

論文内容の要旨

LKB1 シグナリングによる神経細胞移動の制御機構の解析

(Analysis of Roles for the LKB1 Signaling Pathway in Neuronal Migration in the Developing Neocortex)

浅田 直之

大脳新皮質を構成する神経細胞は、脳室帯で誕生した後に、脳の表層側に向かって長い距離を移動する。このような神経細胞の移動は、正常な大脳新皮質の発生・構築に極めて重要である。移動中の神経細胞は高度に極性化しており、進行方向に長い先端突起を伸長し、その根元に中心体、さらにその後方に核が配置する (図 1)。神経細胞が移動する際には、進行方向への先端突起の伸長、先端突起先端方向

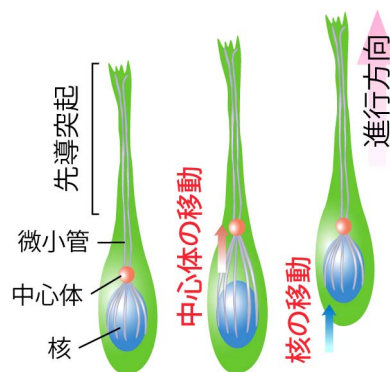


図 1: 神経細胞移動の模式図

への中心体の移動、および中心体方向への核の移動などの一連のイベントが起こる (図 1)。なかでも特徴的なのは、まず中心体が進行方向に移動し、その後に、核と細胞体が中心体の方向に移動するという『中心体先行』の挙動を示すことである (図 1)。したがって、移動中の神経細胞において中心体が適切に移動することは、核や細胞体が正しく移動するために必須であると考えられる。そのため、中心体が移動する仕組みを知ることは、神経細胞移動の分子基盤を理解する上で極めて重要である。しかし、中心体移動を司る分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。

Ser/Thr キナーゼである LKB1 は、様々な動物種の初期胚の極性を制御することが知られる極性制御分子であり、発生期の大脳新皮質にも発現しているがその機能は長らく不明であった。本研究において私は、発生期のマウス大脳新皮質において LKB1 を発現抑制すると、神経細胞移動が顕著に遅滞することを見出した (図 2)。さらに重要なことに、LKB1

が発現抑制された神経細胞では、中心体の前方移動が停滞していた（図 3）。これらのことから LKB1 は、移動中の神経細胞における中心体の前方移動を制御し、神経細胞移動に貢献することが推察された。

次に、LKB1 の下流シグナル経路を詳細に解析した。私は近年、分散培養した神経細胞において、LKB1 が Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) の Ser9 (不活性化部位) のリン酸化を制御することを見出した (Asada et al., 2007)。このことから、移動中の神経細胞においても、LKB1 が GSK3 β の Ser9 リン酸化を調節して活性制御する可能性が考えられた。この可能性を検証するため、Ser9 リン酸化型の GSK3 β (pGSK3 β) に特異的な抗体を用いて、LKB1 が発現抑制された神経細胞を免疫染色した。その結果、野生型の神経細胞に比べて、LKB1 が発現抑制された神経細胞では、pGSK3 β の免疫蛍光シグナルが顕著に減弱していた。加えて、生化学的な解析により、LKB1 が GSK3 β の Ser9 を *in vitro* でリン酸化すること、および LKB1 と GSK3 β が *in vitro* および *in vivo* で相互作用することを見出した。これらの結果から、移動中の神経細胞において、LKB1 が GSK3 β の Ser9 残基をリン酸化し、GSK3 β を不活性化することが推察された。

次に、神経細胞移動における GSK3 β の Ser9 リン酸化の役割を検証した。この目的のために、GSK3 β の Ser9 残基を Ala に置換してリン酸化されないようにした GSK3 β 変異体 (GSK3 β S9A) を利用した。この GSK3 β S9A 発現ベクターをマウス大脳新皮質に遺伝子

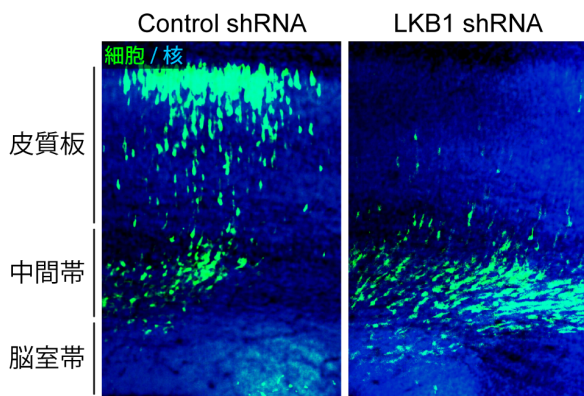


図 2: LKB1 の発現抑制による神経細胞移動の遅滞

神経細胞は脳室帯で生み出された後に、中間帯を通過し、皮質板へと移動することが知られる。Control shRNA を導入した神経細胞 (左パネル; 緑色) の多くは皮質板に分布した。これに対し、LKB1 に対する shRNA を導入した神経細胞 (右パネル; 緑色) は中間帯に分布し、移動が遅滞していると推察される。

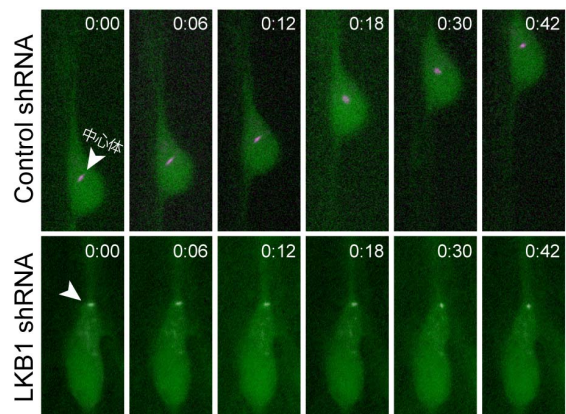


図 3: LKB1 の発現抑制による中心体移動の停滞

移動中の神経細胞 (緑色) における中心体 (マゼンタ; 矢じりで示した) の様子を経時観察した。Control shRNA を導入した神経細胞 (上段) では、中心体が連続的に前方へと移動した。これに対し、LKB1 shRNA を導入した神経細胞 (下段) では、中心体が先導突起の根元付近で停滞していた。

導入すると、神経細胞移動が顕著に遅滞した。加えて、GSK3 β S9A を発現させた神経細胞では、中心体の前方移動が停滞した。これらの結果から、GSK3 β の Ser9 リン酸化は中心体の前方移動、および神経細胞移動に重要であることが示唆された。

Adenomatous Polyposis Coli (APC) は微小管のプラス端に結合し、微小管を安定化する性質を持つタンパク質である。また、APC は GSK3 β の良く知られた基質の一つであり、GSK3 β によってリン酸化されることで、APC-微小管の相互作用が減弱することが知られている。APC に対する抗体を用いて移動中の神経細胞を免疫染色すると、APC の免疫蛍光シグナルは先端突起に局在し、特に遠位部に多く分布した。詳細な解析を行うと、先端突起の先端部において、APC の免疫蛍光シグナルは微小管のプラス端に多く観察され、APC が微小管のプラス端に結合していることが推察された。これに対して、GSK3 β S9A を発現させた神経細胞では、APC の免疫蛍光シグナルが微小管プラス端にほとんど局在しなかった。さらに、APC の局在異常に伴って、先端突起の先端部において微小管の不安定化が観察された。重要なことに、LKB1 を発現抑制した神経細胞においても同様に、APC の局在異常、および先端突起の先端部における微小管の不安定化が観察された。これらのことから LKB1-GSK3 β シグナリングは、APC の微小管プラス端への局在、および先端突起の先端部における微小管の安定化に重要な役割を果たすことが示唆された。

最後に、神経細胞移動における APC の役割を精査するため、私は C 末端領域 (微小管結合部位および EB1 結合部位を含む) を欠損した変異体 APC (APC Δ C) を利用した。APC Δ C は armadillo リピートを介して正常に微小管の遠位部に輸送される。しかし、個々の微小管プラス端に直接結合することはできない。さらに、APC Δ C は coiled-coil ドメインを介して内在性 APC と相互作用し、微小管との結合を妨げると考えられており、これにより内在性 APC のドミナントネガティブとして機能することが知られている。このような性質の APC Δ C を移動中の神経細胞に発現させると、LKB1 を発現抑制した場合や、GSK3 β S9A を強制発現させた場合と同様に、先端突起の先端部において微小管の不安定化が観察された。さらに重要なことに、中心体の前方移動が停滞すると共に、神経細胞移動が顕著に遅滞した。これらの結果から、APC の微小管プラス端への結合は、先端突起の先端部における微小管の安定化、中心体の前方移動、および神経細胞移動のいずれにも必要であることが示唆された。

以上の結果より、LKB1-GSK3 β -APC というシグナル経路が、先導突起先端部における微小管を調節することで、中心体の前方移動を制御し、神経細胞移動に寄与することが示唆された。興味深いことに、(1) GSK3 β が APC をリン酸化すると、APC と微小管プラス端との結合が阻害される (Zumbrunn et al., 2001 など)。また、(2) APC は微小管のプラス端に結合すると共に、 β -catenin などのタンパク質を介して細胞膜と相互作用することで、微小管を細胞皮層 (cell cortex) に係留し、安定化する (Näthke et al., 1996 など)。さらに、(3) 細胞皮層に係留され安定化された微小管に対して、細胞皮層に局在する dynein/dynactin 複合体が、牽引力を及ぼす (Dujardin and Vallee, 2002 など)。以上の知見を考え併せると、LKB1-GSK3 β -APC シグナル経路による中心体移動の制御メカニズムについて以下のモデルが提唱できる (図 4)。すなわち、移動中の神経細胞の先導突起において、LKB1 が GSK3 β をリン酸化して不活性化する。その結果、先導突起の先端部において APC が微小管のプラス端に結合し、 β -catenin などのタンパク質を介して微小管を細胞皮層に係留する。細胞皮層に係留され安定化された微小管が、dynein/dynactin などのモータータンパク質によって進行方向に引っ張られ、それに伴って、微小管の重合中心である中心体が前方に移動する。

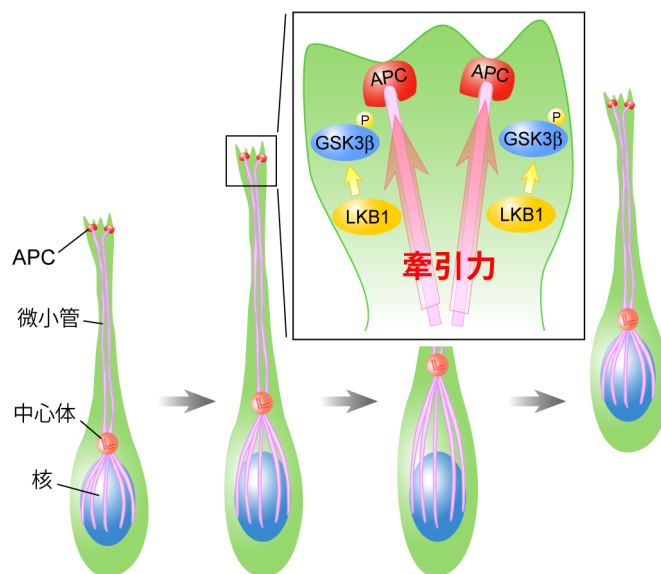


図 4: 移動中の神経細胞における LKB1-GSK3 β -APC シグナル経路のモデル

移動中の神経細胞の先導突起において、LKB1 は GSK3 β をリン酸化して不活性化する。その結果、先導突起の先端部において APC が微小管のプラス端に結合し、微小管を細胞皮層 (cell cortex) に係留すると共に、微小管を安定化する。安定化した微小管は、細胞皮層に存在する dynein/dynactin などのモータータンパク質 (図には示していない) によって進行方向に引っ張られ、それに伴って、微小管の重合中心である中心体が前方に移動する。