

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2005～2009

課題番号：17107004

研究課題名(和文) 神経突起形成のマスター分子 Protrudin の発見と機能解析

研究課題名(英文) Isolation and characterization of protrudin, a master regulator of neurite formation

研究代表者

中山 敬一 (Nakayama Keiichi)

九州大学・生体防御医学研究所・主幹教授

研究者番号：80291508

研究成果の概要(和文): 神経細胞は、神経突起と呼ばれる突起を有している。われわれは中枢神経系に高発現している新規タンパク質 Protrudin を同定し、このタンパク質が神経細胞の突起形成を促すマスター分子であることを突き止めた。さらにこのタンパク質が突起を形成する分子メカニズムを明らかにした。Protrudin は膜リサイクリングに関わる Rab11 の GDP 型とリン酸化依存的に結合し、Protrudin の発現抑制は神経突起伸長を阻害した。つまり Protrudin は Rab11 依存的な膜リサイクリングを制御することによって神経突起伸長に必要な指向性膜輸送をコントロールしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文): Guanosine triphosphatases (GTPases) of the Rab family are key regulators of membrane trafficking, with Rab11 playing a specific role in membrane recycling. We identified a protein, protrudin, that promoted neurite formation through interaction with the guanosine diphosphate (GDP)-bound form of Rab11. Phosphorylation of protrudin by extracellular signal-regulated kinase (ERK) in response to nerve growth factor promoted its association with Rab11-GDP. Down-regulation of protrudin by RNA interference induced membrane extension in all directions and inhibited neurite formation. Thus protrudin regulates Rab11-dependent membrane recycling to promote the directional membrane trafficking required for neurite formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	13,500,000	4,050,000	17,550,000
2006年度	12,800,000	3,840,000	16,640,000
2007年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2008年度	21,300,000	6,390,000	27,690,000
2009年度	21,300,000	6,390,000	27,690,000
総計	85,900,000	25,770,000	111,670,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：神経細胞、神経突起、膜輸送、G タンパク質、リン酸化、神経成長因子

## 1. 研究開始当初の背景

脳虚血、脳挫傷、脊髄損傷といった神経損

傷において損傷神経軸索再生の分子機構を解明することは重要な問題である。神経軸索

は1メートル以上にもなりうる特殊な細胞突起であり、その形成は神経細胞に特有の現象である。著しい細胞突起伸長は必然的に細胞表面積の増大を伴うため、突起先端に選択的に膜成分を輸送する必要があるが、その分子機構や神経特異性についてはほとんど不明であった。

## 2. 研究の目的

われわれは神経突起形成因子として Protrudin を発見した。本研究ではこの Protrudin の生物学的な作用を細胞レベル・個体レベルで詳細に解析し、神経軸索突起形成の分子機構を明らかにする。また、損傷神経において、Protrudin による神経軸索突起形成誘導により、人工的に損傷神経の保護、再生を促進することを試みる。

## 3. 研究の方法

Protrudin の分子生物学的、生化学的、細胞生物学的解析よりその構造機能連関を解析すると共に、Protrudin 遺伝子改変動物を作製して、遺伝学的な解析を行う。さらにヒト疾患との関わりについても検討を行い、最終的に神経再生モデルにおいてこの分子の有効性を検討する。

## 4. 研究成果

神経突起が形成されるためには、細胞内の膜成分が突起形成部位に限定して供給されなければならない。その突起への膜成分の供給は、細胞膜のリサイクルを介してなされていることが既に知られていた。細胞膜のリサイクルとは、細胞膜の一部が細胞内に取り込まれて(エンドサイトーシス) リサイクルエンドソームという細胞内小器官にいったん回収され、再び特異的な部位に向けて分泌される(エキソサイトーシス)システムである。私は、このリサイクルシステムを制御することにより神経突起形成を誘導する活性を持つ新規のタンパク質 Protrudin を発見した。Protrudin は神経細胞以外の細胞に発現させると神経突起に似た突起を形成させる作用を持つ(図1)。

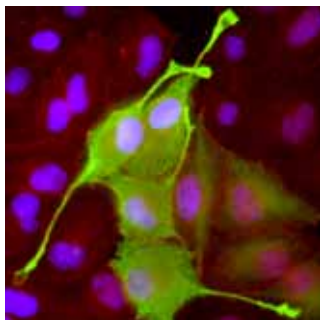


図1 HeLa細胞にProtrudinを強制発現すると神経細胞に似た突起を形成する

Protrudin の組織発現分布を調べたところ、脳、脊髄などの中枢神経系に高い発現が認められた。さまざまな細胞株において Protrudin の発現レベルを比較すると、PC12細胞などの神経細胞株で高い発現が認められた。

