

論文の内容の要旨

論文題目 I型滑脳症原因遺伝子産物 LIS1 結合蛋白質
NUDE、NUDEL の機能解析

氏 名 高根沢 康一

【序】

LIS1 は I 型滑脳症の原因遺伝子として同定され、脳の形態形成時における神経細胞移動に機能することが明らかになっている。LIS1 は進化的に非常によく保存されており、これまで LIS1 ホモログがカビ (NUDF)、*C. elegans* (cLIS1)、*Drosophila* (dLIS1) で同定され、分裂核の移動 (カビ)、細胞分裂 (*C. elegans*, *Drosophila*) に関与することが示されている。さらに、カビを用いた遺伝学的解析から、LIS1 (NUDF) は、Dynein-Microtubule 系の上流で機能することが報告されている。しかしながら、LIS1 がどのようなメカニズムで Dynein-Microtubule 系を制御し、最終的に、核・細胞の移動、細胞分裂に関与するかという点については不明な点が多い。当研究室では LIS1 に結合する分子として I 型 PAF-AH の触媒活性サブユニット $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 以外に 2 つの新規蛋白質 (NUDE、NUDEL (NUDE-like)) を同定している。この分子はカビの核移動変異株の原因遺伝子の中で LIS1 (NUDF) の下流に位置する遺伝子の哺乳類ホモログであり、LIS1 (NUDF) -NUDE 系はカビから哺乳類に至るまで保存されているマシナリーであることがわかった。本研究では、NUDE、NUDEL の相違点に着目し、その機能について解析を

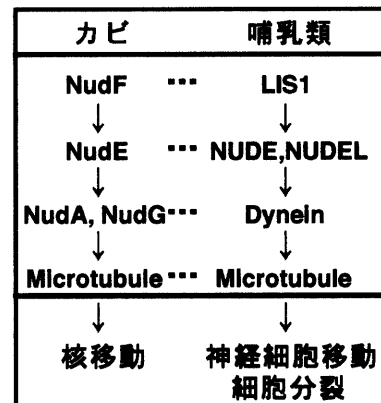


表1 核移動と神経細胞移動・細胞分裂において 想定される機能分子

行った。

【方法と結果】

1. NUDE、NUDEL の組織、細胞における発現

NUDE と NUDEL 機能の手がかりを得るため、まず、特異的モノクローナル抗体を用い、ウエスタンブロッティング法により NUDE と NUDEL の組織分布を調べた。Adult マウスにおいて、NUDEL は脳（大脳、小脳、延髄）と精巣に高い発現が見られ、一方、NUDE は脳における発現は低く、さらに脳以外の組織においても発現が見られた (Fig.1)。次に、両蛋白質の発現が見られた脳の発生段階における発現を *in situ* hybridization 法により調べた。NUDE は脳の発生初期に発現が高く、特に分裂の盛んな脳室層に顕著に見られた。また P7 において小脳の外顆粒層に、P14 では内顆粒層に強い発現が見られた。その後成長するに従ってその発現は減少した。一方、NUDEL は脳室層と共に外套層に発生初期から発現し、その発現は成体においても強く見られた (Fig.2)。次に、培養細胞における両蛋白質の発現を調べた。その結果、NUDE は調べた全ての細胞において発現が見られたのに対し、NUDEL は神経系の細胞である NS-20Y 細胞や PC12 細胞といった限られた細胞にしか発現が見られなかった。以上の結果から、NUDE はほとんど全ての組織、培養細胞に発現し、普遍的な細胞機能、特に細胞分裂への関与が予想された。一方、NUDEL は脳の発達に関与することが予想された。

