脳発生における細胞内輸送機構が果たす役割の解明とその進化的意義の検討 The role of the intracellular transport in the brain development and evolution

The Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics

難波 隆志

派遣期間 2014年4月1日～2016年3月31日
研究機関 The Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics
Pfotenhauestr. 108, 01307 Dresden, Germany
研究指導者 Prof. Dr. Wieland B. Huttner

The evolutionary expansion of the mammalian brain, especially the neocortex, enables us to obtain the higher cognitive abilities. One of the principle factors for the neocortical expansion in evolution is increasing neurons followed by progenitor cell expansion. Recently, we have identified a human specific gene *ARHGAP11B* which expresses higher in the neural progenitor cells in the developmental human neocortex. Ectopic expression of *ARHGAP11B* in the embryonic mouse brain promotes progenitor cell proliferation. Although *ARHGAP11B* has RhoGAP domain, *ARHGAP11B* did not show strong GAP activity for RhoA. This result suggests that the function of *ARHGAP11B* is independent from RhoA signaling. Therefore, it can be speculated that *ARHGAP11B* has novel molecular function for progenitor cell expansion. To understand the novel molecular function of *ARHGAP11B*, firstly we made various truncated mutants of *ARHGAP11B* and examined their effects on the progenitor cell proliferation. Then we identified novel interacting partners that specifically bind to *ARHGAP11B* through the region that has responsibility for the progenitor cell proliferation. Most of the identified proteins are involved in intracellular transport. Now we are analyzing the function of identified interacting partners of *ARHGAP11B* in neocortical development.

研究目的

我々の脳、特に大脳新皮質は進化の過程において顕著な変化を遂げてきた。神経細胞の数に着目すると、ヒト大脳新皮質はマウス大脳新皮質に比べて1000倍もの神経細胞を有していることが知られている。このような神経細胞数の増加は主に2つの要因によって制御されていると考えられている。一つは神経細胞を産生する期間の延長であり、もう一つは神経前駆細胞の多様化と神経前駆細胞数の増加である。本研究では主に後者に着目した。

胎生期大脳新皮質の神経前駆細胞は大別して2種類存在する。脳室帯 (ventricular zone; VZ) に存在し、核が脳室に面した状態で有糸分裂が起こる頂端側神経前駆細胞 (apical progenitor; AP) と主に脳室下帯 (subventricular zone; SVZ) に存在し、核が脳室から離れた状態で有糸分裂が起こる基底側神経前駆細胞 (basal progenitor; BP) である。多数の神経細胞を生み出すには神経前駆細胞の増加が必要になってくる

が、APはその細胞生物学的性質から限られた領域(脳室面)でしか分裂することが出来ないため細胞数の顕著な増加は困難である。しかし、BPはそのような細胞生物学的制約から自由であることから、その細胞数を著しく増加させることが可能であり、進化の過程で増加した神経細胞の主要な産生細胞であると考えられている。実際に、発達期マウス大脳新皮質と比較すると、ヒトを含めた霊長類の発達期大脳新皮質では非常に多くのBPが存在しており、またその増殖能、多様性ともに高いことが知られている。BPの中でも特にbasal radial glial cell (bRGC)と呼ばれるタイプは発達期マウス大脳新皮質ではごくわずかにしか存在しないのに対し、発達期ヒト大脳新皮質ではoSVZ (outer SVZ) に存在するBPの半数以上を占めていること、またそれらの細胞は高い細胞増殖能を持つことが過去の研究より判明している。しかしながら、ヒトbRGCがどのようなメカニズムでそのような高い増殖能を獲得し、その数を増加させ

ているのかに関しては未解明の部分が多い。本研究では、ヒト bRGC の特異性を形作る分子メカニズムを明らかにし、大脳新皮質の進化メカニズムの一端を解明することを目的とした。

研究経過

発達期のヒト大脳新皮質に存在する RGC に特異的な遺伝子を同定するため、我々はまずマウス及びヒトの大脳新皮質より apical RGC (aRGC)、bRGC、neuron を FACS を用いて分離・回収し、それらの細胞におけるトランスクリプトーム解析を行った。その結果ヒト神経細胞には発現しておらず、aRGC 及び bRGC に特異的に発現しており、さらにマウスゲノムには存在していない遺伝子としてヒト特異的な遺伝子 *ARHGAP11B* を同定した。*ARHGAP11B* は進化的に保存されている遺伝子 *ARHGAP11A* から 460 万年前に部分的な遺伝子重複の結果生じた。ヒト亜族とチンパンジー亜族の分岐は大凡 600 万年前と考えられているので、チンパンジーなどの霊長類には存在しないが、現生人類 (*Homo sapiens*) やネアンデルタール人 (*Homo neanderthalensis*) などのヒト属にのみ存在していることになる。実際にネアンデルタール人とデニソワ人のゲノムには *ARHGAP11B* が存在していることが確認されている。

続いて *ARHGAP11B* の神経発生における影響を調べるために、子宮内電気穿孔法を用いて胎生期 13 日目のマウス大脳新皮質に *ARHGAP11B* を導入した。遺伝子導入 1 日後に対照群と比較すると、*ARHGAP11B* 過剰発現群では有意に BP の細胞増殖が促進されていた。また、BP の形態を詳細に解析すると、通常のマウス SVZ に存在する多極性の細胞ではなく、一本の長い突起を持つ細胞の割合が増加していることも判明した。この形態は発達期ヒト脳に多く存在している bRGC と非常に良く似ていることから、*ARHGAP11B* 過剰発現はマウス神経前駆細胞の「ヒト化」を促進していることが示唆された。

それでは *ARHGAP11B* はどのような分子メカニズムで神経前駆細胞の増殖を制御しているのであろうか? *ARHGAP11B* のコピー元の遺伝子である *ARHGAP11A* は低分子量 G 蛋白質 RhoA の活性を抑制することが知られている。そこで *ARHGAP11B* の RhoA 活性に与える影響を RhoA のエフェクターである Rho キナーゼの基質 MYPT1 のリン酸化を指標にして調べたところ、*ARHGAP11B* は MYPT1 のリ

ン酸化を抑制しないことが明らかとなった。この結果は *ARHGAP11A* と異なり *ARHGAP11B* には RhoA 活性を抑制する分子機能が欠失していることを示している。これは部分的な遺伝子重複の結果生じた GAP (GTPase-activating protein) ドメインの C 末領域欠損の為だと考えられる。

上記の結果より、*ARHGAP11B* が BP 細胞増殖を促進するメカニズムはコピー元の遺伝子機能から予測されるものではなく、全く新規のメカニズムであることが示唆された。そこで *ARHGAP11B* の BP 細胞増殖促進に重要な領域の同定を試みた。複数の *ARHGAP11B* 変異体を作成し、子宮内電気穿孔法を用いて前述と同様な実験を行ったところ、BP 細胞増殖を促進しない変異体を複数見出すことが出来た。続いて、それらの領域に未知の相互作用分子が結合することにより *ARHGAP11B* が BP 細胞増殖を促進している可能性を考え、新規相互作用分子の同定を免疫沈降法および質量分析法により試みた。その結果、多数の *ARHGAP11B* 結合分子を新たに同定することが出来た。同定された相互作用分子の多くは細胞内分子輸送に関連していた。今後はそれらの相互作用分子と *ARHGAP11B* が結合することによってどのような役割を神経発生・進化において担っているのかを中心に解析してゆく予定である。

考察

我々の脳の進化を単一の遺伝子、シグナル伝達系に結び付けるのはおおよそ現実的な考えではない。本研究課題のように一つの遺伝子発現に着目し、その解析を行った場合、それは進化の過程で起こったある限られた局面のみを明らかにしただけであるともいえる。しかしながら、本研究課題で明らかにしつつある *ARHGAP11B* の役割は予想以上に幅広い可能性が持ち上がってきた。本研究で同定された *ARHGAP11B* 新規結合分子は非常に多岐にわたっており、それらは細胞内の様々な分子輸送に関わっていることが知られている。現在我々は、*ARHGAP11B* は多種多様な細胞内分子輸送関連分子に影響を及ぼすことで、複数のシグナル伝達系のハブとしての役割を担っているという可能性を考えている。

一般的に遺伝子重複によって生まれた遺伝子は選択圧から解放され、コピー元の遺伝子機能にとらわれる必要がないと考えられている。本研究において同定した *ARHGAP11B* はその典型例であるともいえ

る。大元の RhoAGAP という比較的限られた機能を失った代わりに、多様な細胞内分子輸送経路を制御しうる構造を持つに至ったという事実は、ARHGAP11B が今後さらに研究を進めてゆくべき分子であることを強く示唆するものである。今後は ARHGAP11B がどのように細胞内輸送に影響を及ぼし、脳発生・進化を制御しているのかについて、網羅的に解析してゆく予定である。

研究の発表

口頭発表

誌上発表

1. Florio M, Albert M*, Taverna E*, **Namba T***, Brandl H, Lewitus E, Haffner C, Sykes A, Wong FK, Peters J, Guhr E, Klemroth S, Prüfer K, Kelso J, Naumann R, Nüsslein I, Dahl A, Lachmann R, Pääbo S and Huttner WB. Human-specific gene ARHGAP11B promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. Science 347:1465-1470, 2015. (*equally contributed)
2. Florio M, **Namba T**, Long K. The tortuous routes of migrating neurons in the folding neocortex. J Neurosci. 36:3887-3889, 2016