

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月16日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22240038

研究課題名（和文）小胞輸送制御分子プロトルーディンの神経機能における役割の解明

研究課題名（英文）Deciphering the role of protrudin regulating neuronal vesicular transport

研究代表者

中山 敬一（NAKAYAMA KEIICHI）

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80291508

研究成果の概要（和文）：我々は神経細胞において細胞内小胞輸送を制御するプロトルーディンについて、その構造機能連関を解明した。プロトルーディンは RBD11 ドメインにおいて Rab11 と結合し、FFAT モチーフ付近で VAP と KIF5 と結合し、さらに非典型的 FYVE ドメインにおいてスルファチドや PI(5)P と結合していることが明らかとなった。またプロトルーディンの欠損マウスを作製し、その解剖学的、生理学的異常を解析することによって、プロトルーディンが神経細胞内の小胞輸送に重要な貢献をしていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We investigated the structure-function relationship of protrudin that regulates intracellular vesicle transport in neurons. Protrudin interacts with Rab11 through the RBD11 domain, with VAP and KIF5 through the FFAT motif, and sulfatide and PI(5)P through the atypical FYVE domain. We also created mice deficient in protrudin and found that anatomical and physiological alterations in the mutant mice, suggesting that protrudin contributes to vesicular trafficking in neuronal cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	12,500,000	3,750,000	16,250,000
平成23年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
平成24年度	14,800,000	4,440,000	19,240,000
年度			
年度			
総計	38,400,000	11,520,000	49,920,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経、細胞内輸送、低分子 G タンパク質、シナプス、高次脳機能

### 1. 研究開始当初の背景

神経細胞は他の細胞には見られない形態的・機能的特徴を有するが、その特異性は細胞内小胞輸送機構にあると考えられている。例えば神経細胞は長い突起を有するが、これは膜リサイクリングによって形質膜を特定の部位に輸送するために生じる。このような細胞内小胞輸送は Rab ファミリーで制御されており、特に Rab11 は細胞内小胞リサイク

リングに重要であると考えられてきた。

我々は Rab11 に結合し、細胞内小胞輸送を制御するプロトルーディンというタンパク質を発見し、これが神経細胞内の膜リサイクリングに重要な役割を果たしていることを示してきた [Shirane & Nakayama, *Science* 314: 818-21 (2006)]。プロトルーディンは、NGF などのシグナルに応答してリン酸化されると Rab11 と結合し、その結果膜リサイク

リングを促進する。これまでの解析から、プロトルーディンは小胞輸送制御を介して神経突起形成やシナプス成熟に関与していることが明らかになっている。

プロトルーディンは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。これは代表的なFYVEドメインタンパク質であるEEA1と類似した構造である。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、プロトルーディンのFYVEドメインは非典型的で、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。

近年、プロトルーディンの点突然変異がヒトの常染色体優性遺伝性痙性対麻痺 (autosomal dominant hereditary spastic paraplegia: AD-HSP) で見つかった。AD-HSPを引き起こす原因遺伝子はSpastinやKIF-5など数多く報告されているが、その多くは細胞内小胞輸送に関わる分子群であり、プロトルーディンとの機能的な関連が予想されている。

## 2. 研究の目的

我々が発見したプロトルーディンは、Rab11依存性の細胞内小胞輸送を制御する膜タンパク質である [*Science* 314: 818 (2006)]。予備的な研究によって、プロトルーディンのFYVEドメインが短鎖スルファチドに結合すること、プロトルーディンのノックアウトマウスはスルファチド合成酵素ノックアウトマウスと酷似した神経機能障害を示すことが明らかになっている。本研究では、プロトルーディンが個体内において神経細胞の機能維持に果たす役割の解明、プロトルーディンと膜脂質との結合が小胞輸送へ果たす役割の解明、プロトルーディン変異によるヒト疾患 (遺伝性痙性対麻痺) における発症機序の解明、を目的とした。

これらの項目に対応する具体的な戦略目標は以下の3つである。

(1) プロトルーディンのFYVEドメイン (アミノ酸配列が非典型的であることが既に判明している) の結合分子は何か? その結合がプロトルーディンの小胞輸送制御に果たす役割は?