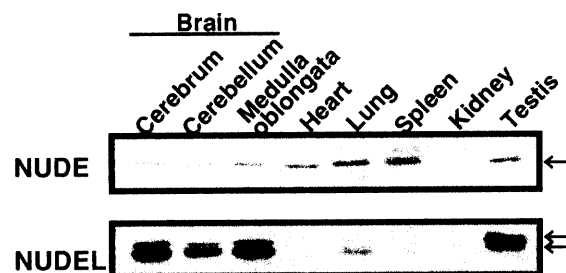


Fig.1 Adultマウスにおける組織分布

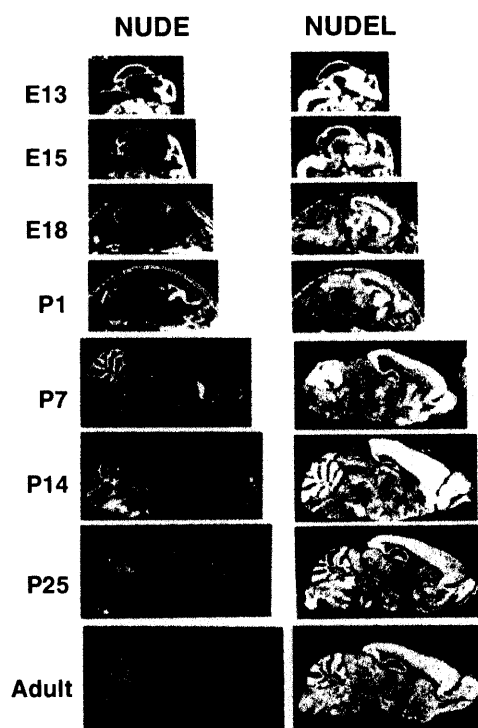


Fig.2 発生段階におけるマウス脳の *in situ* hybridization

2. 細胞周期における NUDE の解析

そこで、細胞周期における NUDE の変化を想定した。NUDE のみの発現が確認された HeLa 細胞を用いて、細胞周期を同調させた後、各ステージの細胞を回収しウエスタンブロッティング法により NUDE の変化を調べた。その結果、細胞

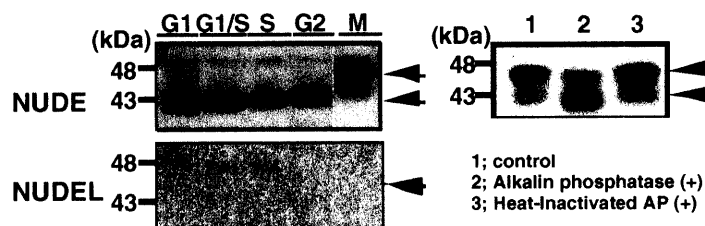


Fig.3 NUDEのM期特異的なリン酸化

分裂期 (M 期) にのみ一過的なバンドのシフトが見られた。NUDE のシフトしたバンドは、アルカリホスファターゼ処理により間期のバンドと同じ位置に戻ることから、NUDE は M 期特異的にリン酸化されることが分かった (Fig.3)。実際、NUDE は M 期に活性化される Cyclin dependent kinase 1 (CDK1) により *in vitro* でリン酸化されることがわかった。さらに、NUDE の細胞内局在を調べたところ、細胞質画分その他、中心体への局在が確認できた。LIS1 も同様に中心体に一部存在する。一方、NUDE を CHO 細胞に過剰発現させたところ、LIS1 を過剰発現させた場合と同様に、多核化、中心体の分散を伴う細胞分裂異常が観察された。これらのことから、NUDE は中心体機能を調節することによって細胞分裂に関与することが示唆された。

3. 神経細胞における NUDEL の機能解析

NUDEL の発現が見られた PC12 細胞を用いて NUDEL の機能を検討した。PC12 細胞は神経栄養因子 NGF 刺激により突起を伸長させ、神経細胞様の形態を示す。この際の NUDEL の発現を経時的に観察したところ、NUDEL は NGF 刺激後 1 日から PC12 細胞の突起伸長に伴い発現増加が見られ、7 日後には約 7 倍もの発現増加が見られた。一方、NUDE、LIS1、I 型 PAF-AH 触媒活性サブユニ

