福井大学リポジトリ
UNIVERSITY OF FUKUI REPOSITORY

Studies on novel mechanism of proteins that relate to migration and proliferation of neuronal cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2013-01-17 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 八木, 秀司, YAGI, Hideshi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/7106

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年５月３１日現在

機関番号：13401
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2008～2010
課題番号：２０５００３０７
研究課題名（和文）　神経発生時の細胞増殖・細胞移動に関わる分子の蛋白分解による機能発現調節機構の探究
研究課題名（英文）　Studies on novel mechanism of proteins that relate to migration and proliferation of neuronal cells
研究代表者
八木　秀司（YAGI HIDESHI）
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：１０３０３３７２

研究成果の概要（和文）：中枢神経系の発生において神経細胞の移動と増殖に関与すると考えられた Filip 分子と Filip 相同分子の機能解析を通じ、神経発生における新たな調節系を明らかにすることを目的として本研究を行った。その結果、細胞骨格関連分子が Filip 分子と Filip 相同分子に結合することを見いだした。この結合を通じて Filip 分子が結合分子の機能を調節していることを見いだし、神経細胞における Filip 分子の新たな機能を同定した。

研究成果の概要（英文）：Filip and Filip homologous proteins relate to migration and proliferation of neuronal cells. Analysis on the function of Filip and Filip homologous proteins revealed that one of cytoskeletal proteins binds to Filip and Filip homologous protein. We elucidated that Filip controls intracellular distribution of the cytoskeletal protein and identified a novel function of Filip in neuron.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００８年度	1,500,000	450,000	1,950,000
２００９年度	900,000	270,000	1,170,000
２０１０年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総　計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域
科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学･神経病理学
キーワード：神経発生・分化・異常

１．研究開始当初の背景

(1) 神経細胞の発生過程では、初期には神経上皮内で神経幹細胞が増殖する細胞分裂が盛んである。その後、神経幹細胞は不等分裂を行い、一つの娘細胞は幹細胞としての機能を残し、もう一つの娘細胞は、脳室帯を離れ、軟膜側に移動し、神経細胞へと分化していく。この過程では、細胞増殖、分化と細胞移動が調節され、形態形成が行われる。大脳では細胞移動に関しては、脳室帯から中間帯への移動、中間帯での細胞の一時的な停止、さらに radial glia の線維に沿った移動という複雑な過程を経ている（LoTurco and Bai. Trends Neurosci 29, 407)。また、細胞分裂は脳室帯に限らず、他の層でも認められている（Miyata et al. Development 131, 3133; Wu

et al. Proc Natl Acad Sci USA 102, 17172)。この様に中枢神経系の発達は、細胞移動と細胞分裂が空間的時間的に調節され行われている。一方、N-end rule による蛋白分解に関わる E3 ubiquitin ligase の UBR1、UBR2 を欠損したマウスでは、細胞増殖が異所性に認められ、細胞増殖の制御が乱れていることが示された (An et al. Proc Natl Acad USA 103, 6212)。また、神経前駆細胞等で認められる不等分裂において重要な役割を果たす、NotchによるNumblikeの蛋白抑制は蛋白分解により行われていることが報告された (Chapman et al. J Cell Biol 175, 535)。これらは蛋白分解が神経系の発達に重要な役割を果たしていることを示している。

Filip 分子は FilaminA と結合し、FilaminA の calpain による分解を促進し、神経細胞の移動を抑制する分子として、当教室永野らが明らかにした分子である (Nagano et al. Nat Cell Biol 4, 495)。Filip 分子は、FilaminA の分解を通じ、その細胞移動調節を行っている。FilaminA は転写因子や受容体を含め 20 種以上の分子と結合する多機能な分子である (Popowics et al. Trends Biochem Sci 31, 411)。また、FilaminA はアクチン線維の制御に重要な役割を果たしていることが報告されている。さらにアクチン線維は細胞の形態に関わっており、細胞移動や細胞分裂にも機能を果たしている。この多機能な Filamin を分解する場合、厳密な調節系が存在することが予想される。

今回、我々は、Filip 分子とアミノ酸配列にて約 50%の相同性を有する分子を見いだした。この相同分子は卵巣癌細胞で mRNA の発現量が減少している分子として同定された。さらに、サイトカインの一種 EMAP-Ⅱ (endothelial monocyte-activating polypeptide II)の増殖抑制効果は、この分子を介して発揮されていると報告されている (Tandle et al. Cytokine 30, 347)。この相同分子の機能より類推すると Filip 分子は細胞移動のみならず細胞増殖制御に働いている可能性がある。