また、マウス脳神経の初代培養細胞において Protrudin の細胞内発現分布を観察すると、細胞周縁の細胞膜や核に近接した中心体近傍、さらに神経突起先端の成長円錐に強い発現が認められた。PC12細胞は神経成長因子 NGF を添加すると神経突起を形成する。PC12細胞に NGF を添加すると、初め細胞質全体に分散していた Protrudin は、数時間後にいったん中心体近傍に強く蓄積し、その後突起の伸長と共に突起先端へと移動する、という特徴的な局在変化が観察された。また中心体近傍の Protrudin が集積する部位は、Rab11 が局在するリサイクルエンドソームという細胞内小器官であった。

神経細胞において RNAi により Protrudin のタンパク質発現を低下(ノックダウン)させたところ、NGF 添加による神経突起形成が阻害された。よって Protrudin は神経突起の形成に必要なタンパク質であることがわかった。現在までにわかっている Protrudin の突起形成メカニズムは次のとおりである(図2)。

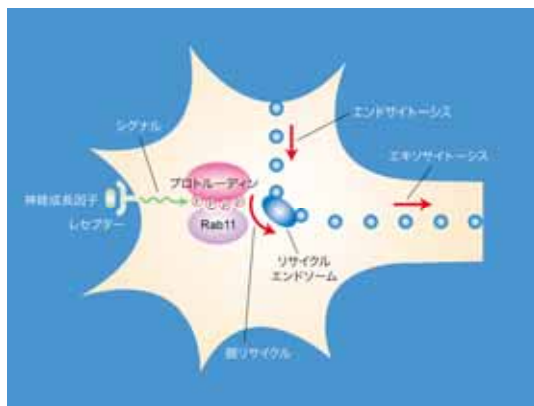


図2 Protrudin が突起を誘導する分子メカニズム

- 1) 神経成長因子などの神経分化への誘導シグナルが細胞表面の受容体に結合する
- 2) その信号に応じてプロトルーディンがリン酸化される
- 3) リン酸化されたプロトルーディンが Rab11 という細胞膜のリサイクルを制御するタンパク質と結合する
- 4) それに伴い、突起形成部位への細胞膜成分のリサイクル輸送が促進される
- 5) その結果、神経突起形成が誘導される

Protrudin は N 末端側に Rab11 結合ドメイン、C 末端側に FYVE ドメインを有するが、この FYVE ドメインは代表的な FYVE ドメインタ

ンパク質である EEA1 の FYVE ドメインは構造的に異なる非典型的なものである。EEA1 の FYVE ドメインは PI(3)P に結合しエンドソーム融合に関わるが、プロトルーディングの FYVE ドメインは PI(3)P への結合に重要なアミノ酸が保存されておらず、また局在も初期エンドソームとは全く異なるため、全く新しい機能を有することが推定された。その後の研究において、Protrudin が FYVE ドメインを介して硫酸化脂質と結合すること、さらにその結合が Protrudin の機能に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 118 件)

Tsukada, Y., Ishitani, T., Nakayama, K. I.: KDM7 is a dual demethylase for histone H3 Lys 9 and Lys 27 and functions in brain development. *Genes Dev.*, 24: 432-437 (2010).

Lin, H. K., Chen, Z., Wang, G., Nardella, C., Lee, S. W., Chan, C. H., Yang, W. L., Wang, J., Egia, A., Nakayama, K. I., Cordon-Cardo, C., Teruya-Feldstein, J., Pandolfi, P. P.: Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature*, 464: 374-379 (2010).

Chan, C. H., Lee, S. W., Li, C. F., Wang, J., Yang, W. L., Wu, C. Y., Wu, J., Nakayama, K. I., Kang, H. Y., Huang, H. Y., Hung, M. C., Pandolfi, P. P., Lin, H. K.: Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nature Cell Biol.*, (2010).

Wang, H., Bauzon, F., Ji, P., Xu, X., Sun, D., Locker, J., Sellers, R. S., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Cobrinik, D., Zhu, L.: Skp2 is required for survival of aberrantly proliferating Rb1-deficient cells and for tumorigenesis in Rb1<sup>+/-</sup> mice. *Nature Genet.*, 42: 83-88 (2010).

Nishiyama, M., Oshikawa, K., Tsukada, Y., Nakagawa, T., Iemura, S., Natsume, T., Fan, Y., Kikuchi, A., Skoultchi, A. I., Nakayama, K. I.: CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis. *Nature Cell Biol.*, 11: 172-182 (2009).