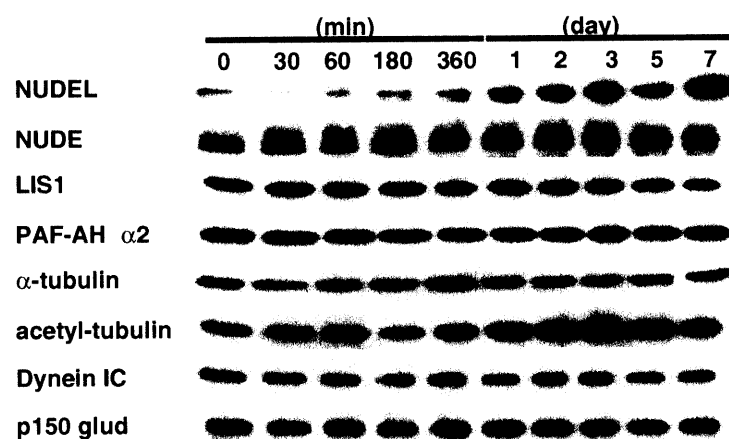


Fig.4 PC12細胞におけるNUDELの特異的な発現増加

ットα2、Tubulin、Dynein IC、ダイナクチン複合体の構成分子 p150 glud の発現には変化が見られなかった (Fig.4)。突起伸長した PC12 細胞における細胞内局在を検討したところ、NUDEL は突起の先端に強く局在していた。β-tubulin との二重染色の結果 NUDEL は微小管の先端付近で発現しており、微小管の伸長に伴う重合反応あるいは維持に関与しているのではないかと予想された。突起伸長における NUDEL の役割を明らかにする目的で、アンチセンス法を行った。PC12 細胞をアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理後、NGF 刺激したところ、NUDEL 蛋白質の発現減少とともに有意な突起伸長抑制効果が見られた (Fig.5)。この結果から、NUDEL

は突起伸長において非常に重要な分子であることが明らかになった。次に、初代培養の神経細胞を用いて NUDEL の発現を調べたところ、PC12 細胞と同様に神経突起の先端において発現が観察された。さらに、神経細胞においては神経突起の中間から先端にかけても

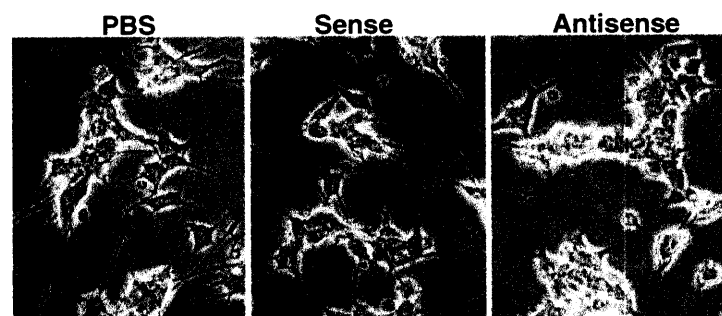
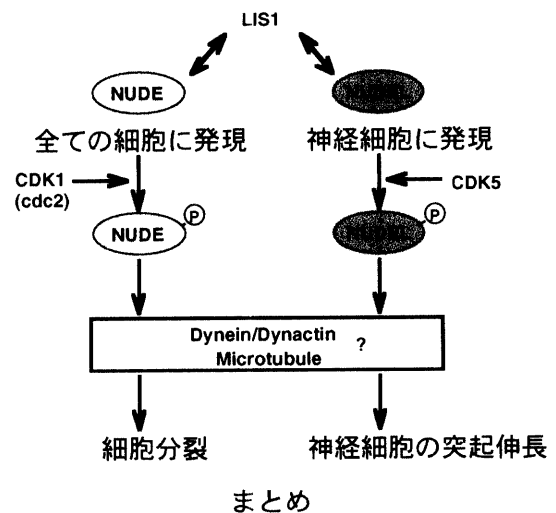


Fig.5 NUDELアンチセンスによる突起伸長の抑制効果

NUDEL の発現が見られた。Microtubule associated protein-2 (MAP2) との二重染色の結果、MAP2 の発現の低い神経突起に NUDEL は局在していた。MAP2 は神経細胞の樹状突起に主に局在することが知られており、NUDEL は主に軸索に局在していることが示唆された。

【まとめと考察】

本研究により、まず NUDE に関して、1)全ての培養細胞で発現が見られた。2)脳の発生段階において分裂の盛んな細胞に発現が高い。3)中心体に局在し、過剰発現細胞において中心体の分散が観察された。4)細胞分裂期特異的なリン酸化が見られた。以上のことが明らかになり、LIS1 との結合を介して、細胞分裂の際に機能する分子であることが強く示唆された。LIS1 の細胞内局在や、過剰発現細胞のフェノタイプの類似性からも、NUDE が細胞分裂において LIS1 と共に中心体機能を調節することが考えられた。



次に、NUDEL に関して、1)神経系の培養細胞にのみ発現が見られた。2)脳の発生段階において神経細胞移動の盛んな外套層に発現が見られ、成体においても発現が高い。3)PC12 細胞の突起伸長時に発現増加が見られ、NUDEL の発現抑制により突起伸長が抑制された。4)神経細胞

の突起の先端あるいは軸索の中間から先端にかけて発現が見られた。これらの結果より、NUDEL は脳の形成から成熟にかけて機能する分子であることが示唆された。NUDEL は成体においても発現が高く神経細胞移動時だけでなく、移動後のネットワーク形成あるいはその維持に重要な機能を担っている可能性を考えている。