

平成21年 5月28日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18500253

研究課題名(和文) 脳特異的キナーゼ AATYK による神経突起伸長の分子機構の解明

研究課題名(英文) Neuronal growth mechanisms by brain specific kinase, AATYK

研究代表者

友村 美根子 (TOMOMURA MINEKO)

独立行政法人理化学研究所・神経成長機構研究チーム・客員主管研究員

研究者番号：30217559

研究成果の概要：

AATYK (Apoptosis-associated tyrosine kinase) の神経突起伸長作用の機構を解明すべく、AATYK 結合タンパクとしてクラスリンアダプタータンパク AP-2 を同定した。キナーゼ欠損型 AATYK 発現細胞や AATYK ノックダウンした細胞ではトランスフェリン及び神経特異的接着分子 L1 のエンドサイトーシスが減少した。AATYK は AP-2 と結合しクラスリン依存性エンドサイトーシスを制御することにより、神経突起伸長に関与すると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：発生・発達・再生神経科学

1. 研究開始当初の背景

AATYK はチロシンキナーゼドメインと高いホモロジーを持つにもかかわらず、高いセリンスレオニン活性を示すユニークなキナーゼで、N 末端のパルミチン化で膜に結合している。脳に多く発現しており、神経細胞の突起部のみならず成長円錐部にも豊富に検出される。AATYK を未熟な培養神経細胞で発現させると神経突起伸長を促進した。また Cdk5/p35 およびフォスファターゼ PP1C と結合するタンパクとしても AATYK が同定された (Wang et al. JBC 2002, Kesavapany et al. 2003, JNS, Honma et al. BBRC 2003) が、

いまだ生物学的意義は解明されていない。よって AATYK の突起伸長作用のメカニズムを解明することは、AATYK 自身のシグナルカスケードを明らかにするのみならず、神経回路形成機構を理解する上で有意義と考える。

2. 研究の目的

本研究は AATYK の神経突起伸長作用に焦点を絞り、その分子機構を明らかにすることを目的とする。さらに神経突起伸長機構及び神経回路形成と維持、その破綻としての神経変性・細胞死について新しい知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

1) AATYK と相互作用するタンパク質の同定

GST融合AATYKのグルタチオンアフィニティーカラムを作製した。脳抽出液を流し結合するタンパクを溶出した。SDS-PAGE 後、切り出したバンドのタンパク質をトリプシン消化しMALDI TOF-MS につけてタンパク質を同定した。

2) トランスフェリンのエンドサイトーシス実験

NG108細胞にAATYK発現ベクターあるいはsiRNAを導入24時間後、Alexa-488標識トランスフェリンを15分間取り込ませた。蛍光顕微鏡下で取り込まれたトランスフェリンを観察した。細胞可溶化後、取り込まれたトランスフェリンを蛍光光度計で定量した。

3) ビオチンラベル L1のエンドサイトーシス

NG108細胞と小脳顆粒細胞にベクター(V)、野生型AATYK(wt)、キナーゼ欠損AATYK(mc)を発現させた。細胞表面をビオチンで標識した後、37 °Cで15分間インキュベートした。細胞表面のビオチンラベルL1をグルタチオンでストリップした。エンドサイトーシスされたL1をアビジンビーズで回収後、L1抗体でウェスタンブロットを行った。

4. 研究成果

(1) はじめに

AATYKは神経細胞の分化成熟とともに発現が増加する。培養1日目の小脳顆粒細胞にキナーゼ欠損型AATYKを発現させると神経突起の伸長が抑制される(図1)。その機構を明らかにするために、AATYKと相互作用するタンパク質の探索と同定を行った。