Lin, H. K., Wang, G., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Liu, Y., Chan, C. H., Yang, W. L., Erdjument-Bromage, H., Nakayama, K. I., Nimer, S., Tempst, P., Pandolfi, P. P.: Phosphorylation-dependent regulation of cytosolic localization and

oncogenic function of Skp2 by Akt/PKB. *Nature Cell Biol.*, 11: 420-432 (2009).

Susaki, E., Nakayama, K., Yamasaki, L., Nakayama, K. I.: Common and specific roles of the related CDK inhibitors p27 and p57 revealed by a knock-in mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106: 5192-5197 (2009).

Onoyama, I., Tsunematsu, R., Matsumoto, A., Kimura, T., de Alboran, I. M., Nakayama, K., Nakayama, K. I.: Conditional inactivation of Fbxw7 impairs cell-cycle exit during T cell differentiation and results in lymphomatogenesis. *J. Exp. Med.*, 204: 2875-2888 (2007).

Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Ide, T., Saya, H., Hara, E.: Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nature Cell Biol.*, 8: 1291-1297 (2006).

Shirane, M., Nakayama, K. I.: Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. *Science*, 314: 818-821 (2006).

##### [学会発表](計 180 件)

Nakayama, K. I. Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship in ubiquitylation by differential proteomics: Say good-bye to western blotting. Biology of the ubiquitin and the ubiquitin-like systems. Jerusalem. (3/14, 2010).

Nakayama, K. I., Yumimoto, K., Matsumoto, M. Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship by differential proteomics. The 4th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. Onna, Okinawa, Japan. (12/2, 2009).

Nakayama, K. I. Two F-box proteins Skp2 and Fbw7 control cell cycle exit and re-entry. ZOMES V: The Fifth International Symposium on the COP9 signalosome, Proteasome, and eIF3: At the interface between signaling & proteolysis. Yokohama. (11/12, 2008).

Nakayama, K. I. Cell cycle control during T-cell development. Japan-German Immunology Seminar "International Conference on Immune Regulation in Health and Disease". Fukuoka. (11/5, 2008).

中山敬一, 白根道子. プロトルーディングは Rab11-GDP に結合し、特定の方向へ向かう膜輸送により神経突起形成を起こす. 第 60 回日本細胞生物学会大会. 横浜. (6/30, 2008).

Nakayama, K. I., Onoyama, I., Tsunematsu, R., Matsumoto, A., Nakayama, K. Conditional inactivation of Fbxw7 results in a defect in cell cycle exit and tumorigenesis. Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle". Cold Spring Harbor, NY. (5/18, 2008).

Nakayama, K. I. Fbw7 is required for G0 maintenance and tumor suppression: Lessons from a series of conditional knockout mice. The Second International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. Onna, Okinawa, Japan. (3/26, 2007).

Nakayama, K. I. Fbw7 is a key regulator of cell cycle exit during development. US-Japan Cooperative Research Workshop on Mouse Models for Cell Cycle and Ubiquitin-mediated Degradation. Frederick, MD, USA. (9/7, 2006).

Nakayama, K. I., Onoyama, I. Fbw7 is a key regulator of cell-cycle arrest and tumorigenesis during development. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Kyoto, Japan. (6/23, 2006).

Nakayama, K. I., Shirane, M. Protrudin-Rab11 system regulates directional membrane traffic to induce neurite formation. International Symposium on "Membrane Dynamics and Cell Regulation". Fukuoka. (6/29, 2005).

〔図書〕(計2件)

中山敬一, 中山啓子. 細胞周期: 細胞増殖の制御メカニズム. 細胞周期: 細胞増殖の制御メカニズム (中山敬一, 中山啓子 編) pp. メディカル・サイエンス・インターナショナル (東京). (2008).

中山敬一. 細胞周期ブレーキ p27 の分解と発がん. 発がんの分子機構と防御 (笹月健彦, 野田哲生 編) pp. 120-134. 東京大学出版会 (東京). (2006).

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: タンパク質の定量方法  
発明者: 中山敬一、松本雅記  
権利者: 国立大学法人九州大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2009-169045  
出願年月日: 21年7月17日  
国内外の別: 国外

名称: 抗肥満薬のスクリーニング方法  
発明者: 中山敬一、洲崎悦生  
権利者: 国立大学法人九州大学

種類: 特許  
番号: 特願 2006-160965  
出願年月日: 18年6月9日  
国内外の別: 国外

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 敬一 (Nakayama Keiichi)

九州大学・生体防御医学研究所・主幹教授  
研究者番号: 80291508

(2) 研究分担者

白根 道子 (Shirane Michiko)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授  
研究者番号: 90398082

(3) 連携研究者

なし