

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24年3月31日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790184

研究課題名（和文）SAD キナーゼの下流因子が神経細胞極性を制御する分子機構の解析

研究課題名（英文）Molecular mechanism of neuronal polarization mediated by downstream factors of SAD kinases.

研究代表者

岸 将史（KISHI MASASHI）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：60573938

研究成果の概要（和文）：SAD キナーゼは神経細胞極性に中心的な役割を果たすシグナル因子である。我々は、SAD キナーゼが細胞周期の制御に関わる分子のいくつかを *in vitro* でリン酸化するという報告に着目し、それらのリン酸化部位に共通なアミノ酸配列を特定、更にそれを用いたホモロジーサーチを利用することによって、SAD キナーゼの下流因子を二つ同定した。更に、酵母 two-hybrid 法を用い、直接的な結合蛋白を二つ同定した。

研究成果の概要（英文）：The SAD kinases play central roles for neuronal polarization. During this term, we tried bioinformatic identification of proteins with consensus sequences of SAD kinase-mediated phosphorylation. We identified two downstream molecules by this method. We also identified two direct binding partners by yeast two-hybrid screen.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：神経細胞極性化

1. 研究開始当初の背景

発生過程の若い神経細胞は、未分化かつほぼ均質な神経突起を複数伸展させた後、その中から一つだけを長い軸索突起として、また、残りを短い樹状突起として分化するが、この神経突起の分化に伴う非対称性の形成を、神経細胞の極性化と呼ぶ。

米国の Banker 博士らは1980年代後半よりこの軸索突起・樹状突起の形成に伴う神経細胞の極性化に注目し、一連の培養下での細胞生物学的な解析を元に、その確立にはアクチン繊維や微小管といった細胞骨格の制御が最も重要な役割を果たしているという解析結果を報告して来た。彼らは幼若な海馬神経細胞を単離し経時的に観察する培養シス

テムを利用することで、アクチン繊維の脱重合を促す薬剤であるアクチノマイシンDを局所的に与えられた神経突起が極めて高い確率で軸索突起に分化すること、また、その選ばれた突起においては微小管の方向性が一定方向に定まっており、樹状突起におけるランダムに近い方向性を持った微小管とは対照的であるということを示した。これらの結果から、アクチン繊維の安定性が何らかの要因で低下した神経突起が軸索突起として選ばれ、更に微小管の伸展が非対称に促されることで、両突起の運命が決定され極性が確立するというモデルが考えられる。2000年代に入って、どういった分子が軸索突起の選択に関わっているのかという分子的な解析が進められるようになり、微小管の重合に関わる CRMP2 や DOCK7、また、一般的な細胞極性の確立に関わる GSK3beta や Par3/Par6 などのシグナル分子が、伸長中の軸索突起と樹状突起との間で不均等に分布しているという報告がなされ、その中のいくつかについては、神経細胞に過剰発現させると複数の軸索突起を形成するようになるという軸索突起の決定因子である可能性を強く示唆する結果が得られている。これらは神経初代培養の系における RNAi を用いた機能阻害実験によってもその重要性が間違いなく詳細に示されているが、実際に *in vivo* の神経組織内でその必要性が示されているものは少なく、また、ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析では、その重要性に否定的な結果が得られている例も存在し、どのシグナルパスウェイが普遍的に重要であるのかという問題点は未だ解決されていない。我々は、これらの研究とは全く独立に、哺乳類のシナプス形成機構を解析する目的で、線虫に於いてシナプス形成異常を呈する一変異体の責任遺伝子 SAD キナーゼについて、そのマウスホモログの同定

と遺伝子破壊を行った。哺乳類ゲノム中には二つの相同遺伝子が存在したので、両遺伝子について遺伝子欠損マウスを作製、ダブルノックアウトマウスを解析した結果、SAD キナーゼを完全に欠損したマウスは出生後早い段階で死に至り、その神経組織を解剖学的に解析した結果、神経細胞の高度な形態異常、特に軸索突起の形成不全が観察された。その細胞生物学的機序を明らかにするため低密度神経初代培養を行い解析した結果、SAD キナーゼダブルノックアウトマウス由来の海馬神経細胞はどれも同程度の長さの神経突起を有し、両突起分子マーカーの分布パターンも含めて、軸索突起と樹状突起とを区別することができていない、ということが判明した。また、分子レベルでは、SAD キナーゼを欠損した神経細胞に於いて微小管結合蛋白 tau のリン酸化が減少しているということが見出され、SAD キナーゼが微小管のダイナミクスを制御することによって神経細胞の極性を司っているという可能性が示唆された。但し、SAD キナーゼ欠損マウスが神経系の異常を伴う出生後致死となるのに対し、tau 遺伝子破壊マウスの異常は極めて軽度なので、他にも SAD キナーゼの下流に位置する分子の存在が予想される。SAD キナーゼの作用機構については、これまでに、その上流に LKB-1 という蛋白キナーゼが位置し SAD キナーゼを活性化することで突起の伸展を調節し軸索突起の運命を決定しているということが示されているが、逆に神経細胞極性化に直接関わると考えられるような SAD キナーゼの基質分子は未だ報告されていなかった。