２．研究の目的

(1) 神経細胞の移動と増殖の両方に関与すると考えられる Filip 分子と Filip 相同分子の機能解析を通じて、神経系の発生する段階における新たな細胞増殖・移動の調節系を明らかにすることを目的とする。当教室では、Filip 分子は Filamin の分解を通じて、神経細胞の移動の制御を行っていることを明らかにしてきた。我々は Filip 相同分子も神経細胞の移動に関わる可能性を見いだしており、また Filip 相同分子は分解の早い分子であることを見いだした。そこで、Filip 相同分子および Filip 分子の分解の制御により神経細胞の発生および移動が制御されている可能性を考え、この機構を明らかにすることを目的とする。

(2) Filip 分子および Filip 相同分子に対する新規結合分子を同定し、その分子に対する FILIP 分子及びその相同分子が与える影響の検討を行う。この影響により、生体内に生じる変化を検討し、FILIP 分子および FILIP 相同分子の機能を明らかにすることを目的とする。

３．研究の方法

(1) 神経上皮内における Filip 相同分子の発現部位の検討

in situ hybridization 法を用いて、Filip 分子と Filip 相同分子の mRNA 発現部位を比較検討する。それぞれに対する抗体を作製し、発現部位の検討を行う。

(2) Filip 相同分子、Filip 分子のドメイン構造の決定及び結合する分子の探索と解析

Filip 分子及び Filip 相同分子の各ドメインを発現するベクターを作製し、免役沈降法を用いて、結合分子の検索を行う。

変異 Filip 分子の発現ベクターを作製後、COS 細胞に導入し、結合分子の分解、他の分子に与える影響に関して検討する。

(3) Filip 相同分子、Filip 分子の生体内での機能の解明

Filip 相同分子に対する shRNA 発現ベクターをマウス胎仔脳室帯の細胞に電気穿孔法を用いて導入し、Filip 相同分子の発現量を低下させ、その細胞移動への影響を確認する。

Filip 分子の強制発現ベクターをマウス胎仔脳室より脳室帯の細胞に電気穿孔法により導入し、細胞数の変化を検討する。

Filip 遺伝子欠損マウスを利用し、Filip 分子の生体内での機能を検討する。また、Filip 分子、Filip 相同分子と結合する分子の機能に関し、Filip 遺伝子欠損マウス内で検討する。

４．研究成果

(1) Filip 発現部位の検討

Filip 分子の発現は胎生期のみならず、成体の脳に発現していることを見いだした。特に終脳の腹側部位に強く発現しており、その部位での神経系の機能に強く関わっている可能性を見いだした。脳以外の部位では心臓などに発現していることを見いだした。また Filip 相同分子は嗅球および嗅覚伝導路に関わる部位に発現していることを見いだした。

(2) Filip 分子及び Filip 相同分子のドメイン構造解析と Filip 分子と結合する新規分子の探索

Filip 分子には二量体を形成するために必

要な部位が存在し、生体内では二量体として働いていることが示唆された。
Filip 分子および Filip 相同分子と結合する新規分子を免疫沈降法及び質量分析法を用いて探索した。その結果、シャペロン分子の一分子及び、細胞骨格を形成するアクチン線維に結合するミオシンの一つの分子を Filip 分子および Filip 相同分子と結合する分子として同定した。

シャペロン分子との結合部位を Filip 分子の変異分子を用いて、免疫沈降法により検討した結果、Filip 分子の C 端側に存在することが認められた。

Filip 分子および Filip 相同分子とこのミオシン分子と Filip 分子および Filip 相同分子の結合部位を免疫沈降法により探索した。各種 Filip 分子の断片を強制発現するベクターを COS-7 細胞に導入し、内在性のミオシン分子が免疫沈降法で共沈するか検討した。その結果、Filip 分子ではドメインとしての報告のない部位がこの結合に重要であることを明らかにした。また、このミオシン分子の変異分子を COS-7 細胞に発現させ、免疫沈降法で Filip 分子および Filip 相同分子との結合を検討した結果、Filip 分子および Filip 相同分子ともに、このミオシン分子の N 端側に結合する可能性が高いことを見いだした。

また、各ドメインを欠損した Filip 変異分子を培養細胞中に発現した場合における細胞骨格に及ぼす影響を評価した。Filip 分子を培養細胞中に強制発現した場合、細胞骨格が短くなり、一般の培養細胞で認められる細胞骨格の形態とは異なることが判明した。しかし、二量体に関与する部位を欠損した Filip 変異分子を強制発現させた細胞では，この細胞骨格に対する作用が弱くなっていることが判明した。

(3) Filip 分子が結合分子に与える影響の検討

Filip 分子と、ミオシン分子の関係を検討するため、Filip 分子を培養細胞中に発現させた場合のミオシン分子の細胞内分布について検討した。その結果、ミオシン分子は線維状の分布を取らなくなることを見いだした。このミオシン分子と結合する部位を欠損した Filip 分子を発現した場合、細胞骨格に与える Filip 分子の影響が減弱していることを明らかにし、結合が機能に重要であることを示し、Filip 分子がこの結合蛋白質の局在の調節に関わる可能性を見いだした。

Filip 相同分子と Filip 分子に結合する分子に対する shRNA を発現するベクターを作製し、その分子を抑制したときの神経細胞移動に対する影響を検討した。Filip 相同分子と Filip 分子に結合するシャペロンに関与する分子に対する shRNA は、細胞移動に対しては明らかな影響を認めなかったが、上記のミオシンの一分子に対する shRNA では細胞移動の抑制が生じた。

(4) Filip 分子および Filip 相同分子が生体に与える影響の評価

Filip 相同分子に対する shRNA を子宮内電気穿孔法によりマウス胎仔脳室帯の細胞に導入し、神経細胞の移動に対する影響を検討したが、明白な結果を得ることができなかった。また、Filip 分子の強制発現では、Filip 分子の分解が速やかであり、蛋白として Filip 分子を生体内で発現し続けている細胞は少ないことが判明した。

Filip 分子と結合するミオシン分子は、神経細胞の樹状突起のシナプス形成部位である棘突起の形態に関わっていることが報告されている。初代培養神経細胞に Filip 分子を発現し、細胞の形態を観察した結果、コントロールの細胞と比較し棘突起の形態が変化していることを見いだした。この結果より Filip 分子がミオシン分子の機能を調節し、神経細胞の棘突起の形態に関わることを示すことができた。また、大脳皮質の形成では、胎生 14 日に子宮内電気穿孔法で蛍光タンパク質 GFP を導入した脳室帯由来の細胞の分布を生後 21 日目に検討したところ、Filip 遺伝子欠損マウスとそのコントロールマウスの間に差を認めた。以上より、本研究により Filip 分子が中枢神経系で果たす機能の重要性を明らかにできた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計５件）

① Takabayashi, T., Xie, M.-J., Takeuchi, S., Kawasaki, M., Yagi, H., Okamoto, M., Tariqur, R.M., Malik, F., Kuroda, K., Kubota, C., Fujieda, S., Nagano, T. and Sato, M. LL5β directs the translocation of Filamin A and SHIP2 to sites of PtdIns(3,4,5)P3 accumulation and PtdIns(3,4,5)P3 localization is mutually modified by co-recruited SHIP2. ***J. Biol. Chem.*** 285(21):16155-16165 (2010) (査読有).

② Yagi, H., Noguchi, Y., Kitamura, K. and Sato, M. Deficiency of Vlgr1 resulted in deafness and susceptibility to audiogenic seizures while the degree of hearing impairment was not correlated with seizure severity in C57BL/6- and 129-backcrossed lines of Vlgr1 knockout mice, ***Neurosci Lett.*** 18; 461(2): 190-195. (2009) (査読有).

③ 八木秀司, 佐藤　真. 神経細胞移動の制御とその異常 (Control of neural cell

migration during the development of the central nervous system), ***Brain Nerve.*** 60(4):383-94. (2008) (査読有).

④ Hisahara, M., Chiba, S., Matsumoto, H., Tanno, M., Yagi, H., Shimohara, S., Sato, M., and Horio, Y. Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. ***Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).*** 105(40): 15599-15604. (2008) (査読有).

⑤ Ando, K., Yagi, H., Suda, Y., Aizawa, S., Sakashita, M., Nagano, T., Terashima, T. and Sato, M. Establishment of framework of the cortical area is influenced by Otx1. ***Neurosci. Res.*** 60(4):457-459. (2008) (査読有).

〔学会発表〕（計１５件）

① 八木秀司, 謝　敏カク, 池田　弘, 駒田致和, 猪口徳一, 黒田一樹, 岡部　勝, 佐藤　真：FILIP の新たな側面：FILIP 欠損による梨状葉神経細胞棘突起の形態変化．第 116 回日本解剖学会全国学術集会・ 第 88 回日本生理学会大会, 2011 年 3 月 30 日, 誌上開催

② 謝　敏カク, 黒田一樹, 八木秀司, 駒田致和, 猪口徳一, 佐藤　真：大脳皮質形成期の法線方向移動における神経細胞の多極性から双極性への形態変化に成長円錐が重要である．第 116 回日本解剖学会全国学術集会・ 第 88 回日本生理学会大会, 2011 年 3 月 30 日, 誌上開催