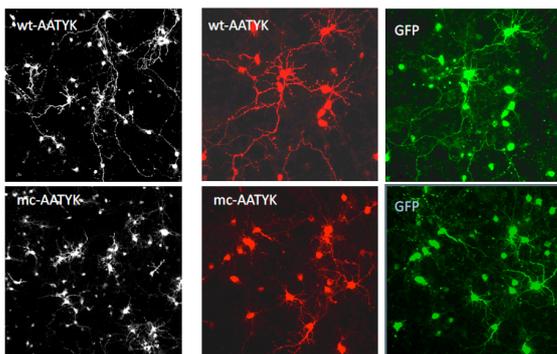


図1 キナーゼ欠損型のAATYK(mc-AATYK)は小脳顆粒細胞の神経突起伸長を抑制する。

(2) AATYKはクラスリンアダプターAP-2と相互作用している。

GST融合AATYKビーズを用いて、AATYKに結合するタンパク質をマウス脳抽出液からpull downした。MS解析の結果、クラスリンアダプターAP-2コンプレックスを同定した。(図2A, B)。両者の結合はAATYK抗体およびAP-2抗体

を用いた免疫沈降法で確認した(図2C)。

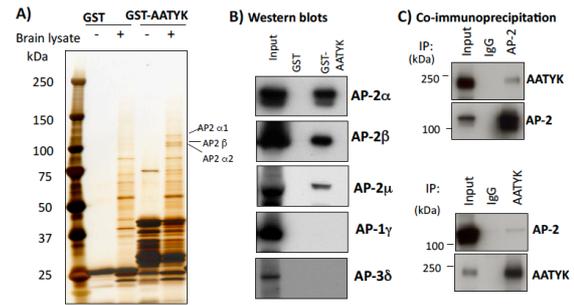


図2 AATYKはAP-2コンプレックスと結合している。A)脳抽出液のGST-AATYK pull down サンプルの銀染色、B)脳抽出液のGST-AATYK pull down サンプルのウェスタンブロット、C)脳抽出液を用いた免疫沈降

次に AP-2 コンプレックスのどのサブユニットと結合しているかを検討した。各サブユニット (AP-2 α , AP-2 β , AP-2 μ) を GST-AATYK で pull down したところ、 α サブユニットと強く相互結合した。

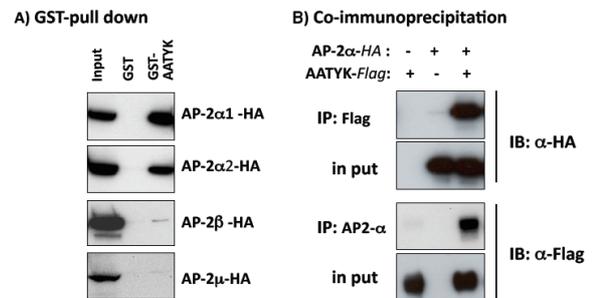


図3 AATYK は AP-2 α サブユニットと結合する。A)HECK 293 細胞に各 AP-2 サブユニット分子を発現させ、GST-AATYK で pull down 後、HA 抗体でウェスタンブロットを行った。B)HECK 293 細胞に AP-2 α と AATYK を発現させ、免疫共沈殿を行った。

(3) AATYK はエンドサイトーシス小胞に存在する。

次にAATYKの細胞レベルでの局在について検討した。野生型のAATYKはクラスリンと細胞膜で共局在していることを全反射顕微鏡を用いたエバネッセント光で確認した。しかしキナーゼ欠損型AATYKではクラスリンとの共局在は認められなかった。(図4)。また野生型のAATYKはエンドサイトーシスされた蛍光標識トランスフェリンとも共局在することから(図5)、AATYKはクラスリン依存性エンドサイトーシス小胞に存在することが明らかになった。

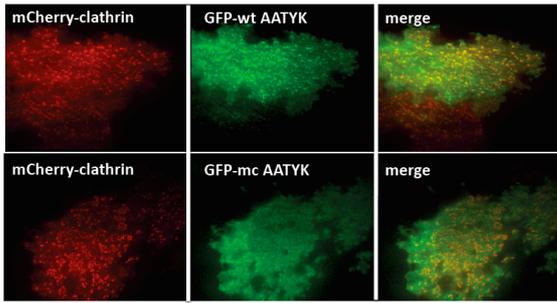


図4 AATYKは細胞膜上でクラスリン被覆ピット、小胞と共局在する。GFP-wtAATYK(野生型)およびGFP-mcAATYK(キナーゼ欠損型)をmCherry-クラスリンと共発現させ、エパネッセント光で観察した。

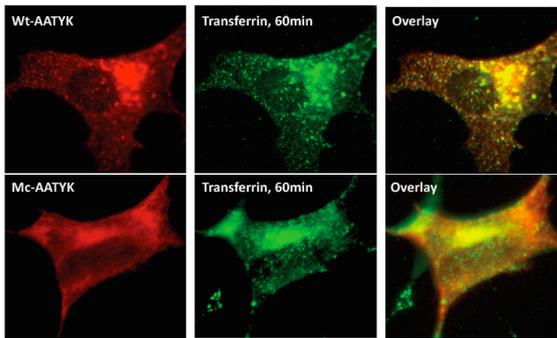


図5 野生型AATYKはエンドサイトーシスされたトランスフェリンと共局在する。NG108細胞に野生型Wt-AATYKまたはキナーゼ欠損Mc-AATYKを発現後、Alexa-488標識トランスフェリンを取り込ませ、AATYKの免疫染色を行った。

(4) AATYK はエンドサイトーシスを促進する。

次にAATYKがエンドサイトーシスを制御するかどうか、トランスフェリンの細胞への取り込みにおけるAATYKの効果を調べた。AATYK-siRNAを導入してAATYKをノックダウンしたNG108細胞では、コントロール細胞に比べてトランスフェリンの取り込みが減少していた(図6)。

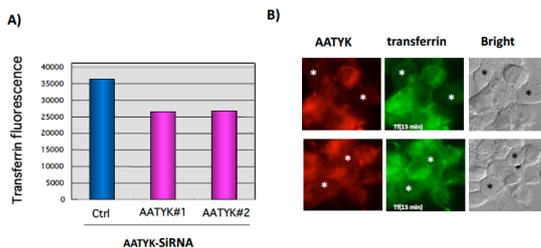
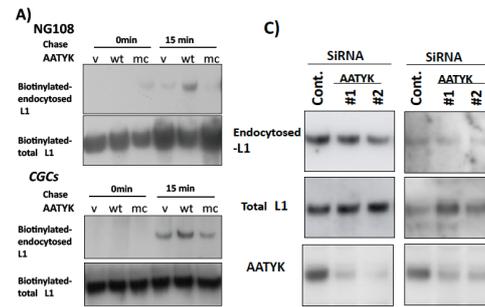


図6 AATYKのノックダウン細胞ではトランスフェリンの取り込みが減少する。NG108細胞にコントロール(Ctrl)またはAATYK-siRNA(AATYK#1, AATYK#2)を導入24時間後、Alexa-488標識トランスフェリンを15分間取り込ませた。A)細胞抽出液のトランスフェリンの蛍光強度、B) AATYKノックダウン細胞(*)の蛍光トランスフェリン

スフェリンの蛍光強度、B) AATYKノックダウン細胞(*)の蛍光トランスフェリン

神経細胞の突起伸長過程において、神経細胞特異的接着因子L1のエンドサイトーシスとリサイクルが重要である。(Kamiguchi H and Lemmon V. JNR 1997)。そこでL1のエンドサイトーシスにおけるAATYKの効果を調べた。野生型のAATYKを発現させた細胞ではL1の取り込みが増加していたが、キナーゼ欠損型では取り込みが減少していた(図7A, B)。またAATYKノックダウン細胞では、L1の取り込みが減少していた(図7C)。以上のことから、AATYKはL1のエンドサイトーシスに関わっていることが示された。



