

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

神経前駆細胞の非対称分裂に関する分子装置の解析

### 2. 氏名

真田 佳門

### 3. 研究のねらい

大脳新皮質を構成する錐体神経細胞は神経前駆細胞から生み出される。神経前駆細胞は脳室を取り囲む領域(脳室帯)に存在し、大脳新皮質の発生の初期段階では、神経前駆細胞は対称分裂して自己増殖する。一方、発生が進むのに伴って、神経前駆細胞は非対称に分裂して神経細胞と神経前駆細胞という互いに異なる二つの細胞を生み出す。このようにして誕生した神経細胞はその後、脳表層側に移動して成熟する。一方、発生の後期においては、神経前駆細胞からアストロサイトなどのグリア細胞が誕生する。このように、神経前駆細胞の運命は発生時期に応じて厳密に規定されている。

従来の研究から、神経前駆細胞の運命決定に関するシグナリングとして、チロシンキナーゼ型受容体を介したシグナリングやサイトカイン受容体を介したシグナリングが良く研究されている。他方、G 蛋白質共役受容体(GPCR)は膜受容体の中で最大のファミリーを構成するが、GPCR を介したシグナリングが神経前駆細胞の運命決定に寄与するののかについては、全く謎に包まれていた。本研究では、神経前駆細胞の運命決定に寄与する新規情報伝達機序の発見を目指して、神経前駆細胞に発現する GPCR を探索し、その生理的役割を解析した。

また、神経新生・神経細胞移動・神経細胞成熟のいずれの過程にも、細胞の極性化が重要な役割を果たす。このような知見のもと、上述した GPCR の解析と並行して、進化的に良く保存されている極性分子である LKB1 キナーゼに着目し、大脳新皮質の形成における役割を解析した。

### 4. 研究成果

#### 研究の方法

発生期のマウス大脳新皮質における様々な分子の役割を調べるため、神経前駆細胞に shRNA を発現する RNAi プラスミドを電気細胞法により *in vivo* 導入し、目的分子の発現を抑制した。さらに、遺伝子導入された神経前駆細胞および神経細胞の性状を発生期の様々な時期に解析した。

#### 研究成果

##### (1)大脳新皮質の発生におけるLKB1 の役割解析

LKB1 は様々な細胞腫において極性形成に重要な役割を果たす Ser/Thr キナーゼである。発生期のマウス脳における LKB1 の発現を調べた結果、神経前駆細胞が存在する脳室帯、移動中の細胞が局在する中間帯、および成熟中の神経細胞が存在する皮質板に *Lkb1* 遺伝子の発現が認められた。そこで、LKB1 に対する shRNA 発現ベクターを構築し、神経前駆細胞において LKB1 をノックダウンした。その後、神経前駆細胞から誕生した神経細胞の分布を調べたところ、コントロール細胞の多くは脳表層側に移動するのに対して、ノックダウン細胞の多くは中間体に蓄積していた。このことから、LKB1 は神経細胞移動に必要な不可欠であることが明らかになった。移動中の神経細胞は、移動方向に短い先導突起を持ち、その根元に中心体が局在する。移動する際は、先導突起が進行方向に伸長すると共に中心体が前方に移動し、その後、核が中心体の方向に移動することが知られている(図1)。従来の研究から、この中心体と核との協調動作が神経細胞の移動に重要であることが知られていた。驚いたことに、LKB1 を発現抑制した神経細胞では、中心体の配置が異常を呈していた。このことから LKB1 は、中心体の

配置を制御することによって、神経細胞移動に大きく寄与していると推察できた(Asada et al., J. Neurosci. 2007)。

さらに、移動中の神経細胞における LKB1 の下流シグナリングを探索した。その結果、LKB1 は GSK3 $\beta$  の Ser9 のリン酸化を担い、GSK3 $\beta$  の不活性化に寄与することを見出した。興味深いことに、Ser9 リン酸化型の GSK3 $\beta$  は先導突起の先端に濃縮して存在し、Ser9 がリン酸化されない GSK3 $\beta$  変異体を移動中の神経細胞に発現すると、中心体の移動が顕著に停滞した。このことから、LKB1 は GSK3 $\beta$  のリン酸化および不活性化を介して、中心体の移動および神経細胞の移動に貢献していることが示唆された。また、GSK3 $\beta$  の標的分子を精査したところ、GSK3 $\beta$  の Ser9 リン酸化の阻害に伴って、(1)APC が微小管のプラス端から解離すること、さらに(2)先導突起内の微小管が不安定化すること、を見出した。APC は微小管のプラス端と結合して微小管の膜アンカーおよび安定化に寄与すること、さらに GSK3 $\beta$  によってリン酸化されるとプラス端に結合できなくなることが知られている。このことから、先導突起において、(1)GSK3 $\beta$  が LKB1 によってリン酸化されて不活性化し、(2)その結果として APC が微小管プラス端に結合でき、さらに(3) APC を介して微小管が膜にアンカーして安定化する、というモデルが得られた。加えて、これら一連の過程が中心体の移動に必須であることから、微小管が膜にアンカーすることによって進行方向に引っ張られていると推察できた(図2参照、Asada & Sanada 投稿中)。

