

—— 研究助成報告 ——

中枢神経系の形成における微小管ネットワークと モータータンパク質の制御機構の解明

広 常 真 治

要旨：中枢神経系の発生では神経幹細胞からの分裂と神経細胞の遊走が重要な役割を果たしている。その制御機構の破綻は様々な中枢神経系の形成不全となり、症候性てんかんの原因となっている。私たちは滑脳症の原因遺伝子・LIS1の機能の解明に取組み、LIS1は細胞質ダイニンの順行性の移動に必須であることを明らかにした。さらに一連の研究から細胞質ダイニンが順行性に移動する際にNudCがキネシンのアダプタータンパク質として機能することを発見した。今回の研究ではNudCの中枢神経系の発生と機能の制御における役割を明らかにするためにノックアウトマウスを作成し、表現型を解析した。CRE-loxPシステムによるコンディショナルノックアウトマウスの解析の結果、NudCは神経形成とその維持の双方に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2021；32：51-56

序論

中枢神経系の発生では、神経幹細胞の分裂、前駆細胞への分化と増殖、神経細胞への分化、さらに神経細胞の遊走が秩序だてて行なわれている¹⁾。中でも発生期における神経細胞の遊走障害は滑脳症やヘテロトピアのような脳の形成不全を来とし、症候性てんかんの大きな原因となっている²⁾。特に症候性てんかんは滑脳症やヘテロトピアのような基礎疾患が脳にあり、そのため電氣的な異常・過剰放電が起こる。私たちはこれまで滑脳症の研究に取り組み、原因遺伝子・LIS1が微小管ネットワークやモータータンパク質である細胞質ダイニンの制御因子であることを見出した³⁾。LIS1は細胞質ダイニンがキネシンによって微小管のプラス端に運ばれる際の必須因子であり、LIS1の変異によって正常な細胞質ダイニンの分布と機能が傷害され神経細胞の遊走不全となることを明らかにした。さらにLIS1-細胞質ダイニンの複合体がキネシンと結合する際にNudCがアダプタータン

パク質として機能することを発見した⁴⁾。

てんかんのメカニズムを解明し、新たな治療法の確立のためにも動物モデルの作成は重要なステップである。私たちはこれまでLIS1のノックアウトマウスを作成し典型的な遊走障害を示し、致死的なてんかん発作を起こすことを明らかにした⁵⁾。私たちはさらに中枢神経系の形成にかかるNudCの機能を解明し、神経疾患のモデルマウスを確立するためにNudCのノックアウトマウスを作成し表現型の解析を行った。

NudCのノックアウトマウスはホモではごく初期の胚性致死であることからNudCは中枢神経系の発生だけでなく細胞分裂に必須であることが分かった。CRE-loxPシステムによるコンディショナルノックアウトマウスを用いた解析から、NudCは中枢神経系の形成に重要な役割を果たしていることが分かった。さらにNudCの成熟した神経細胞での機能喪失は、てんかん発作だけでなく学習障害も示し神経細胞の機能の維持にも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

方法

NudCノックアウトマウスの作成

NudCのノックアウトマウス作成のためにターゲティングベクターにNudC遺伝子をクローニングした。CRE-loxPシステムを用いるためにloxP配列をNudC遺伝子のイントロン2と5に挿入し、CREタンパク質の発現によってエクソン3-5を欠失させNudCの機能を失わせることを計画した。NudCのターゲティングベクターをES細胞に形質転換し、G418とガンシクロビルで選別し相同組換えを起こしたES細胞を単離し同定した。ES細胞を胎胚期の胚に注入しキメラマウスを作成した。キメラマウスをB6マウスと交配しNudCヘテロコンディショナルノックアウトマウスを単離した。ホモNudCコンディショナルノックアウトマウスは胚性致死であったため選別に用いたneo遺伝子を除去した。その結果、ホモNudCコンディショナルノックアウトマウスの作成に成功した。

CREタンパク質の発現

発生初期にNudCをノックアウトするためには受精卵でCREタンパク質を発現しているEII-CREの形質転換マウスと交配した。この交配でNudCを発生の初期からノックアウトした。また中枢神経系特異的にNudCをノックアウトするためにtau-CREの形質転換マウスと交配し完成した中枢神経系においてNudCをノックアウトした。さらにアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて中枢神経系においてCREを発現させ、完成した中枢神経系においてNudCをノックアウトした。アデノ随伴ウイルスは生後5日目に脳室内に注入すること高い浸透性と広範な部位の脳で発現させることができた。いずれの場合も効率よくNudCの機能喪失を達成することができた。

