慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	神経突起形成における細胞核の局在制御の意義とその分子機構の解明
Sub Title	Analysis of the importance and mechanisms of the nuclear positioning during neuritogenesis
Author	桑子, 賢一郎(Kuwako, Kenichiro)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	小脳プルキン工細胞では樹状突起形成期に一時的に細胞核の局在が偏在化すること, そしてリン酸化酵素LKB1がこの核の局在制御を担っていることを明らかにした。次に, 神経突起形成におけるLKB1の機能を解析したところ, 正常プルキン工細胞では自身の樹状突起は互いにほとんど重ならないが, LKB1欠失プルキン工細胞では樹状突起の交差が顕著に増加し, その空間配置に明らかな異常が起こることを見いだした。さらに, 樹状突起形成に関わるLKB1の下流リン酸化酵素経路も同定した。本研究により, LKB1を介した樹状突起形成機構が明らかになり, また核の局在制御と樹状突起形成との関連が示唆された。 The LKB1 kinase was identified as a critical regulator of the nuclear localization of cerebellar Purkinje cells during neuritogenesis. Further analysis also uncovered that LKB1 was activated in developing Purkinje cells, and Purkinje cell-specific deletion of LKB1 severely disrupted the self-avoidance of Purkinje cell dendrites without affecting gross morphology. Through combinatorial analysis, the LKB1 downstream pathway that establishes the spatial configuration of Purkinje cell dendrites was determined. Together, this study indicates a possible link between the nuclear positioning and the dendrite morphogenesis.
Notes	研究種目：挑戦的萌芽研究 研究期間：2016～2017 課題番号：16K14581 研究分野：神経発生
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K14581seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月 １９ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2016～2017
課題番号：１６Ｋ１４５８１

研究課題名（和文）神経突起形成における細胞核の局在制御の意義とその分子機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the importance and mechanisms of the nuclear positioning during neuritogenesis

研究代表者
桑子　賢一郎（Kuwako, Ken-ichiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・訪問研究員

研究者番号：３０４６８４７５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：小脳プルキンエ細胞では樹状突起形成期に一時的に細胞核の局在が偏在化すること、そしてリン酸化酵素LKB1がこの核の局在制御を担っていることを明らかにした。次に、神経突起形成におけるLKB1の機能を解析したところ、正常プルキンエ細胞では自身の樹状突起は互いにほとんど重ならないが、LKB1欠失プルキンエ細胞では樹状突起の交差が顕著に増加し、その空間配置に明らかな異常が起こることを見いだした。さらに、樹状突起形成に関わるLKB1の下流リン酸化酵素経路も同定した。本研究により、LKB1を介した樹状突起形成機構が明らかになり、また核の局在制御と樹状突起形成との関連が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The LKB1 kinase was identified as a critical regulator of the nuclear localization of cerebellar Purkinje cells during neuritogenesis. Further analysis also uncovered that LKB1 was activated in developing Purkinje cells, and Purkinje cell-specific deletion of LKB1 severely disrupted the self-avoidance of Purkinje cell dendrites without affecting gross morphology. Through combinatorial analysis, the LKB1 downstream pathway that establishes the spatial configuration of Purkinje cell dendrites was determined. Together, this study indicates a possible link between the nuclear positioning and the dendrite morphogenesis.

研究分野：神経発生

キーワード：神経細胞　核　樹状突起

１．研究開始当初の背景

多様な脳機能を生み出す精巧な神経回路網は、特定の神経細胞間の軸索と樹状突起が厳密な発生プログラムにしたがって極めて正確に接続することで構築される。正確な回路接続が完成するまでには多くのステップが関わっているが、なかでも神経細胞の入力装置である樹状突起の正しい形態形成は非常に重要なステップの一つである。多くの神経細胞の樹状突起は細胞タイプごとにあらかじめ決められた固有の形態を示し、その形態は標的軸索と正しい領域、つまり特定の細胞層や神経核内で正確に接続するために極めて重要となる。しかし、樹状突起の形態を制御する分子機構は未だに一部しか解明されていない。

一方、一般的な細胞の模式図では核は細胞体の中心に描かれることが多いが、実際には細胞内の特定の場所に偏った核を持つ細胞や特定の状況下で核が細胞内を大きく移動する細胞が多数存在している。しかし、細胞核の位置がどのように制御され、またそれがどのような意義をもっているのかについては最近までほとんど解明されていなかった。神経系では、神経前駆細胞の核のエレベーター運動や細胞移動などにおける非常に動的な核の運動制御が古くから注目されて多くの研究が進められてきており、最近ではこれらの現象において核膜蛋白質複合体が重要な働きを持つことも明らかにされている。その一方で、分化や移動を終えた発生期神経細胞や成体脳の成熟神経細胞における核の位置はこれまであまり注目されてこなかった。

本研究代表者は、樹状突起の形態制御機構を探る過程で、小脳皮質内に到達したすべてのプルキンエ細胞の核がその後の樹状突起形成期になってから非常にダイナミックに局在を変化させ、結果として少なくとも細胞内小器官の極性が大きく変動することを見いだした。このことは、このステージのプルキンエ細胞で核の位置を積極的に制御する発生プログラムとその何らかの意義が存在している可能性を示していた。