次に、神経細胞の成熟における LKB1 の役割を解析した。成熟過程にある神経細胞は皮質板に位置し、脳膜側に太い樹状突起を伸ばすと同時に、脳室側に細く長い軸索を伸ばす。興味深いことに、LKB1 に対する shRNA を導入した場合、多くの細胞が逆転した配向を呈し、脳室側に樹状突起を形成していた。さらに、中心体の位置を精査すると、逆転した配向を持つ神経細胞では、核に対して通常とは反対の位置に中心体が配置していた。これらの結果から、LKB1 は、中心体を適切な位置に配置することによって、樹状突起・軸索の形成方向を制御していることが示唆された(Asada et al., J. Neurosci. 2007)。

以上の解析から LKB1 は、中心体の局在やダイナミクスを空間的に制御することによって、神経細胞の移動および成熟に寄与すると考えられた。本研究は、微小管や中心体の方向性を持った制御に LKB1 が大きく寄与することを明らかにしたのと同時に、神経細胞の移動・成熟において中心体の位置制御が重要な鍵となるイベントであることを示している。これらの知見は、神経系の構築メカニズムを理解するうえで極めて重要な知見であると考えられた。

## (2) 神経前駆細胞の運命決定におけるオーファンGPCRの役割解析

神経前駆細胞の運命決定に関与する新規情報伝達機序に迫るため、リガンド未知の GPCR (オーファン GPCR) に焦点を絞り、神経前駆細胞に発現する受容体の探索およびその役割を解析した。神経前駆細胞に発現するオーファン GPCR を探索するため、マウス胎児の脳新皮質由来の cDNA を用いた PCR およびマウス胎児の脳切片を用いた in situ ハイブリダイゼーションを実施した。その結果、神経前駆細胞に特異的に発現するオーファン G 蛋白質共役受容体

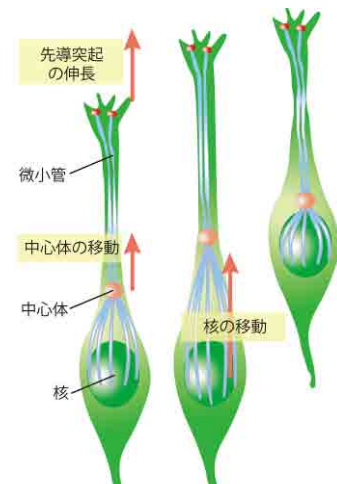


図1 神経細胞移動に伴うイベント



図2 LKB1 シグナリングの役割モデル

( $\alpha$ GPCR)を発見した。この分子の発生期前脳における発現パターンを詳細に解析した結果、神経前駆細胞の脳室壁に面した領域に強い発現が観察できた。そこで、生体内での役割を調べるため、この分子に対するshRNAを作製した。胎生13日目のマウス大脳新皮質にshRNAをin vivo 導入してノックダウンした結果、神経前駆細胞が減少すると同時に、神経細胞への分化過程にある細胞が顕著に減少していた(胎生15日目に観察)。このことから、神経前駆細胞が神経細胞へと分化する際に、このG蛋白質共役受容体を介したシグナリングが重要な役割を果たしていることが判明した。

さらに、これらノックダウン細胞の運命を様々な発生時期において精査した。胎生14日目の神経前駆細胞にRNAiを導入して、18日目にそれら細胞の運命を解析したところ、コントロール前駆細胞の大部分は神経細胞に分化しているのに対して、RNAiが導入された細胞は神経細胞ではなかった。さらに、出生後4日目で調べたところ、約半数のノックダウン細胞がMusashi1(アストロサイト前駆細胞のマーカー)を発現しており、さらに出生後14日目で調べると、多くの細胞がS100およびGFAP(いずれもアストロサイトのマーカー分子)を発現するようになった(図3)。以上の解析から、神経前駆細胞において、G蛋白質共役受容体を介したシグナリングが神経細胞への分化に重要な役割を果たしていること、さらに、アストロサイトへの分化を抑制している可能性が考えられた。