2. 研究の目的

神経細胞極性化に直接関わると考えられるような SAD キナーゼの基質分子や結合分子を同定し、その作用機構を解析する。

3. 研究の方法

SAD キナーゼ欠損マウス脳組織由来のリン酸化蛋白質成分と野生型マウス脳組織由来のリン酸化蛋白質成分を二次元電気泳動によって分離、比較し、SAD キナーゼの有無によってリン酸化状態が変化するタンパク質、すなわち SAD キナーゼの基質蛋白や下流蛋白をプロテオミク手法によって網羅的に同定する。また、SAD キナーゼが基質として認識する分子をその認識コンセンサス配列を用いたバイオインフォマティクスの手法によって同定する。最後に酵母 two-hybrid 法によって結合因子の同定を行う。

4. 研究成果

プロテオミクな蛋白解析は費用の面から未だに完結していないが、我々は、SAD キナーゼが細胞周期の制御に関わる分子のいくつかを *in vitro* でリン酸化するという報告に着目し、それらのリン酸化部位に共通なアミノ酸配列を特定、更にそれを用いたホモロジーサーチを利用することによって、SAD キナーゼの下流因子を二つ同定した。これらは *in vitro* に於いて共に SAD キナーゼの直接的な基質となるだけでなく、ショウジョウバエに於いてアクチン線維の動態や神経突起伸展に異常を有する変異体の責任遺伝子や、線虫において神経発生異常、運動異常を呈する変異体の責任遺伝子、と相同であることから、どちらも正常な神経突起の形成に重要な役割を担う分子である可能性が考えられている。また、酵母 two-hybrid 法を用いた結合分子の検索を行ったところ、asparaginase と SAPS2 分子が同定された。後者は特に Protein phosphatase regulatory subunit として同定されたスキャホールド蛋白であり、神経系にも広く発現している。も

しも SAPS2 が SAD キナーゼに結合していれば、SAPS2 は蛋白質リン酸化・脱リン酸化の制御を両者とコンプレックスを形成することにより司っているという機能が考えられる。COS7 細胞に於いて、FLAG-tag のついた SAD キナーゼを SAPS2 と共発現させ M2-agarose によって免疫沈降すると実際に SAPS2 が落ちてくる。従って、この結合は、酵母 two-hybrid 法の転写に関するアーチファクトではない。この結合がどの領域を介した結合であるのかを調べるために双方について deletion mutant を作製した。現在、それを用いた binding assay を遂行中である。これまでの所、Protein phosphatase を含めた 3 者間の共沈は確認されていないが、可能性としては競合的な結合という様式も考えられる。SAPS2 についての siRNA を用いた機神経細胞中の能阻害実験は効果を見せていないが、SAPS ファミリーは SAPS1 から SAPS3 に至るまで神経系に発現しているので、機能的な重複である可能性が考えられる。今後は、他にも候補と考えられる分子が得られているので、それらについても検討を加える。また、SAPS1、SAPS2、SAPS3 の全てをノックダウンした神経細胞の極性化に異常がないかどうか、SAD キナーゼの局在性などの変化がないかどうか詳細に調べる予定である。

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1件)

1. SAD kinases regulate neuronal polarization through Slingshot1 protein phosphatase.

Inutsuka A, Kishi M.

Niigata Medical Journal (査読有)

126 (2), 2012 (in press)

[学会発表](計2件)

1. 第661回新潟医学会特別講演

Slingshot1; a SAD kinases' downstream molecule.

2010年10月16日

発表者 岸 将史

場所 有壬会館

2. 新潟脳神経研究会第289回例会特別講演

Protein Kinases Regulates Development of Neuronal Processes.

2010年2月23日

発表者 岸 将史

場所 新潟大学脳研究所

〔その他〕

ホームページ等

http://www.niigata-u.ac.jp/tenure_track/researcher/kishi_masashi.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸 将史 (KISHI MASASHI)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：60573938

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし