

63. 神経細胞遊走障害を伴う遺伝性疾患に対する創薬探索

山田 雅巳

*大阪市立大学 大学院医学研究科 細胞機能制御学講座

Key words : 発達障害, 神経細胞移動障害, 微小管モータータンパク質, LIS1, 蛍光分子イメージング

緒言

難治性脳形成障害症に分類される疾患は、重度の精神発達遅滞、運動失調、てんかん（痙攣）などを主な臨床症状とする。これらの疾患は、症状が重篤であるばかりでなく、疾患自体が永続的で、社会的に適応できない患者（児）と家族の苦しみや負担は長期間に渡って大きく、現代医学が解決すべき喫緊の課題の一つであり、社会的ニーズも大きい。本研究課題に於いては、当該疾患の中でも、滑脳症に代表される発生初期の神経細胞遊走障害に起因する先天性神経疾患に着目し、その疾患発症メカニズムを分子レベルでの解明することで創薬開発に繋げることを目指してきた。古典的 I 型に分類される滑脳症の多くは、染色体 17 番目にある *Lis1* 遺伝子のヘテロ変異に起因する。この責任遺伝子産物 LIS1 は、細胞内に於いて微小管モーターの細胞質ダイニンに直接結合して、その輸送活性を制御することが知られている¹⁾。私たちは、LIS1 の機能不全により滑脳症発症に至る分子メカニズムを解明する為に、LIS1・細胞質ダイニンによる細胞内ロジスティクス（細胞内物質輸送）あるいは分子ダイナミクスといった独自の視点からアプローチしてきた¹⁻⁴⁾。

これまでに私たちは、滑脳症の責任遺伝子産物の LIS1 が、タンパク質分解酵素のひとつであるカルパインによって分解されることを独自に発見し、カルパイン阻害薬が滑脳症疾患モデル (*Lis1* 遺伝子ヘテロ欠損マウス) にみられる滑脳症（様）症状を個体レベルでも改善することを報告した^{5,6)}。一方で、近年に於ける分子遺伝学および画像診断学の著しい進歩により、*Lis1* 遺伝子以外の神経細胞遊走障害を伴う神経疾患の責任遺伝子についても次々に報告されてきた。これらの疾患の責任遺伝子の多くは LIS1 と同様に、微小管関連遺伝子に分類されること、さらには、それらの症状に類似性あるいは関連性がみられることから、疾患発症に至る共通の分子メカニズムが示唆される⁷⁾。私たちは、創薬開発のターゲットを従来の個々の責任遺伝子のみならず、微小管関連因子などの細胞内物質輸送あるいは分子ダイナミクスといった移動細胞内マシナリーの中に見出し、より汎用性の高い新規治療薬の開発を目指す。本研究課題に於いては、低分子量 GTPase ADP-ribosylation factor-like3 (ARL3) の LIS1・細胞質ダイニンによる細胞内ロジスティクスに於ける役割を蛍光分子イメージング技術を駆使して検討した。

方法

1. インビトロ微小管トランスポートアッセイ

量子ドット Qdot (655, 605 nm に発光波長; Life Technologies) を各々抗細胞質ダイニン中鎖 (DIC1) 抗体、抗ダイナクチン P150^{Glued} 抗体に共有結合的に架橋させたものを用いて、ブタ脳から生化学的に精製した細胞質ダイニンとダイナクチンを蛍光標識した。同様に、大腸菌によるタンパク質発現系により作製した GST-細胞質ダイニン軽鎖 (LC8/DYNLL1)、HIS-ARL3 活性型変異体 (Q71L) のリコンビナントタンパク質を、Qdot (705 nm) に各々抗 GST 抗体 (Medical and Biological Laboratories)、抗 HIS 抗体 (Clontech) に架橋させたものを用いて蛍光標識した。ルールとなる微小管は、ブタ脳から精製したチューブリンを重合させたものを抗 α チューブリン抗体 (TU-02; Santa Cruz Biotechnology) を用いてアッセイ用チャンバーの底面に固定した。予め、Qdot で蛍光標識した細胞質ダイニンとダイナクチンの複合体を形成させた後、同じく Qdot で蛍光標識した ARL3 (Q71L) あるいは LC8/DYNLL1 を加えて、微小管上での分子動態を観察した。顕微鏡観察は、488-nm レーザー (Sapphire; Coherent, CA, USA) で励起し、各々の

Qdot の発光波長の特性に合わせたフィルター (Brightline; Semrock) で3つに分光し、超感度 EM-CCD カメラ (ImagEM; Hamamatsu Photonics)、倒立顕微鏡 (IX-71; Olympus) を用いて 100 ms 毎に画像を取得し、ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health) を用いてデータ解析を行った。

2. 細胞内蛍光 1 分子イメージング

マウス線維芽細胞 (MEF) 細胞に対して、pEGFP-ダイナクチン (P150^{Glued}) /pmCherry-ARL3 (Q71L)、pEGFP-細胞質ダイニン中鎖 (DIC1) /pmCherry-細胞質ダイニン軽鎖 (LC8/DYNLL1) を電気穿孔法にて遺伝子導入した (Neon Transfection System; Life Technologies)。約 48 時間培養後、全反射照明蛍光顕微鏡システム (倒立型顕微鏡 ECLIPSE Ti, Nikon Instech)、励起レーザー (Excelsior 488, Excelsior 561, Spectra-Physics)、(油浸) 対物レンズ (Apo TIRF 100X, 開口数 1.49, Nikon Instech)、画像分割光学系/デジタル CMOS カメラ (W-ViewA8509, ORCA-Flash 4.0, Hamamatsu Photonics) を用いて、細胞内に於ける各々の分子動態を観察し、画像を取得 (100 msec 毎)、経時に対して追跡した輝点の位置情報から平均二乗変位 (MSD) (R software) を算出し、それら動きの特性を解析した (Image J, National Institutes of Health; 自動粒子追跡プラグインは、新井由之博士により作成)。

3. RNA 干渉と蛍光免疫細胞染色法

以下の配列のマウス ARL3 siRNA: 5-GCAUGAACUGGGUCUGCAATT-3 を電気穿孔法にて MEF 細胞内に遺伝子導入し (Neon Transfection System)、MEF 細胞内の内因性 ARL3 を選択的にノックダウン (KD) させた場合、マウス ARL3 siRNA に対して耐性を持つヒト型 ARL3 siRNA を発現させた場合について、LIS1 の細胞内局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510META, Carl Zeiss) により観察し、取得した画像を比較した。但し、抗 LIS1 抗体 (山田が作製した)、Alexa546-抗ウサギ IgG (Life Technologies) を用いて免疫細胞染色を行った。

結 果

これまでに私たちは、微小管プルダウン法と免疫沈降法によるスクリーニングの結果、細胞質ダイニンからダイナクチン P150^{Glued} を解離させる因子として、低分子量 GTPase の一種である ARL3 の活性型変異体[ARL3(Q71L)]と細胞質ダイニン軽鎖 (LC8/DYNLL) を同定した。また、ARL3 (Q71L) は、ダイナクチン P150^{Glued} に、LC8/DYNLL は細胞質ダイニンに選択的に結合することを明らかにした (図省略)。今回は、ARL3 と LC8/DYNLL の細胞質ダイニン・ダイナクチン P150^{Glued} の輸送活性に対する影響を明らかにする為に、これらの因子を量子ドット (Q-dot) にて蛍光標識し、微小管上での分子動態をインビトロ微小管トランスポートアッセイにて直接観察した。その結果、ARL3 (Q71L) がダイナクチン P150^{Glued} に、DYNLL/LC8 が細胞質ダイニンに直接結合することによる細胞質ダイニン・ダイナクチン複合体の微小管上での解離がみられた (図 1)。