(2) プロトルーディンが欠損すると神経機能にどのような異常が現れるのか? それはFYVEドメインと結合する標的と何か関連があるのか?

(3) ヒトで発見されているプロトルーディン遺伝子の変異は、プロトルーディン機能にどのような影響を与えるのだろうか? それが疾患につながるメカニズムは何か?

これらの項目について、分子細胞レベルと

個体レベルで総合的な研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

(1) プロトルーディンのFYVEドメインに結合する分子の同定。まずプロトルーディンの非典型的FYVEドメイン (\*FYVE) に結合する分子「X」を同定するため、リコンビナント\*FYVEを作製し、PI(3)Pに類似する各種脂質をプロットした膜に反応させてXの候補分子をスクリーニングする。次に実際の脳抽出液においてプロトルーディンとその候補分子の結合を確認する。

(2) Xの分布や動態の可視化。プロトルーディンFYVEドメインを蛍光分子に融合させて分子プローブとし、神経細胞内における短鎖スルファチドの分布や動態を可視化し、時空間的な観察を行う。

(3) プロトルーディンノックアウトマウスの作製と解析。既に前段階研究においてノックアウトマウスの作製には成功した。まだ十分な解析は行っていないが、ヒト遺伝性痙性対麻痺と類似した下肢の麻痺を主徴とする運動機能障害を呈することは判明している。このマウスにおける詳細な形態学的・機能的異常について解析を行う。

(4) ヒト遺伝性痙性対麻痺に関わる分子群との関係性の解明。報告されている遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子産物に対し、プロトルーディンとの生化学的・遺伝学的な相互作用、局在の一致性等を検討し、プロトルーディンの病気への発症メカニズムを探索する。

## 4. 研究成果

プロトルーディンは (Rab 結合ドメイン + FYVE ドメイン) という構造を有し、これは初期エンドソームの融合に関わる分子EEA1と類似した構造を取る。プロトルーディンのFYVEドメインは構造的に非典型的であり、PI(3)Pにはほとんど結合しないことが判明した。その代わりにFYVEドメインは高い特異性を持って硫酸化糖脂質であるスルファチドに結合することが明らかとなった。スルファチドは長鎖型と短鎖型があり、我々はプロトルーディンの生理的な結合分子として短鎖スルファチドを同定した。次にこの結果を確認するため、脳抽出液から各種膜脂質を調製し、薄層クロマトグラフィーによって展開、プロットした後、その転写膜にFLAG-FYVEを反応させ、FLAG抗体にて可視化を行った。同時にコントロールとして精製したスルファチド、ラクツシルセラミド (スルファチドから硫酸基を除いたもの) 等を置き、FLAG-FYVEの特異性を確認すると共に、脳抽出物中の反応物の薄層クロマトグラフィーにおける移動度が精製スルファチド同じであることを確認した。

さらにその後の解析からプロトルーディ

ンの非典型的 FYVE ドメインはスルファチドだけでなく、PI(5)Pとも結合することを明らかにした。さらにプロトルーディンを発現させた神経細胞株やトランスジェニックマウスを用いたプロテオミクス解析によって、プロトルーディンの非典型的 FYVE ドメインの結合タンパク質を同定した。その中にPI(4,5)P2を脱リン酸化してPI(5)Pを産生する酵素が含まれていることが判明した。この結合はバリデーションスタディにおいても検出され、高い特異性を有していることが示された。さらに Long-term potentiation (LTP)シグナル依存的に働くタンパク質キナーゼにより、プロトルーディンによるPI(5)P制御作用が増強されることがわかった。その際、FYVEドメインの樹状突起スパインへの局在が強くなることを見いだした。これらのことからプロトルーディンはPI(5)Pとの関わりがあることが推定された。一方、上記プロテオミクス解析によってプロトルーディンはキネシン様モーター分子KIF5とも結合することがわかった。プロトルーディンはKIF5ともRab11とも結合し、その両者を仲立ちするアダプター分子であることが推測された。つまりプロトルーディンはKIF5の cargoesを連結するアダプターとして機能することが明らかとなった。