これまで核の位置が神経突起を制御するという報告や概念はなく、本研究では、神経細胞の最大の形態的特徴である神経突起形成に核の局在制御が関与しているかどうかについて初めて踏み込んでいくことで、“核の位置”と“神経突起形成”という異なる２つの事象のリンクを検証した。

２．研究の目的

小脳プルキンエ細胞をモデルとして、発生期の細胞核の局在制御と樹状突起形成に関わる分子・シグナル経路を同定し、神経突起形成における核の“位置”の重要性を明らかにすることを目指した。

３．研究の方法

（１）<u>核の局在制御を担う分子の同定</u>

まず、樹状突起形成期のプルキンエ細胞の核の局在変化を担う分子を同定するために、子宮内電気穿孔法によって生体内でプルキンエ細胞特異的に種々の分子群の機能欠失変異体や shRNA を発現させた。本研究では、核膜蛋白質複合体の構成分子、様々な生命現象に関わる多様なリン酸化酵素群、そして種々のシグナル伝達経路に関わる分子群などを中心に、多くの分子を候補として検討した。その結果、リン酸化酵素 LKB1 が有力候補として抽出された。

（２）<u>プルキンエ細胞での LKB1 の発現解析</u>

発生期プルキンエ細胞における LKB1 の発現および活性化を特異抗体を用いた免疫組織化学的手法により解析した。また、LKB1 の活性化に必須とされる結合蛋白質群の発現も同様に解析した。

（３）<u>プルキンエ細胞の樹状突起形成における LKB1 の機能解析</u>

子宮内電気穿孔法を用いて、生体内で LKB1

の発現欠失あるいは機能阻害を行い、同時にGFP によって蛍光標識したプルキンエ細胞の形態を免疫組織化学的に詳細に観察した。LKB1 の発現欠失では LKB1$^{flox/flox}$ マウスに Cre リコンビナーゼと GFP を、また機能阻害では野生型マウスに酵素活性部位に変異を持つ機能欠失 LKB1 変異体と GFP を遺伝子導入した。いずれの遺伝子導入も DNA 量を減らすなどして低効率にすることで、蛍光標識されたプルキンエ細胞の全容が観察できるようにした。

（４）プルキンエ細胞の樹状突起の形態解析
上述（３）の解析系により、GFP で標識したプルキンエ細胞を共焦点レーザー顕微鏡によって観察し、樹状突起の長さ、面積、交差数、方向性、単層面の厚さなどを定量した。

（５）LKB1 下流経路の同定
上述（３）のプルキンエ細胞特異的 LKB1 欠失実験系において、LKB1 の下流経路として知られる１４ のリン酸化酵素群の恒常的活性型変異体を子宮内電気穿孔法によって遺伝子導入し、樹状突起の形態観察を行った。さらに、この実験で下流経路の候補となった分子に関しては、野生型マウスにその機能欠失変異体を遺伝子導入する実験も行って検証した。

４．研究成果

最初に、樹状突起形成期のプルキンエ細胞で観察される細胞核の偏在化に関わる分子・シグナル経路を上記「研究の方法（１）」により解析した。その結果、細胞極性・代謝・細胞増殖などの様々な生命現象に関わる主要なリン酸化酵素である LKB1 の機能欠失変異体を生体内でプルキンエ細胞に遺伝子導入すると樹状突起形成期の核の偏在化が強く抑制されることがわかり、LKB1 経路がプルキンエ細胞の核の偏在化を制御していることが明らかになった。一方で、非神経系細胞で核の位置制御に関わることが報告されていた核膜蛋白質複合体 LINC complex に関しては、その構成分子の強力な機能阻害型変異体を発現させてもプルキンエ細胞の核の偏在化には全く影響がなかった。また、検討したその他の分子に関しても、核の偏在化に明らかに関わっていると考えられる候補は見つからなかった。

次に、「研究の方法（２）」の免疫組織化学的手法によって、LKB1 の発現を調べたところ、少なくとも生後７日目から成体に至るまで高発現していることが明らかになった。また、LKB1 の活性化に必要とされる結合蛋白質 STRAD も樹状突起形成期のプルキンエ細胞で高発現していた。さらに、リン酸化 LKB1 特異抗体を用いて LKB1 の活性化を調べたところ、樹状突起形成期の生後１４，２１日目でその顕著な活性化が認められた。一方、樹状突起形成初期の生後７日目では LKB1 の活性化はまだ低かった。プルキンエ細胞は生後 1 週目から徐々に登上線維および平行線維の軸索入力を受ける。そこで、神経活動と LKB1 の発現・活性化の関連を調べるために、神経活動を強力に抑制することが知られている内向き整流カリウムチャネル Kir2.1 をプルキンエ細胞に発現させた。その結果、神経活動の抑制によって、LKB1 の発現自体は影響を受けないが、活性化が低下することが明らかとなり、発生期のプルキンエ細胞では神経活動が LKB1 の活性化を促進している可能性が示唆された。

次に「研究の方法（３）および（４）」の解析系を用いて、プルキンエ細胞の樹状突起形成における LKB1 経路の働きを調べた。樹状突起形成が完了した生後２１日目において、樹状突起の形態を観察したところ、LKB1 欠失プルキンエ細胞では、樹状突起の長さ、面積、本数、分岐数、単層面の厚さなどはコントロール群との違いは認められなかったが、樹状突起の交差数が顕著に増加していることが明らかになった。また、この異常は生

後１４日目ですでに観察され、成体になっても回復することはなかった。同様の結果は、野生型マウスのプルキンエ細胞に LKB1 の機能欠失変異体を発現させることによっても観察された。プルキンエ細胞を含む多くの神経細胞は、自身の樹状突起をなるべく交差・接触しないように空間配置することで適切な軸索入力を可能にしており、本実験から LKB1 経路がプルキンエ細胞の樹状突起の正しい空間配置に必須であることが明らかになった。一方、すでに樹状突起の形態形成が完了した生後３週目以降に LKB1 を欠失させても樹状突起の交差数に異常は見られなかったことから、LKB1 は樹状突起の形態維持には関与していない可能性が高いと考えられた。また、前述のように Kir2.1 の遺伝子導入により LKB1 の活性化が低下することから、Kir2.1 発現プルキンエ細胞の樹状突起の形態を解析したところ、樹状突起の交差数が著しく増加していることが明らかになった。しかし、Kir2.1 発現プルキンエ細胞では、LKB1 欠失プルキンエ細胞とは異なり、樹状突起の長さや本数などが広範に異常をきたしていた。また一方で、LKB1 欠失プルキンエ細胞の軸索は正常な経路を経て深部小脳核へと投射しており、その形態に明らかな異常は認められなかった。以上の結果から、発生期プルキンエ細胞において、LKB1 経路は樹状突起形成、特にその空間配置を特異的に制御していることが明らかとなった。

次に、「研究の方法（５）」の解析系により、プルキンエ細胞の樹状突起の空間配置に関わる LKB1 の下流経路の同定を試みた。その結果、LKB1 の下流リン酸化酵素である SIK1 と SIK2 の恒常的活性型変異体の導入によって LKB1 欠失プルキンエ細胞の樹状突起の形態異常が回復することが明らかになった。さらに、野生型マウスのプルキンエ細胞に SIK1 と SIK2 の機能欠失変異体を同時に遺伝子導入することで、樹状突起の交差が顕著に増加することも明らかになった。以上のことから、LKB1 の下流で SIK1/2 を介して樹状突起の空間配置制御が行われていると考えられた。

＜まとめ＞

本研究から、主要なリン酸化酵素である LKB1 経路が、発生期プルキンエ細胞の細胞核の局在と樹状突起の空間配置の両方を制御していることが明らかとなり、核の位置制御と樹状突起の形態形成との関連が示唆された。また、これまでに LKB1 が核の局在や樹状突起の空間配置を制御することは報告されておらず、LKB1 経路の新たな機能が発見された。

＜今後の課題・展望＞

本研究は、核の位置制御と樹状突起の形態形成との関連を示唆したが、その因果関係まではまだ明確になっておらず、さらなる研究が必要となる。今後の研究によって、核の位置が神経突起の形態形成における重要な因子であることが明らかとなれば、神経発生における核の位置の重要性が強く認識され、今後、他の様々な形態を持つ神経細胞でも同様の知見が検証され、核の“位置”による神経突起の制御機構の普遍性と特異性が急速に解明されると考えられる。また、生体組織内で神経細胞自身の向きとその核の位置を正しく認識する分子センサーや、特定の発生ステージに急速に核の局在を変動させるシグナルの実体など分子生物学的な観点からも大変興味深い課題が数多く提起され、将来的に様々な研究を生み出すきっかけとなると期待される。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計１件）

Ogawa Y, Kakumoto K, Yoshida T, Kuwako KI, Miyazaki T, Yamaguchi J, Konno A, Hata J, Uchiyama Y, Hirai H, Watanabe M, Darnell RB, Okano H, Okano HJ
“Elavl3 is essential for the maintenance of Purkinje neuron axons”
Scientific Reports 8, 2722 (2018).
doi: 10.1038/s41598-018-21130-5.査読あり

〔学会発表〕（計３件）
(1) 桑子賢一郎、岡野栄之
「 The LKB1-SIK pathway controls dendrite self-avoidance in Purkinje cells」
第４１回日本神経科学会 2018 年

(2) 桑子賢一郎、岡野栄之
「神経細胞の樹状突起の形を制御する self-avoidance 機構」
第１回慶應ライフサイエンスシンポジウム 2017 年

(3) 桑子賢一郎
「神経回路の接続特異性を決める発生プログラム」
第２回稀少疾患研究会［招待講演］2016 年

６．研究組織
(1) 研究代表者
桑子　賢一郎　（KUWAKO, KEN-ICHIRO）
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・訪問研究員
研究者番号：30468475