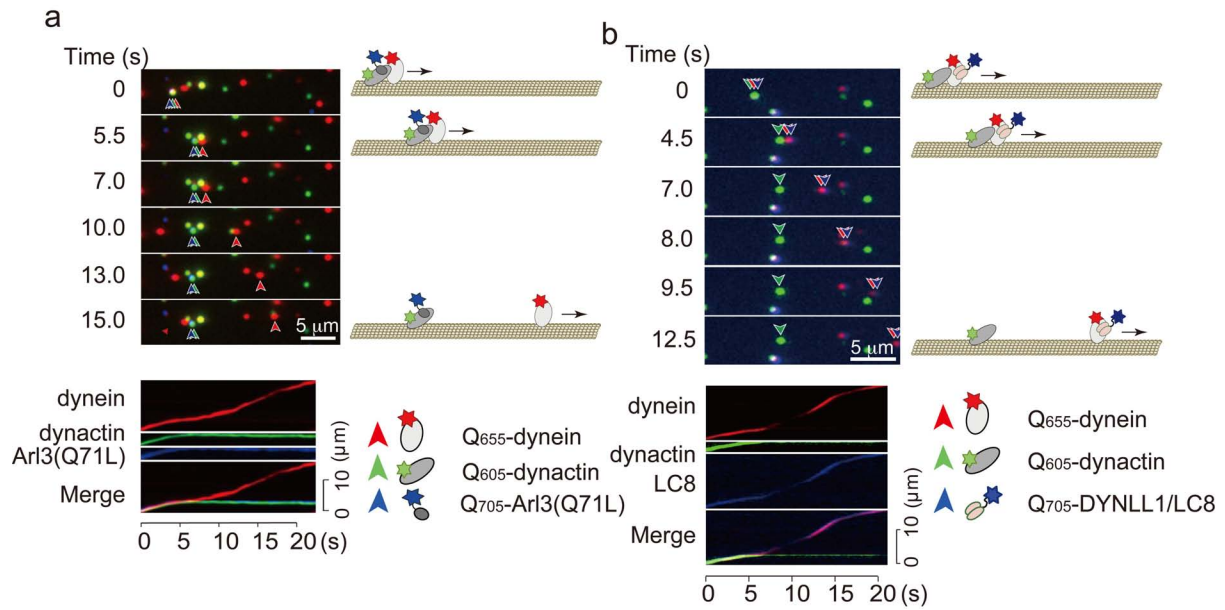


図1. インビトロ微小管トランスポートアッセイによる細胞質ダイニン・ダイナクチン P150^{Glued} 輸送複合体に対する ARL3 (Q71L) (a) あるいは LC8/DYNLL1 (b) の微小管上での分子動態に及ぼす影響
 画像中のスケールバーは、5 μ m を表し、キモグラフ中のスケールバーは、10 μ m を表す。

次に、細胞内での分子動態を直接観察する為に、各々のペアを GFP あるいは mCherry との融合タンパク質としてマウス胎生線維芽 (MEF) 細胞内に発現させて、分子動態の特性を 1 分子レベルでの解析を行った。これらの動きの特性を明らかにする為に、各輝点の位置情報から平均二乗変異を算出してプロットしたところ、二次式でフィッティングされることから、一定の方向性をもって微小管上での挙動を共にしていることが示唆された (図 2)。