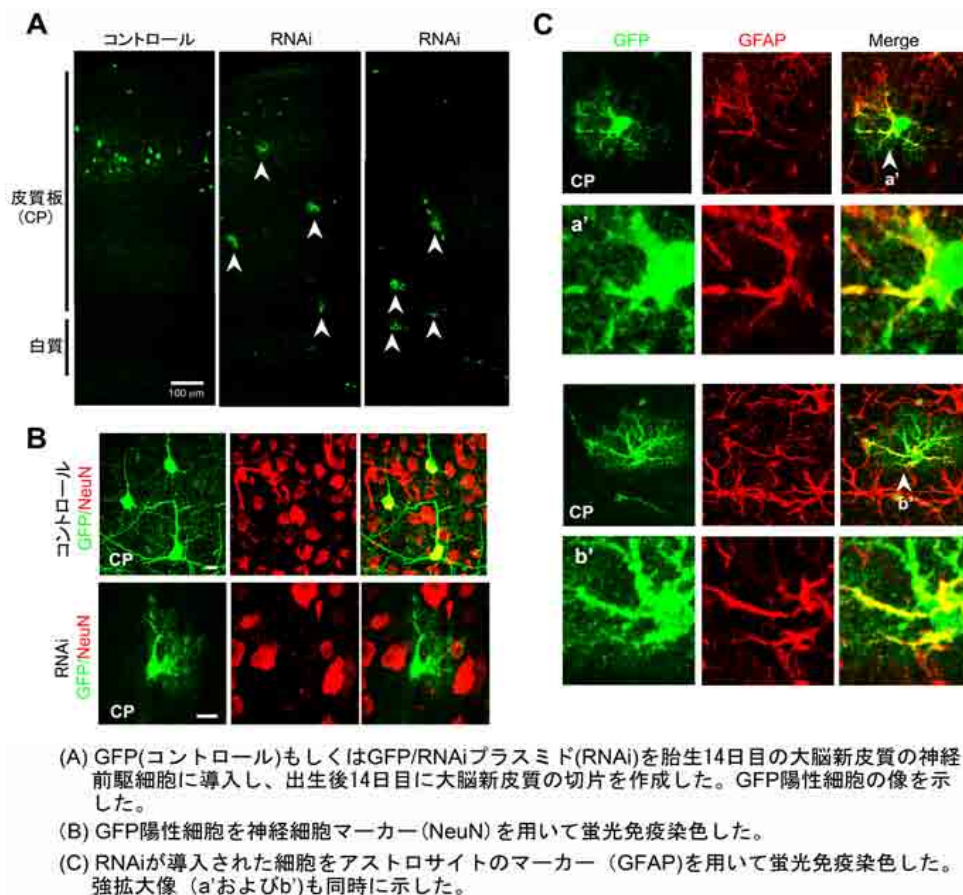


図3  $\alpha$ GPCR ノックダウン細胞の運命

一般的に、三量体G蛋白質 $\alpha$ サブユニットは $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_q$ 、および $G\alpha_{12/13}$ のサブタイプに大別できる。この $\alpha$ GPCRと共役する三量体G蛋白質 $\alpha$ サブユニットを精査したところ、 $G\alpha_{12/13}$ タイプとカップルする可能性が示唆できた。 $G\alpha_{12/13}$ のC末端断片を細胞内に過剰発現すると、GPCRから $G\alpha_{12/13}$ へのシグナリングが阻害できることが知られる。この知見をもとに、神経前駆細胞に $G\alpha_{12/13}$ のC末端断片をin vivo導入した結果、遺伝子導入された細胞の多くは、

神経細胞へと分化することなく、その代わりにMusashi-1陽性であった。このことから、神経細胞の系譜からアストロサイトの系譜へと運命が変化していることが判明した。

本研究により、神経前駆細胞の運命決定にG蛋白質共役受容体シグナリングが関与するという、極めて重要かつ新規性の高い現象を見出すことができた。このことは、神経前駆細胞の運命決定に関与する複雑な分子基盤を考える上で新たな一歩となりえる。現在、神経系の疾患や損傷に対する治療法として神経再生治療が注目されている。本研究で得られた知見は、神経幹細胞を神経細胞へと人為的に分化させる際にG蛋白質共役受容体のリガンドが使用できる可能性を示唆するものであり、新たな治療戦略の確立に寄与する可能性がある。