B)

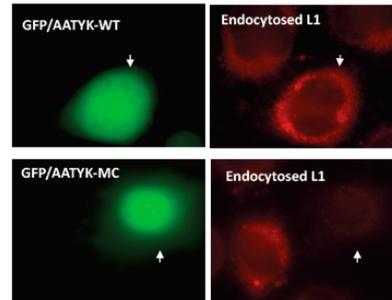


図7 AATYKはエンドサイトーシスを制御する。A) NG108細胞と小脳顆粒細胞にベクター(V)、野生型AATYK(wt)、キナーゼ欠損AATYK(mc)を発現させた。細胞表面をビオチンで標識した後、37°Cで10分間インキュベートした。エンドサイトーシスされたL1をアビジンビーズで回収後、L1抗体でウェスタンブロットを行った。B) AATYKとGFPを共発現させたNG108細胞をL1抗体でラベルした。37°Cで10分間インキュベート後、表面L1抗体を非標識2次抗体でブロックした。エンドサイトーシスされたL1抗体をAlexa-594標識2次抗体で検出した。C) NG108細胞にコントロールまたはAATYK-siRNAを導入。24時間後に細胞表面をビオチンで標識した後、37°Cで10分間インキュベートした。エンドサイトーシスされたL1をアビジンビーズで回収後、L1抗体およびAATYK抗体でウェスタンブロットを行った。

(5) おわりに

以上の結果から、AATYKはAP-2と結合しクラスリン依存性エンドサイトーシスを制御していることが明らかとなった。おそらくAATYK

はL1分子等のエンドサイトーシスを促進し、膜へのリサイクルを高めることにより神経突起伸長に関わっている可能性が示唆された。本研究でAATYKがエンドサイトーシスを制御する新たなキナーゼであることが明らかとなった。今後、AATYKはエンドサイトーシスのどのステップに関与しているのか、リン酸化ターゲットは何か明らかにされるであろう。

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 2件)

- ① Tomomura M, Morita N, Yoshikawa F, Konishi A, Akiyama H, Furuichi T, and Kamiguchi H: Structural and functional analysis of the apoptosis-associated tyrosine kinase (AATYK) family. *Neuroscience*. 148(2):510-521. (2007) 査読有り
- ② Tsutsumi K, Tomomura M, Furuichi T and Hisanaga S: Palmitoylation-dependent endosomal localization of AATYK1A and its interaction with Src. *Genes to cells* 13(9):949-964. (2008) 査読有り

[学会発表] (計 5件)

- ① Tsutsumi K, Tomomura M, Asada A, Saito T, and Hisanaga S: Palmitoylation of brain-enriched protein kinase AATYK regulates its membrane localization and interaction with Src family kinases. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006 Jun, Kyoto
- ② 友村美根子、上口裕之: 脳に発現しているキナーゼ AATYK の機能解析—相互作用分子の解析から—、第 29 回日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006 年 12 月、名古屋
- ③ Tomomura M, Furuichi T and Kamiguchi H: Structural and functional analysis of the apoptosis-associated tyrosine kinase AATYK family. The 7th IBRO world congress of Neuroscience, 2007 July, Australia.

- ④ Tsutsumi K, Tomomura M and Hisanaga S: Palmitoylation of AATYK regulates its membrane associated and interaction with Src kinase.

The 37th annual meeting of Society for Neuroscience. 2007 Nov, SanDiego, USA

- ⑤ 友村美根子、上口裕之: 膜結合キナーゼ AATYK はクラスリン依存性エンドサイトーシスに関与する。第 81 回 日本生化学会大会、第 31 回 日本分子生物学会年会合同大会、2008 年 12 月、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

友村 美根子 (TOMOMURA MINEKO)
独立行政法人理化学研究所・神経成長機構
研究チーム・客員主管研究員
研究者番号: 30217559