ライブセルイメージングによる神経細胞におけるNudCのダイナミックスの解析

NudC, 細胞質ダイニン, LIS1, チューブリンの細胞内での動態を解析するために蛍光標識したタンパク質を坐骨神経に発現させ、ライブ

セルイメージングで解析した。坐骨神経は長い神経突起を伸ばすため微小管の極性、動態を解析するのに適している。蛍光標識したタンパク質は効率よく発現させることができ、3色の蛍光標識を用いた動的な共局在を明らかにすることができた。

免疫組織化学的解析

組織学的解析のためにNudCの抗体を独自に作成した。大腸菌にNudCを発現させて組み替えタンパク質を精製し、ウサギに免疫することでNudCのポリクロナール抗体を作成した。

NudCノックアウトマウスの胎児、成体の様々な段階での表現型を解析した。マウスの脳はかん流固定後にパラフィン包埋をしたもの、凍結したものを作成し、抗体の特性に応じて切片を使い分けた。

EEGの解析

NudCノックアウトマウスにおけるてんかん発作の解析のために、マウス脳内に電極を埋め込み、自由に行動できる条件で脳波を測定した。マウス頭部に装着されるヘッドマウントには、超小型前置増幅の採用し、ノイズレスで安定した生体信号はデータ収録装置に伝送した。軽トルクのスリッピングの採用で、動物に対しての負担は軽減させた。記録は24時間連続で計測できるようにハードディスクに記録し、てんかん発作特徴的な脳波のスクリーニングを行った。

結果

NudCのノックアウトマウス作成と解析

NudCはLIS1とともに細胞質ダイニンが微小管のプラス端に向かう移動に必要であり、キネシンが可動性微小管と結合する際のアダプタータンパク質となっている⁴⁾ (Fig. 1)。NudCの中枢神経系の形成と神経細胞の機能維持における役割を明らかにするために、私たちはNudCのノックアウトマウスの作成を行なった。NudCのノックアウトはLIS1と同様に胚性致死であることが予想されたのでCRE-loxPシステムを用いたコンディショナルノックアウト

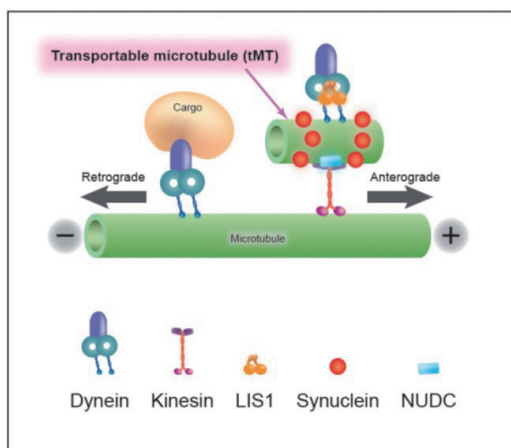


Fig. 1

マウスの作成法を採用した。CRE-loxPシステムの中でも、まずヘテロマウスにおいてG418を除いたマウス系統を作成し、ヘテロ同士の交配でNudCコンディショナルノックアウトマウスをホモを作成した。G418を除いたNudCコンディショナルノックアウトマウスのホモは正常に発育することが分かった。

まず、受精卵においてCREタンパク質を高く発現しているEII-CRE形質転換マウスと交配し、解析した結果ヘテロと野生型のみ得られたことから胚性致死が示唆された。そのため、交配後4日目の母体子宮を解析した結果正常に発育する胚と変性した胚を認めた。そこでプラストシストの培養を行い、四分の一の確立で変性したプラストシストを認めたことからNudCのホモノックアウトは着床直後の早い時期の胚性致死であることが示唆された。次に完成した中枢神経系の機能維持におけるNudCの役割を明らかにするためにNudCコンディショナルノックアウトマウスとTau-CRE形質転換マウスとの交配によって神経細胞特異的にNudCのノックアウトを行なった。その結果、中枢神経系特異的なNudCのノックアウトマウスでは海馬、大脳皮質を含む全体的な脳の萎縮を認めた。一方でCREタンパク質の発現は厳密に神経細胞成熟後だけでなく、発生の比較的早い時期から弱いながらも発現を認めたため、Tau-CRE形質転換マウスを用いた解析では十分に成熟し

た神経細胞におけるNudCの機能を明らかにすることは困難であることが分かった。

そこで、私たちは生後7日目のホモNudCコンディショナルノックアウトマウスの脳室内にCREタンパク質を発現するアデノ随伴ウイルスを注入し、成熟後の神経細胞の変化を観察した。生後7日目に注入した理由は時系列を追った観察から、ウイルス注入の難易度、ウイルスの浸透性を検討した結果、生後7日目が最も有効であることが分かったからである。アデノ随伴ウイルスによるCREタンパク質の発現はきわめて良好で、効果的に成熟した神経細胞でNudCをノックアウトすることができた。その解析の結果、Fig. 2に示すように経過とともに顕著な海馬の萎縮を認めた。興味あることに大脳皮質の萎縮は一定認められるものの海馬ほど顕著ではなかった。さらに、この萎縮がNudCの機能喪失によるものであることを証明するためにCRE発現アデノ随伴ウイルスと同時にNudC発現のアデノ随伴ウイルスを同時に注入することで海馬の萎縮は完全にレスキューされた。これらのことから私たちは成熟した神経細胞においてもその機能の維持に対してNudCは必須であることを明らかにした。

NudCノックアウトマウスにおける脳波の測定

次にNudCの機能喪失による神経細胞の脱落と神経ネットワークの異常、特にてんかん発作

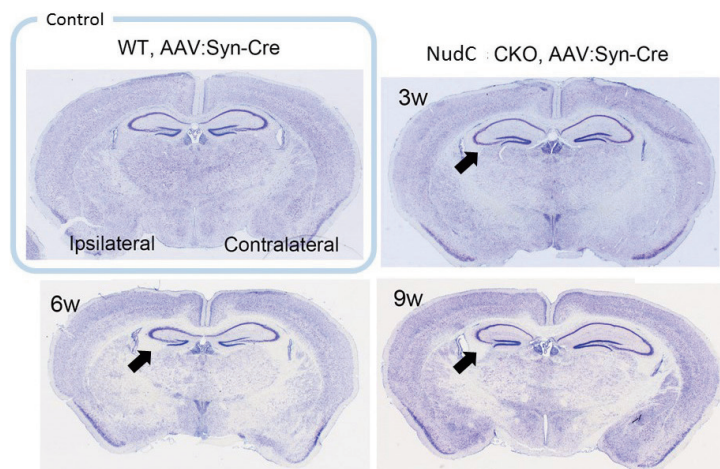


Fig. 2

との関連を明らかにするためにノックアウトマウスの脳波測定を行なった (Fig. 3)。今回の計測では薬剤や物理的な刺激は用いず、自然な環境における自発的な発作の計測を行なった。LIS1のノックアウトマウスでは特に3週齢のウイーニングごろに多発することが分かっていたので⁵⁾、NudCのノックアウトマウスでもウイーニング直後の4週齢で観察を行なった。組織学的な解析からもこの時点での海馬の変性脱落はそれほど顕著でないことが分かっている (Fig. 2)。24時間の継続した記録を解析した結果、棘波やそれが連続する多棘波が認められた (Fig. 4)。また同時のモニターを用いた行動の解析から、棘波や多棘波の出現に一致して持続する静止状態が見られ、時に強く体幹全体を震わせるような異常行動が見られ、てんかん発作と考えられた。興味あることに、異常脳波は海馬萎縮の初期に顕著に見られたが時系列の進行に伴う著しい萎縮の後にはむしろ軽減する傾向があった。

考察

てんかんとは、脳の神経細胞の異常興奮が広がって制御不能になり、様々な神経症状を引き起こす疾患である。てんかんは最も発症頻度が高い精神神経疾患のひとつであるにもかかわらず、原因解明は不十分で、まだ根本治療は確立していない。外傷性の脳損傷の後遺症に伴う

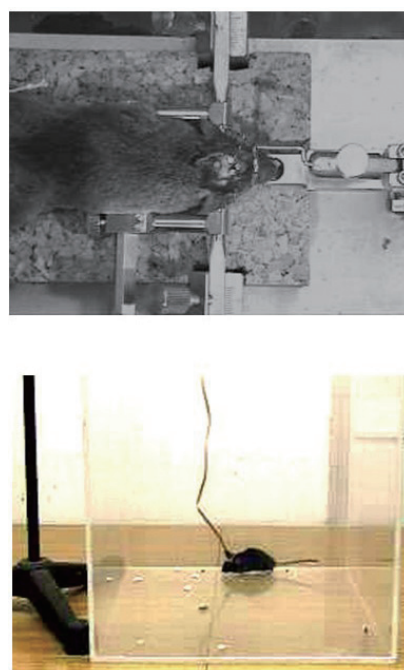


Fig. 3

ものは損傷の修復過程における異常な神経ネットワークの構築とグリオシスによるものと考えられている⁶⁾。一方で発生過程における中枢神経の構築の異常はウエスト症候群やレノックス・ガストー症候群に代表される症候性のてんかんの原因となることが多い⁷⁾。私たちは脳形



Fig. 4

成不全の滑脳症の研究に取り組み、原因遺伝子・LIS1が細胞質ダイニンの制御因子であることを明らかにした³⁾。さらに、細胞質ダイニン、LIS1の複合体が微小管のプラス端に運ばれる際に可動性微小管と名づけた特殊な微小管上に固定され、キネシン依存的に運搬されることを解明した⁸⁾。この可動性微小管とキネシンが結合する際のアダプタータンパク質がNudCであり、キネシンによる細胞内物質輸送の重要な構成因子である。今回の研究でNudCの中樞神経系の発生と神経細胞の機能維持における役割を明らかにした。特に、NudCは中枢神経系の発生に重要な役割を果たしているだけでなくその機能維持に必須であることが分かった。NudCの機能喪失は神経細胞の変性脱落に至り、また変性の過程で同時に生じるであろう修復過程とあいまって異常な神経ネットワークの構築が起こることが示唆された。このことがてんかん様の発作の原因となることが考えられる。興味あることに神経変性がさらに進むとてんかん様の発作は軽減される傾向にあり、神経細胞ネットワークのさらなる喪失はてんかん様の発作に対して抑制的に働くことが示唆された。

今回の研究はNudCの神経機能の維持における役割を解明しただけでなく新たなてんかん発症の分子機構、治療戦略の確立に貢献するものであると考えられる。

文献

- 1) Gleeson, J. G., Walsh, C. A. Neuronal migration disorders : from genetic diseases to developmental mechanisms. *Trends Neurosci* 2000 ; **23** : 352-9
- 2) Pilz, D. T., Matsumoto, N., Minnerath, S., Mills, P., Gleeson, J. G., Allen, K. M., et al. LIS1 and XLIS (DCX) mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. *Hum Mol Genet* 1998 ; **7** : 2029-37
- 3) Yamada, M., Toba, S., Yoshida, Y., Haratani, K., Mori, D., Yano, Y., et al. LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein. *EMBO J* 2008 ; **27** : 2471-83
- 4) Yamada, M., Toba, S., Takitoh, T., Yoshida, Y., Mori, D., Nakamura, T., et al. mNUDC is required for plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein and dynactins by kinesin-1. *EMBO J* 2010 ; **29** : 517-31
- 5) Hirotsune, S., Fleck, M. W., Gambello, M. J., Bix, G. J., Chen, A., Clark, G. D., et al. Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat Genet* 1998 ; **19** : 333-9
- 6) Dudek, F. E. Is modulation of cortical synapses after brain trauma homeostatic? Or, since when is epilepsy normal? *Epilepsy Curr* 2009 ; **9** : 53-4

- 7) Kolbjør, S., Martin, D. A., Pettersson, M., Dahlin, M., Anderlid, B. M. Lissencephaly in an epilepsy cohort : Molecular, radiological and clinical aspects. *Eur J Paediatr Neurol* 2021 ; **30** : 71-81
- 8) Toba, S., Jin, M., Yamada, M., Kumamoto, K., Matsumoto, S., Yasunaga, T., et al. Alpha-synuclein facilitates to form short unconventional microtubules that have a unique function in the axonal transport. *Sci Rep* 2017 ; **7** : 16386