

## 論文の内容の要旨

### Analysis of roles of AMPK

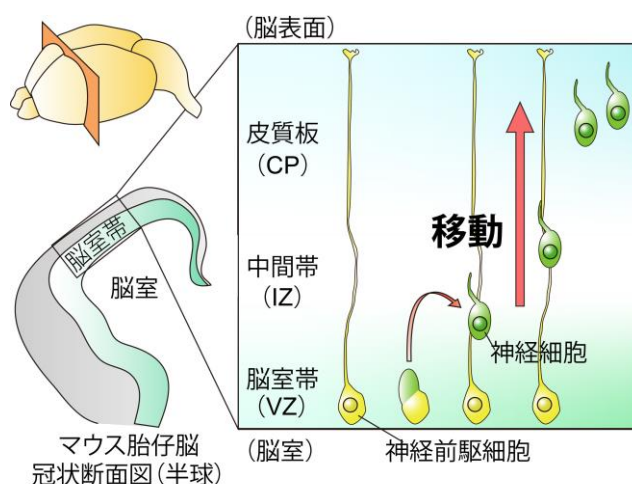
#### in neuronal migration of developing neocortex

(発生期大脳新皮質の神経細胞移動における

AMPK の機能解析)

氏名 内藤 泰樹

大脳新皮質を構成する神経細胞は、発生期脳において側脳室を取り囲む領域（脳室帯）に存在する神経前駆細胞から誕生する（図1）。新生した神経細胞は中間帯に移動後、神経前駆細胞の突起に沿って脳の表面側まで移動し、皮質板を形成する（図1）。この神経細胞移動は脳の構築において重要な過程であり、事実、神経細胞移動の障害によってヒト滑脳症などの脳形成障害が起きる。



神経細胞は進行方向に伸びる突起（先導突起）を持ち、先導突起の伸長と核移動を繰り返すことで移動する。この神経細胞移動の過程において、核移動の不全は神経細胞移動を破綻させることから、核移動が極めて重

図1 大脳新皮質における神経発生の様式

要なステップである。移動中の神経細胞の核は微小管やアクチン繊維で包まれており、これら細胞骨格と核膜とを繋ぐ細胞質ダイニンやミオシンなどのモーター分子の働きによって核移動が制御されている。しかしながら、神経細胞移動におけるモーター分子の制御機構には不明な点が多い。

AMP-activated protein kinase (AMPK) は細胞内 AMP 濃度の上昇により活性化されるという特徴から、エネルギー代謝制御における役割が盛んに研究されてきた。近年、AMPK は AMP 濃度上昇のみならず、多彩なシグナル伝達経路を介して活性化されることが明らかになり、エネルギーセンサーとしての役割だけではなく、細胞極性や細胞分裂などの制御にも関わることが報告されている。本研究では、AMPK の神経細胞移動における役割に着目して研究を進めた。

### 神経細胞移動における AMPK の役割

マウス胎仔脳における AMPK 及びリン酸化型 (活性化型) AMPK (pAMPK) の発現を免疫組織染色法によって調べた。その結果、発生期大脳新皮質の脳室帯、中間帯および皮質板のいずれの領域においても AMPK が発現しており、pAMPK シグナルは細胞の中心体近傍に観察された。培養細胞を用いて細胞内局在を詳細に解析した結果、AMPK および pAMPK はいずれも微小管上に分布すると共に、中心体に蓄積していた。

神経細胞移動における AMPK の役割を調べるため、子宮内電気穿孔法を用いて、AMPK 遺伝子に対する shRNA 発現ベクターと GFP 発現ベクターを共にマウス胎仔脳に遺伝子導入し、遺伝子導入された神経細胞の挙動を調べた。遺伝子導入後 4 日目に GFP 陽性細胞の分布を解析した結果、コントロールと比較して AMPK shRNA が導入された細胞は神経細胞移動が停滞し、多くの細胞が中間帯に蓄積していた (図 2)。

また、この移動障害は、野生型の AMPK (shRNA でノックダウンされない野生型) の共発現では改善するのに対し、キナーゼ活性を持たない変異体 AMPK では回復しなかった。このことから、AMPK が神経細胞移動に重要であり、その作用には AMPK のキナーゼ活性が必要であることが分かった。さらに脳スライス培養を用いて神経細胞移動をタイムラプスイメージングした結果、AMPK ノックダウンにより核移動のプロセスが阻害されていることが判明した。このことから、AMPK は神経細胞の核移動を制御していることが示唆された。

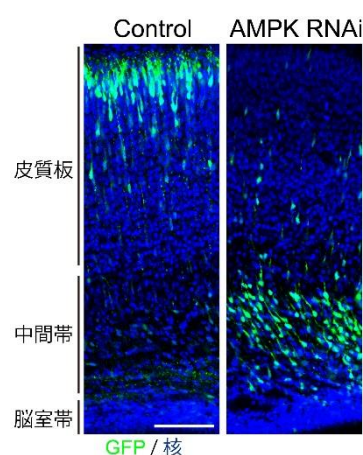


図 2 AMPK の発現抑制による神経細胞移動の停滞

### AMPK によるダイニン中間鎖のリン酸化

重要なことに、培養細胞において AMPK は細胞質ダイニンと似た局在を示すこと、AMPK が細胞質ダイニンと相互作用することが判明した。また、大脳新皮質において AMPK をノックダウンした神経細胞は、ダイニン重鎖をノックダウンした神経細胞と似た表現型 (核の形態が楕円から真円に近くなることや核と中心体との距離が長くなること) を示すことを

見出した。さらに、AMPK 活性化剤および阻害剤を Cos-7 細胞や培養神経細胞に暴露すると、細胞質ダイニンのサブユニットの一つであるダイニン中間鎖のリン酸化が、それぞれ増加および低下することが明らかになった。これらのことから、細胞内において AMPK がダイニン中間鎖のリン酸化を担っていることが示唆された。そこで、*in vitro* においてダイニン中間鎖を AMPK によってリン酸化し、質量分析によってリン酸化されたアミノ酸残基を複数同定した。この知見を基に、アミノ酸残基を置換したダイニン中間鎖変異体を利用した実験によって、Ser81 残基が主要なリン酸化部位であることを見出した。

### AMPK-細胞質ダイニン経路の役割

ダイニン中間鎖の Ser81 残基の非リン酸化型変異体およびリン酸化状態模倣型変異体を用いて、ダイニン中間鎖のリン酸化がダイニンの機能および神経細胞移動に与える影響を調べた。ダイニン中間鎖の非リン酸化型変異体を Cos-7 細胞に発現すると、ゴルジ体の中心体近傍への集積が阻害された。同様の現象は、AMPK 阻害剤の投与によっても観察できた。ゴルジ体の細胞内分布が細胞質ダイニンの活性に依存することを考え合わせると、ダイニン中間鎖のリン酸化がダイニンの機能に重要であることが示唆された。さらに、ダイニン中間鎖の非リン酸化型変異体を大鼠新皮質に強制発現すると、AMPK のノックダウンと同様に、神経細胞移動が障害され、核移動が阻害されていた (図 3A)。重要なことに、AMPK ノックダウンによる神経細胞移動の障害は、ダイニン中間鎖のリン酸化模倣型変異体の発現によって緩和された。(図 3B)。以上のことから、AMPK はダイニンのリン酸化を介して核移動および神経細胞移動を制御していることが判明した。

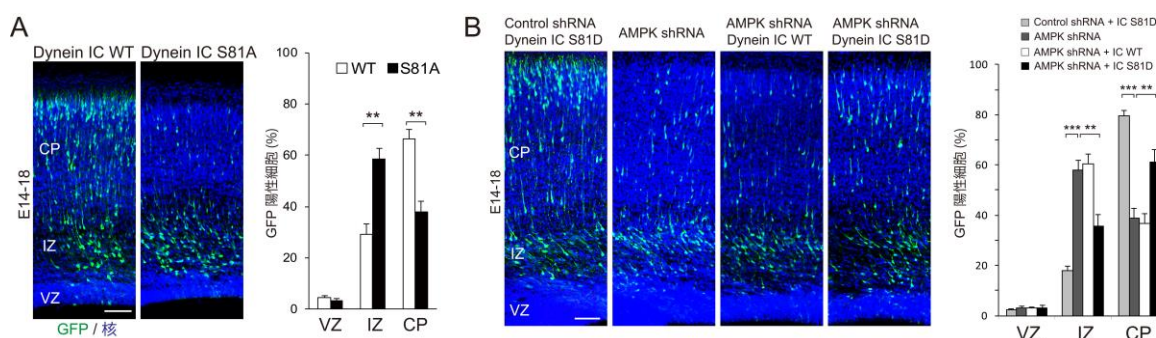


図 3 AMPK-細胞質ダイニン経路の神経細胞移動における役割

(A,B) 子宮内電気穿孔法により、図に示された組み合わせのダイニン中間鎖発現ベクター、および AMPK ノックダウンベクターを、GFP 発現ベクターとともに E14 マウス胎仔脳に遺伝子導入した。遺伝子導入後 4 日目の GFP 陽性細胞の分布を解析した。

Dynein IC WT(野生型ダイニン中間鎖)、Dynein IC S81A (ダイニン中間鎖の非リン酸化型変異体)、Dynein IC S81D(ダイニン中間鎖のリン酸化状態模倣型変異体). CP(皮質板)、IZ (中間帯)、VZ (脳室帯) \*\*  $p < 0.01$  \* $p < 0.001$  two-tailed Welch's *t* test.

本研究では、AMPK がダイニン中間鎖の Ser81 残基をリン酸化することによってダイニンの機能を制御していることを明らかにした。移動中の神経細胞において、細胞質ダイニンは核膜を引っ張ることによって核移動に寄与していると考えられている。ダイニン中間鎖において、Ser81 残基の周辺領域に位置する Ser/Thr 残基のリン酸化は、細胞質ダイニンとダイナクチンや NudE-Lis1 といったダイニンの活性を調節する分子との相互作用を変化さ

せることが知られる。また同時に、ダイニン中間鎖のリン酸化が輸送対象との結合を制御していることも報告されている。これらのことから、Ser81 残基のリン酸化によって、ダイニンの活性が調節されること、あるいはダイニンと核膜等との結合が制御されることにより、神経細胞の核移動が制御されていると考えられる。

本研究により、細胞質ダイニンの機能をリン酸化によって調節する分子を見出すことができた。さらに、ダイニンのリン酸化という神経細胞移動における新たな制御機構を明らかにすることができた。