さらにプロトルーディン遺伝子の一部を破壊したマウスを作製した。このプロトルーディン欠損マウスの海馬神経細胞では、軸索形成異常の他に、樹状突起スパインの成熟異常が認められた。これらの結果より、プロトルーディン複合体による神経細胞内極性輸送の制御機構の詳細が明らかになったと共に、神経機能制御への関与が明らかになった。現在このマウスについて、詳細な行動学的検査を行い、上記の解剖学的異常や生理学的異常が、行動とどのような関連があるのかを解析中である。

## 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60件)

- ① Takeishi, S., Matsumoto, A., Onoyama, I., Naka, K., Hirao, A., Nakayama, K. I.: Ablation of fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. *Cancer Cell*, 23: 347-361 (2013).
- ② Reavie, L., Buckley, S. M., Loizou, E., Takeishi, S., Aranda-Orgilles, B., Ndiaye-Lobry, D., Abdel-Wahab, O., Ibrahim, S., Nakayama, K. I., Aifantis, I.: Regulation of c-Myc ubiquitination controls chronic myelogenous leukemia initiation and progression. *Cancer Cell*, 23: 362-375 (2013).
- ③ Hirano, A., Yumimoto, K., Tsunematsu, R., Matsumoto, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Nakagawa, T., Lanjakornsiripan, D., \*Nakayama, K. I., \*Fukada, Y. (Co-corresponding authors): FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell*, 152: 1106-1118 (2013).
- ④ Saita, S., Shirane, M., Nakayama, K. I.: Selective escape of proteins from the mitochondria during mitophagy. *Nature Commun.*, 4: 1410 (2013).
- ⑤ Okita, Y., Nakayama, K. I.: UPS delivers pluripotency. *Cell Stem Cell*, 11: 728-730 (2012).
- ⑥ Chan, C. H., Li, C. F., Yang, W. L., Gao, Y., Lee, S. W., Feng, Z., Huang, H. Y., Tsai, K. K., Flores, L. G., Shao, Y., Hazle, J. D., Yu, D., Wei, W., Sarbassov, D., Hung, M. C., Nakayama, K. I., Lin, H. K.: The Skp2-SCF E3 ligase regulates Akt ubiquitination, glycolysis, herceptin sensitivity, and tumorigenesis. *Cell*, 149: 1098-1111 (2012).
- ⑦ Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Onoyama, I., Tateishi, Y., Nakayama, K., Nakayama, K. I.: p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 9: 262-271 (2011).
- ⑧ Moroiishi, T., Nishiyama, M., Takeda, Y., Iwai, K., Nakayama, K. I.: The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo. *Cell Metab.*, 14: 339-351 (2011).
- ⑨ Matsuzaki, F., Shirane, M., Matsumoto, M., Nakayama, K. I.: Protrudin serves as an adaptor molecule that connects KIF5 and its cargoes in vesicular transport during process formation. *Mol. Biol. Cell*, 22: 4602-4620 (2011).
- ⑩ Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., Maru, Y., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Suda, T.: p57<sup>Kip2</sup> and p27<sup>Kip1</sup> cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell*, 9: 247-261 (2011).
- ⑪ Katagiri, K., Ueda, Y., Tomiyama, T., Yasuda, K., Toda, Y., Ikehara, S., Nakayama, K. I., Kinashi, T.: Deficiency of Rap1-binding protein RAPL causes lymphoproliferative disorders through mislocalization of p27kip1. *Immunity*, 34: 24-38 (2011).
- ⑫ Onoyama, I., Suzuki, A., Matsumoto, A., Tomita, K., Katagiri, H., Oike, Y., Nakayama, K., Nakayama, K. I.: Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the