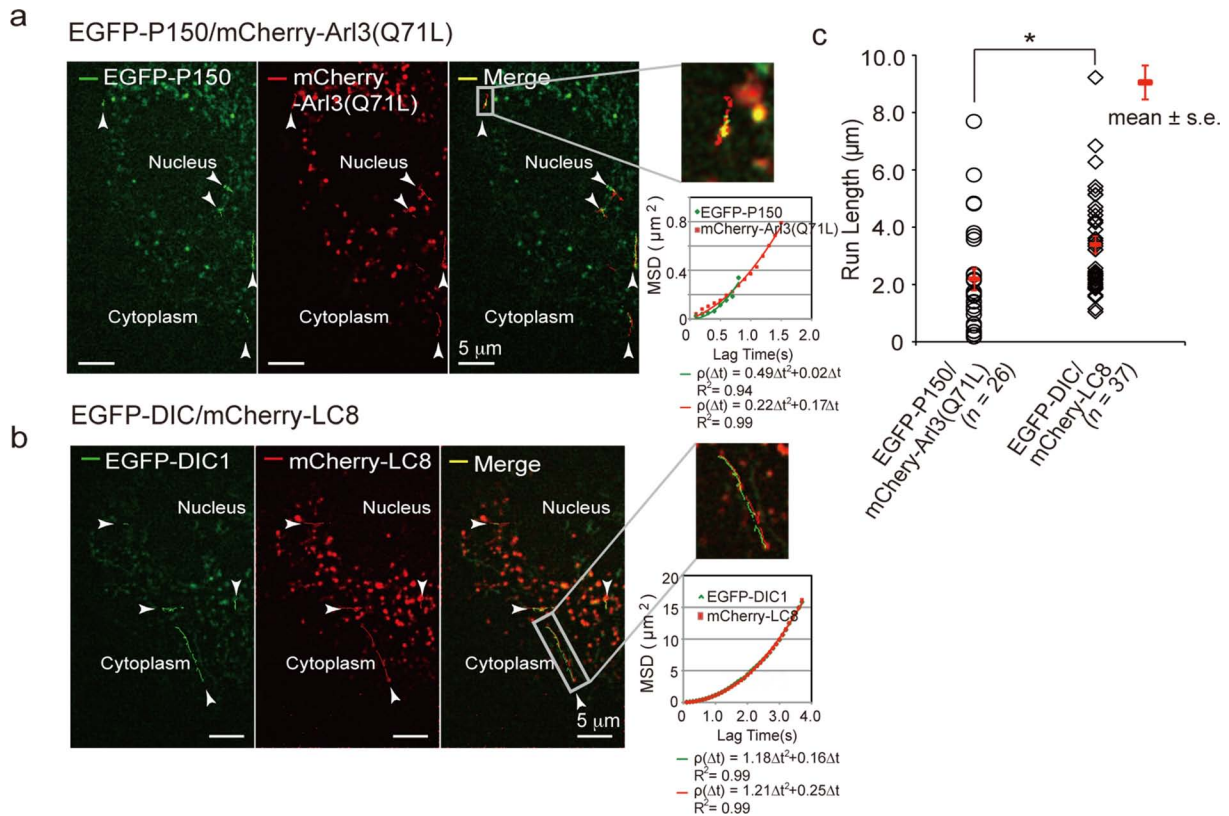
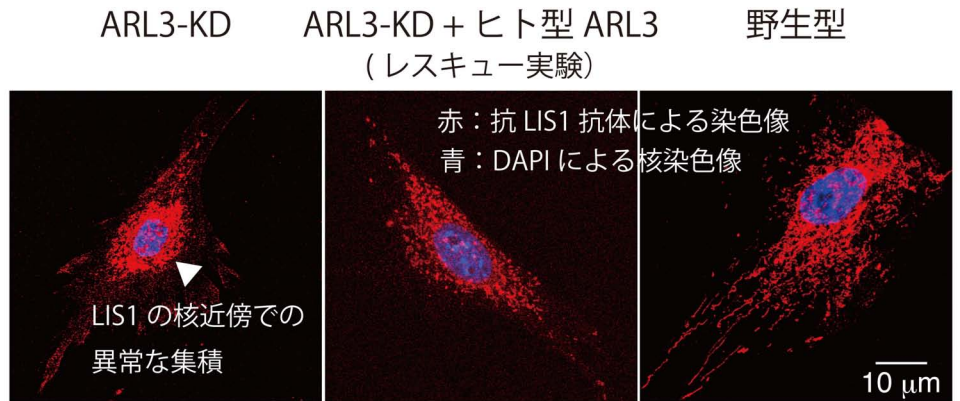


図2. 蛍光1分子イメージングによるダイナクチン P150^{Glued} と ARL3 (Q71L) (a) および細胞質ダイニン中鎖 (DIC1) と LC8/DYNLL1 (b) の MEF 細胞内に於ける分子動態解析 (c) 移動距離 (run length) の比較
 画像中スケールバーは、5 μm を表す。MSD は、平均二乗変位 (Mean Square Displacement) を意味する。検定は、Student t test (unpaired) を行った。*は、P < 0.05 を意味する。

また、細胞質ダイニン/LC8 は、ダイナクチン P150^{Glued}/ ARL3 と比較して移動距離が顕著に長いことは (図 2c)、インビトロ微小管トランスポートアッセイの結果を支持するものであった (図 1)。そこで、ARL3 の細胞内に於ける役割を明らかにする為に、RNA 干渉法により MEF 細胞内の ARL3 のノックダウン (KD) を試みたところ、LIS1 の核周辺への異常な集積が見られるとともに、種々のタンパク質、細胞内小器官の核周辺への偏った局在の分布が見られた (図 3、一部図省略)。



細胞：マウス胚性線維芽 (MEF) 細胞

図 3. ARL3 ノックダウン (KD) による LIS1 の MEF 細胞内に於ける局在の変化
画像中のスケールバーは、10 μ m を表す。KD は、ノックダウンを意味する。

これらより、LIS1 をはじめとする細胞質ダイニンとダイナクチンによって中心体側（微小管マイナス端）まで逆行性に運ばれてきた種々の積み荷は、ARL3（活性型）および LC8/DYNLL1 の相乗的な効果により、ダイニン・ダイナクチン逆行性輸送複合体を崩壊させることで荷下しのステップを制御していることが示唆された。

考 察

これまでに私たちは、LIS1 によるダイニンが司る物質輸送の制御メカニズムを分子レベルで検討し、次のようなモデルを提唱した（図 4）。

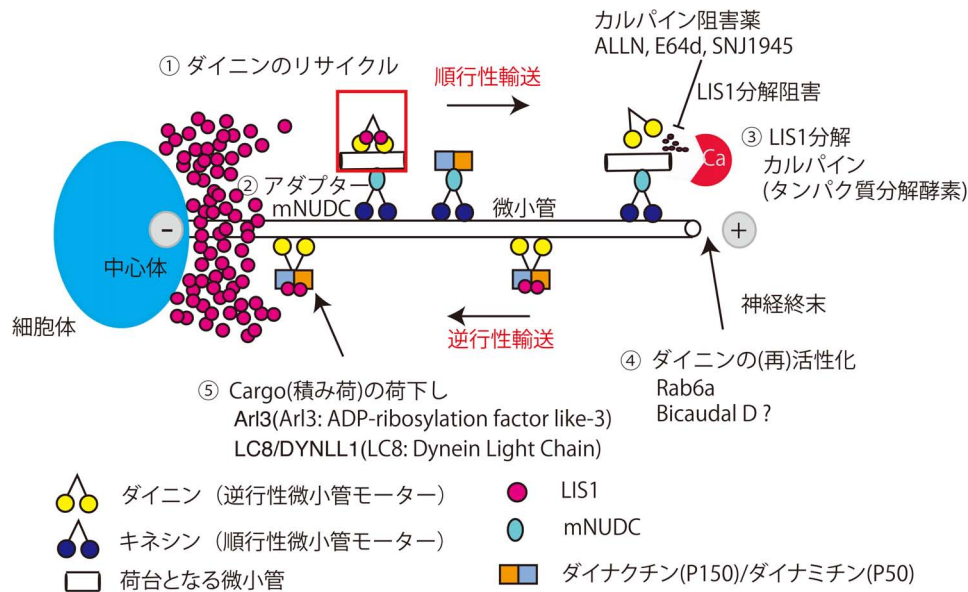


図4. LIS1による微小管モーターの物質輸送制御メカニズム

- ① LIS1は、ダイニンを荷台となる微小管上に固定し、キネシンによって順行性に輸送される。
- ② LIS1-ダイニン複合体とキネシンとのアダプタータンパク質としてmNUDCを同定した。
- ③ LIS1は、カルパインによって分解される。カルパイン阻害薬は、*Lis1* 遺伝子欠損マウスの滑脳症(様)症状を個体レベルで改善させた。
- ④ Rab6aは、神経終末に於いてダイニンに直接作用してLIS1を解離させることでダイニンを(再)活性化させる。
- ⑤ 中心体側に於けるCargo(積み荷)の荷下しは、ARL3とLC8/DYNLL1が相乗的にダイニン-ダイナクチン複合体を崩壊させることで制御している。

まず、LIS1は、細胞質ダイニンを荷台となる微小管フラグメント上に可逆的に固定して輸送複合体を形成し、もう一つの微小管モーターであるキネシンの積み荷として微小管のプラス端へと順行性に輸送されることを明らかにした¹⁾。これより、LIS1は、本来ならば逆行性の物質輸送を司っている細胞質ダイニンを微小管プラス端へとリサイクルする過程において重要な役割を果たしていることが示唆された。また、LIS1によって、神経終末(微小管プラス端)までリサイクルされた細胞質ダイニンに低分子量GTPaseのRab6aが直接作用してLIS1を解離させることで、ダイニンを(再)活性化させ、本来の逆行性に物質を輸送できるようになることを報告した⁵⁾。今回の研究結果より、このLIS1・細胞質ダイニンを含む微小管上での物質輸送システムに於いて、細胞質ダイニンとそのアクセサリタンパク質のダイナクチンP150^{Glued}が形成する逆行性輸送複合体によって中心体側(微小管マイナス端)まで運ばれてきた種々の積み荷の荷下しの過程が、ARL3がダイナクチンP150^{Glued}に、LC8/DYNLL1が細胞質ダイニンにさらに結合することで制御されていることが示唆された。本研究成果により、LIS1、細胞質ダイニンを含む細胞内ロジスティクスをさらに解明することができた。今回、ARL3によるLIS1機能の分子制御が示唆されたことより、滑脳症発症に至る分子メカニズムの解明に繋がるとともに、ARL3あるいはその活性調節因子は、創薬探索の標的としても大いに期待できる。今後は、複数の遺伝子の変異あるいは欠損に起因する神経細胞遊走障害を伴う先天性神経疾患に対する汎用な新しい治療方法の開発に繋げたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪大学産業科学研究所の永井健治および新井由之である。本稿を終えるにあたり、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Yamada M, Toba S, Yoshida Y, Haratani K, Mori D, Yano Y, Mimori-Kiyosue Y, Nakamura T, Itoh K, Fushiki S, Setou M, Wynshaw-Boris A, Torisawa T, Toyoshima YY, Hirotsune S. LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein. *EMBO J.* 2008;27(19):2471-83. doi: 10.1038/emboj.2008.182. PubMed PMID: 18784752
- 2) Yamada M, Toba S, Takitoh T, Yoshida Y, Mori D, Nakamura T, Iwane AH, Yanagida T, Imai H, Yu-Lee LY, Schroer T, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S. mNUDC is required for plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein and dynactins by kinesin-1. *EMBO J.* 2010;29(3):517-31. doi: 10.1038/emboj.2009.378. PubMed PMID: 20019668
- 3) Torisawa T, Nakayama A, Furuta K, Yamada M, Hirotsune S, Toyoshima YY. Functional dissection of LIS1 and NDEL1 towards understanding the molecular mechanisms of cytoplasmic dynein regulation. *J Biol Chem.* 2011;286(3):1959-65. doi: 10.1074/jbc.M110.169847. PubMed PMID: 21036906
- 4) Yamada M, Kumamoto K, Mikuni S, Arai Y, Kinjo M, Nagai T, Tsukasaki Y, Watanabe TM, Fukui M, Jin M, Toba S, Hirotsune S. Rab6a releases LIS1 from a dynein idling complex and activates dynein for retrograde movement. *Nat Commun.* 2013;4:2033. doi: 10.1038/ncomms3033. PubMed PMID: 23783758
- 5) Yamada M, Yoshida Y, Mori D, Takitoh T, Kengaku M, Umeshima H, Takao K, Miyakawa T, Sato M, Sorimachi H, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S. Inhibition of calpain increases LIS1 expression and partially rescues in vivo phenotypes in a mouse model of lissencephaly. *Nat Med.* 2009;1202-7. doi: 10.1038/nm.2023. PubMed PMID: 19734909
- 6) Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, Kataoka Y, Azuma M, Hayasaka K, Amamoto M, Tominaga K, Wynshaw-Boris A, Wanibuchi H, Oka Y, Sato M, Kato M, Hirotsune S. Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Sci Rep.* 2013;3:1224. doi: 10.1038/srep01224. PubMed PMID: 23390575
- 7) Yamada M, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A. A novel strategy for therapeutic intervention for the genetic disease: preventing proteolytic cleavage using small chemical compound. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;1401-7. doi: 10.1016/j.biocel.2010.05.017. PubMed PMID: 20541031