③ Urano, T., Yagi, H., Sato, M., Ouchi, Y. and Inoue, S. Large Scale Human SNP Analysis Revealed an Association of GPR98 Gene Polymorphisms with Bone Mineral Density in Postmenopausal Women and Gpr98 Deficient Mice Display Osteopenia. ASBMR 2010 Annual Meeting, 2010 年 10 月 18 日, Toronto(Canada)

④ 浦野友彦、白木正孝、八木秀司、佐藤　真、大内尉義、井上聡：SNP アレイを用いた骨量との関連解析-ヒトゲノム、マウスモデル、ならびに発現解析を用いた骨粗鬆症疾患関連遺伝子の同定．第 12 回日本骨粗鬆症学会, 2010 年 10 月 18 日, 大阪

⑤ 猪口徳一，黒田一樹，謝　敏カク，八木秀司，佐藤　真：誘導型遺伝子発現系を利用した神経回路形成におけるアミロイド前駆体たんぱく質の機能解析．Neuro2010, 2010 年 9 月 4 日，神戸.

⑥ 謝　敏カク，猪口徳一，八木秀司，白尾智明，佐藤　真：LL5β は樹状突起スパインの形成及び成熟を制御する．Neuro2010, 2010 年 9 月 3 日,神戸.

⑦ 八木秀司，謝　敏カク，猪口徳一，黒田一樹，佐藤　真：胎仔期神経発生におけるアクチン繊維の可視化．第 115 回日本解剖学会・全国学術集会, 2010 年 3 月 30 日，岩手.

⑧ 猪口徳一，黒田一樹，謝　敏カク，八木秀司，佐藤　真：大脳皮質形成関連因子の神経回路形成における機能解析～トランスポゾンによる染色体遺伝子導入と遺伝子発現誘導系を用いたアプローチ～．第 115 回日本解剖学会・全国学術集会, 2010 年 3 月 28 日，岩手.

⑨ Xie, M-J., Yagi, H., Iguchi, T. and Sato, M. : Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate associated factor LL5βregulates morphology and maturation of dendritic spines.大阪大学ｸﾞﾛｰﾊﾞﾙ COE ﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑ"System Dynamics of Biological Fuction", 2009 年 10 月 8 日，淡路島.

⑩ 謝　敏カク，八木秀司，佐藤　真：大脳皮質形成の神経細胞移動において Abi2 は WAVE-Arp2/3 を介して重要な役割を担う． シンポジウム「何がどのように細胞移動と軸索ガイダンスを制御するのか」第 52 回日本神経化学会, 2009 年 6 月 23 日，伊香保.

⑪ 八木秀司，謝　敏カク，佐藤　真：FILIP(Filamin A-Interacting Protein)分子と相互作用する分子の検索．第 114 回日本解剖学会・全国学術集会，2009 年 3 月 30 日，岡山.

⑫ 謝　敏カク，高林哲司，岡本昌之，八木秀司，佐藤　真：脂質の細胞内時空間調節に関わる分子群による細胞移動制御と大脳皮質構築．シンポジウム「脳の形態形成の制御機構」第 114 回日本解剖学会・全国学術集会，2009 年 3 月 28 日，岡山.

⑬ 八木秀司，池田　弘，山崎信幸，宮川剛，岡部　勝，謝　敏カク，佐藤　真：ＦＩＬＩＰ欠損による大脳皮質の異常と行動異常の検討．第 51 回日本神経化学会大会，2008 年 9 月 13 日，富山.

⑭ 謝　敏カク，八木秀司，岡本昌之，佐藤　真：Ａｂｉ2 は非筋肉性ミオシンⅡ型の相互作用によってラディアルマイグレーションを制御する．第 51 回日本神経化学会大会，2008 年 9 月 12 日，富山.

⑮ 八木秀司，池田　弘，山崎伸幸，宮川剛，岡部　勝，謝　敏カク，佐藤　真：FILIP 遺伝子欠損マウスは大脳皮質の異常が示唆される． Neuroscisence2008（第 31 回日本神経科学大会），2008 年 7 月 11 日，東京.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.med.u-fukui.ac.jp/KAIBOU2/

６．研究組織

(1)研究代表者

八木　秀司（YAGI HIDESHI）
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：１０３０３３７２

(2)研究分担者

謝　敏カク（XIE MIN-JUE）
福井大学・医学部・助教
研究者番号：４０４４４２１０

(3)連携研究者

佐藤　真（SATO MAKOTO）
福井大学・医学部・教授
研究者番号：１０２２２０１９