## 5. 自己評価

『GPCRが神経前駆細胞の運命決定に寄与するのではないか』というきわめてチャレンジングな作業仮説をもとに、本研究をスタートした。本研究によって、GPCRを介したシグナリングが神経前駆細胞の神経分化に必要であることを明らかにすることができ、当初の目的はおおむね達成できた。その一方で、GPCRの作用機構、内因性リガンド、さらに発生時期に応じた制御機構など、解決すべき新たな課題が残された。

また、移動中の神経細胞では、核移動に先行して中心体が進行方向に移動する。この中心体の移動に関する分子機構は長らく不明であった。本研究により、LKB1を介したシグナリングが先導突起内で活性化され、微小管の制御を介して中心体を引っ張り上げるというモデルを提唱できた。また、*in vivo*において成熟中の神経細胞の極性をLKB1がコントロールしていることを明らかにした。これらの知見は世界に先駆ける成果であり、神経細胞の移動および成熟に関するLKB1の役割解析という目的は十分に達成できた。本研究から、LKB1は神経前駆細胞にも発現していることが判明しており、神経前駆細胞においても何らかの役割を果たしていると考えられる。大脳新皮質の発生におけるLKB1の生理的役割を考える上で、この点を明らかにすることは大きな課題として残された。

## 6. 研究総括の見解

GPCRを介したシグナリングが神経前駆細胞の神経分化に必要であることを明らかにしたことは、評価できる。また、移動中の神経細胞では、核移動に先行して中心体が進行方向に移動するが、この中心体の移動に関する分子機構に関して、LKB1を介したシグナリングが先導突起内で活性化され、微小管の制御を介して中心体を引っ張り上げるというモデルを提唱するなど新しい分野を切り開いており、今後の展開が楽しみである。

## 7. 主な論文等

### 【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

#### ①論文

1. Tamai S., Sanada K.\*, & Fukada Y.\* Time-of-day-dependent enhancement of adult neurogenesis in the hippocampus. *PLoS One* 3, e3835. (2009). \*corresponding authors.
2. Asada N., Sanada K.\*, & Fukada Y.\* (2007) LKB1 regulates neuronal migration and neuronal differentiation in the developing neocortex through centrosomal positioning. *J. Neurosci.* 27, 11769–75. \*corresponding authors.

#### ②総説

1. 眞田佳門 (2008). 神経前駆細胞の増殖と分化のコントロール ～細胞分裂軸の制御と非対称分裂～ *脳21* Vol.11, No.4 105–110.

#### ③学会発表等

1. 眞田佳門 「成体脳の海馬におけるニューロン新生の日内変動」 頭部形成研究会 2008、

阿蘇、2008年4月15日

2. 眞田佳門「大脳新皮質における神経細胞の移動および分化におけるLKB1の役割」日本発生生物学会 秋季シンポジウム、岡崎、2007年11月6日

3. 浅田直行、眞田佳門、深田吉孝「大脳新皮質の発生過程でLKB1は神経細胞移動と分化を制御する」第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、横浜、2007年12月11日

4. 玉井総一、眞田佳門、深田吉孝「海馬の神経新生部位における神経幹細胞の分裂の日内制御」第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、横浜、2007年12月11日

5. Sanada K. : Control of Neuronal Progenitor Differentiation by Heterotrimeric G-proteins in the Developing Neocortex. The 5<sup>th</sup> Catholic International Stem Cell Symposium: Cutting Edges & Workshop, Seoul, South Korea, July. 13, 2007

【B. 本研究課題に関連した成果で主なもの】

①論文

1. Kurabayashi N., Hirota T., Sakai M., Sanada K., & Fukada Y. DYRK1A and GSK-3 $\beta$ : A dual kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping. (in press)

2. B: Shim S.Y., Wang J., Asada N., Neumayer G., Tran H.C., Ishiguro K., Sanada K., Nakatani Y., & Nguyen M.D. (2008) Protein P600 is a microtubule/endoplasmic reticulum-associated protein in CNS neurons. J. Neurosci. 28, 3604–14.

3. Xie Z, Moy LY, Sanada K, Zhou Y, Buchman JJ, & Tsai LH. (2007) Cep120 and TACCs control interkinetic nuclear migration and the neural progenitor pool. Neuron 4, 79–93.