らかにした(図1)。

### (4) NUDEL の LIS1 非依存性機能の解析

我々は LIS1 の結合分子として NUDEL を同定し、LIS1 および NUDEL の機能解析を行ってきた。両分子が結合し同じシグナル伝達経路において機能していることは間違いない。しかしながら、ノックアウトマウスの解析をとおして表現型に差があることが明らかになってきた。このことは NUDEL

が LIS1 以外の分子と結合し異なる機能を発揮していることを示唆している。そこで私は

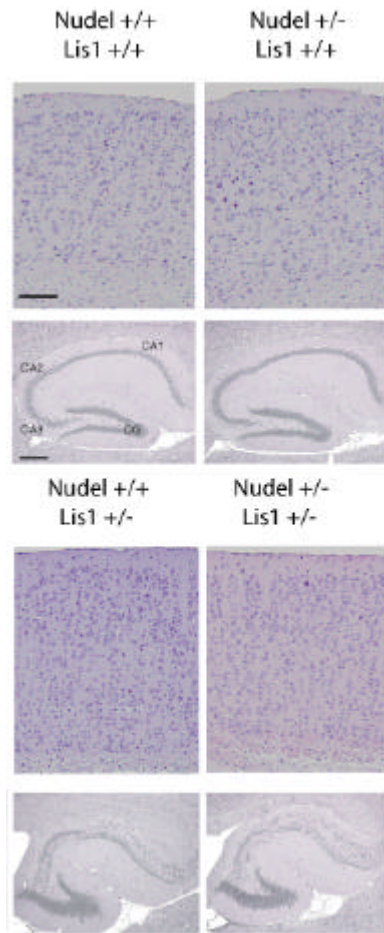


図1 NUDEL ノックアウトマウスおよび LIS1/NUDEL ダブルノックアウトマウスにおける大脳皮質および海馬の形成異常

NUDEL の新たな結合分子の同定を試みた結果、微小管の剪断活性を有する Katanin p60 を同定した。さらに、リン酸化 NUDEL 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を明らかにした(図2)。

### 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

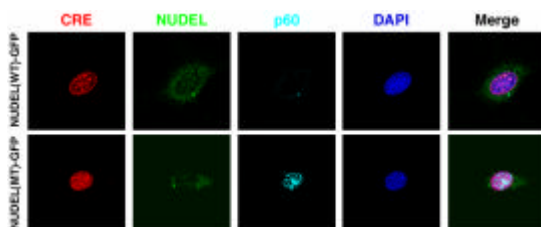


図2 NUDEL 欠損細胞における Katanin p60 の局在異常

*Nudel* ノックアウトマウスから調整した繊維芽細胞に RED-CRE を発現させ、*Cre-LoxP* の系を用いて NUDEL を欠損させた。その結果、Katanin p60 は核への異常な局在を示した。この表現型は正常な NUDEL(WT) - GFP の発現によって正常化した。NUDEL の Katanin p60 結合部位に変異を導入した NUDEL(MT) - GFP ではレスキューできなかった。

分子の作製が困難であり、活性を保持した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。しかし私は活性を持つリコンビナント細胞質ダイニン重鎖を昆虫細胞を用いて作成しその精製に成功した。そしてこのリコンビナント分子を用いて試験管内で細胞質ダイニンの活性を測定できる系を確立し、LIS1 が細胞質ダイニンの活性を負に制御していることを直接的に明らかにした。この結果はこれまで LIS1 は正の制御因子であると考えられていたことから非常に興味深く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今後細胞質ダイニン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、NUDEL および 14-3-3ε等の分子の機能を解析するために有用である。これらの解析を通して長年明らかにされなかった細胞質ダイニンの機能は飛躍的に解明されることにな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 is essential for Mitotic Cell Division and neuronal Migration. Toyo-oka K., Sasaki S., Yano Y., Kobayashi T., Toyoshima Y. Y., Tokuoka M. S., Ishii S., Shimizu T., Muramatsu M., Hiraiwa N., Yoshiki A., Wynshaw-Boris A. and Hirotsune S., Submitted
2. Disruption of Ndel1 Causes Neuronal Migration Defect and Early Embryonic Lethality. Sasaki S., Mori D., Toyo-oka K., Chen A., Garrett-Beal L., Muramatsu M., Hiraiwa N., Yoshiki A., Wynshaw-Boris A. and Hirotsune S., submitted