- mouse liver. *J. Clin. Invest.*, 121: 342-354 (2011).
- ⑬ Wu, H., Pomeroy, S. L., Ferreira, M., Teider, N., Mariani, J., Nakayama, K. I., Hatakeyama, S., Tron, V. A., Saltibus, L. F., Spyrapoulos, L., Leng, R. P.: UBE4B promotes Hdm2-mediated degradation of the tumor suppressor p53. *Nature Med.*, 17: 347-355 (2011).
- ⑭ Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Gao, D., Tseng, A., Maser, R. S., Zhai, B., Wan, L., Gutierrez, A., Lau, A. W., Xiao, Y., Christie, A. L., Aster, J., Settleman, J., Gygi, S. P., Kung, A. L., Look, T., Nakayama, K. I., DePinho, R. A., Wei, W.: SCF<sup>FBW7</sup> regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature*, 471: 104-109 (2011).
- ⑮ 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.*, 12: 457-467 (2010).
- ⑯ Tsukada, Y., Ishitani, T., Nakayama, K. I.: KDM7 is a dual demethylase for histone H3 lysines 9 and 27 and functions in brain development. *Genes Dev.*, 24: 432-437 (2010).

[学会発表] (計 1 1 1 件)

- ① Nakayama, K. I.: Next-generation proteomics uncovers the secret of cancer. Organelle Homeostasis Research Center: Kick-off Symposium. Fukuoka. (3/22, 2013).
- ② Nakayama, K. I.: Comprehensive and unbiased identification of substrates for ubiquitin ligases by differential proteomics analysis. HUPO 2012 11th World Congress. Boston, MA. (9/12, 2012).
- ③ Nakayama, K. I.: Cell cycle, metabolism, and signal transduction in cancer revealed by next-generation proteomics. 2012 American Association for Cancer Research Annual Meeting. Chicago, USA. (3/31, 2012).
- ④ Nakayama, K. I.: Road to Human Proteome Project: Absolute quantification of all human proteins by large-scale targeted proteomics. France-Japan Cancer Meeting. Montpellier, France. (11/24, 2011).
- ⑤ Nakayama, K. I.: Road to absolute quantification of all human proteins by large-scale targeted proteomics. The 5th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. Onna, Okinawa, Japan. (10/26, 2011).

- ⑥ Nakayama, K. I., Yumimoto, K., Matsumoto, M., Oyamada, K., Moroishi, T.: Comprehensive and unbiased identification of substrates for ubiquitin ligases by differential proteomic analysis. Cold Spring Harbor Symposium "The Ubiquitin Family". Cold Spring Harbor, NY. (5/18, 2011).
- ⑦ Nakayama, K. I., Yumimoto, K., Matsumoto, M.: Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship by proteomics: Say good-bye to western blotting. 6th Global-COE International Symposium: New Horizons for Modern Science - Biology and Medicine at the Crossroads. Fukuoka. (8/19, 2010).

[図書] (計 6 件)

- ① 沖田康孝, 中山敬一: 疾患モデルの作製と利用ーがん。モデル動物利用マニュアル (中村卓郎 編) pp. 188-199. エル・アイ・シー (東京). (2012).
- ② 中山敬一, 蟹江共春: タンパク質分解。イラストで徹底理解するシグナル伝達キーワード事典 (山本雅, 仙波憲太郎, 山梨裕司 編) pp. 203-214. 羊土社 (東京). (2012).
- ③ 諸石寿朗, 中山敬一: ユビキチン。生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール (小幡裕一, 城石俊彦, 芹川忠夫, 田中啓二, 米川博通 編) pp. 199-209. エル・アイ・シー (東京). (2011).
- ④ 松本雅記, 中山敬一: プロテオミクスが拓く細胞周期研究。細胞周期フロンティア (佐方功幸, 稲垣昌樹, 岸本健雄 編) pp. 23-28. 共立出版 (東京). (2010).
- ⑤ 洲崎悦生, 中山敬一: G0 期とその周辺: 細胞周期の停止と再増殖の分子メカニズム。細胞周期フロンティア (佐方功幸, 稲垣昌樹, 岸本健雄 編) pp. 212-217. 共立出版 (東京). (2010).
- ⑥ 松本雅記, 中山敬一: in vitro 安定同位体標識法によるリン酸化の定量解析。実験医学別冊「創薬・タンパク質研究のためのプロテオミクス解析」 (小田吉哉, 長野光司 編) pp. 31-37. 羊土社 (東京). (2010).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 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: 特許権  
 番号: 特願 2009-169045  
 出願年月日: 2009 年 7 月 17 日  
 国内外の別: 国内・国外

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
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・教授

研究者番号：80291508

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし