

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590093
 研究課題名（和文） 神経接着分子 L1 の品質管理制御機構 -ユビキチン化と細胞内輸送-
 研究課題名（英文） Spatiotemporal Regulation of Rabex-5 in Endocytic Trafficking of K63-linked Polyubiquitination of L1CAM
 研究代表者
 伊藤 康一 (ITO KOUICHI)
 徳島文理大学・香川薬学部 教授
 研究者番号：3029114

研究成果の概要：

L1CAM が L1CAM 同士のホモフィリック結合により K63 を介した結合様式のポリ Ub 化が促進され、Ub 化が L1CAM のエンドサイトーシスにおいて最も重要な最初のプロセスである可能性を示したことである。さらに L1CAM はリソゾーム分解系を介して分解されていることも初めて示した。この膜タンパク質の Ub 化と細胞内輸送機構は、スモール G タンパク質の GDP-GTP 交換反応（GEF 活性）によって制御されている可能性を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：薬学・

キーワード：脳・神経、神経接着分子、神経科学、ユビキチン、細胞内輸送

1. 研究開始当初の背景

神経接着分子 L1 (以下 L1CAM) は 1984 年 Schachner ら (*EMBO J*) によって神経細胞、軸索、シュワン細胞の細胞膜に特異的に発現しているカルシウム非依存的細胞接着能を有する全長 200kDa の糖タンパク質として発見された。L1CAM は細胞膜に局在する 1 回膜貫通型の免疫グロブリンスーパーファミリーの一員で細胞外に 6 個の免疫グロブリン様ドメインと 5 個のファイブロネクチン III 型様ドメイン、そして短い細胞内ドメインから構

成されている。L1CAM の大変興味深いところは神経系発達期、神経回路網形成期に大変重要な機能 (細胞移動、神経軸索伸展・分岐、軸索束化、ミエリン形成等) を果たしていることである (伊藤ら, *Science*, 1995, *TiNS*, 1996)。

一般的に生物学的機能発現にタンパク質の品質管理が重要な役割を担っている。その品質管理制御は合成系、分解系そしてリサイクル系が複雑に絡み合っている。その中で分解系はプロテアソームとリソゾーム機構があり、前者がタンパク質のポリユビキチン(U

b)化、後者がモノUb化と関係している (*Hicke, Nature Rev. Mol. Cell Biol., 2001*)。

L1CAMの機能には動的機能と静的機能がある。動的機能とはL1CAM同士ホモフィリック結合により細胞内ドメインが翻訳後修飾され様々な情報伝達系が作動し接着性低下により細胞が積極的な行動、つまり軸索伸展、細胞移動などが誘導されることである。

一方、静的機能とはL1CAMを介した接着性増加による細胞接着（軸索束化、ミエリン化）を担っている。L1CAMはエンドサイトーシスされ、それがリサイクルされることにより細胞表面上のL1量が制御される事によりL1の機能調節が行われていると考えられる (Lemmonら、*J. Neurosci., 1998*)。このL1CAM量の制御はエンドサイトーシスされたL1CAMが初期エンドソーム上で、リサイクル経路を選択するか分解系経路を選択するかが非常に重要なステップであり、細胞内でのUb化と脱Ub化のスイッチングがL1CAMの機能を制御しているはずである。しかし、L1CAMの動的・静的機能を考える上でとても重要なL1CAMの品質管理制御機構は全く解明されていない。

2. 研究の目的

研究の背景から二つの疑問が生じた。

疑問：L1CAMはその機能発現にどのような品質管理制御を受けているのか？

この疑問を解決するために下記の仮説を立て、立証することを目的とした。

《仮説：L1CAMの品質管理制御はL1CAMユビキチン化による細胞内輸送系の制御で調節されている。》

3. 研究の方法

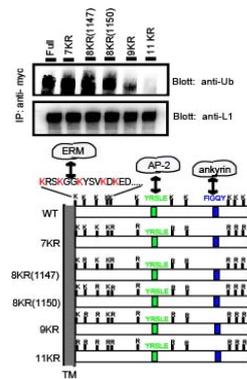
- 1) L1CAMのユビキチン化については細胞質内ドメインに存在する11のリジン(K)残基を一残基ずつアルギニン(R)に変異した変異体を作製し検討した。
- 2) L1CAMがリソゾームまたはプロテアソームどちらの分解系を介しているかを検討するために、それぞれの阻害剤を用いた。
- 3) L1CAMの細胞内輸送におけるユビキチン化との関係を検討するために、各種変異体をマウス神経芽細胞腫 N2a 細胞に遺伝子導入し L1CAM および細胞内輸送関連分子の動態を共焦点レーザー顕微鏡を用い観察した。
- 4) 3での細胞化学的検討と併せて、免疫沈降法とウエスタンブロットを用いて、L1CAMや細胞内輸送関連分子の相互作

用について検討した。

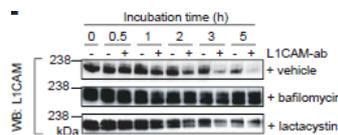
4. 研究成果

1) L1CAMのUb化(Ub-L1CAM)とUb化部位を解明し、さらにL1CAM-UbE3リガーゼの同定を試みた。

1)-1: L1CAMのUb化部位の同定: L1CAMの細胞内ドメイン(113アミノ酸)に存在する11個のリジン残基(K)を別のアミノ酸(R)に置換させた部位特異的変異体を作成し検討した結果L1CAMのUb化サイト2カ所が同定された。



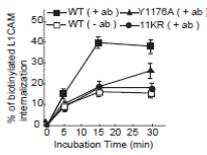
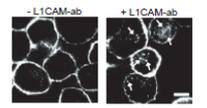
1)-2: L1CAMはリソゾーム分解系を介して分解されていることが明らかとなった。



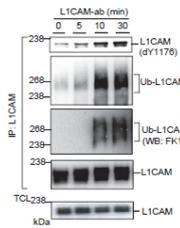
1)-3: L1CAM-UbE3リガーゼの同定: L1CAMとの分子間相互作用すると考えられるUbE3リガーゼの検索を行ったところRabex-5を発見した。Rabex-5はUb結合ドメインを有しさらにE3活性を有する分子であることから、L1CAM-UbE3リガーゼである可能性を詳細に検討したが、残念ながらL1CAM-UbE3リガーゼではなかった。結局、本研究期間内にはL1CAM-UbE3リガーゼを同定することはできなかった。

2) L1CAMが細胞内輸送のどの段階でUb修飾されているかを検討した。

2)-1: 定常状態におけるL1CAMの膜輸送機構: Ub化がL1CAMのエンドサイトーシスまたは細胞内輸送のシグナルとなっていることが明らかとなった。

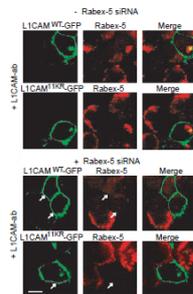


2)-2 : L1CAM・L1CAM のホモフィリック結合により L1CAM の Ub 化が促進され Ub-L1CAM のエンドサイトーシスの促進が認められた。

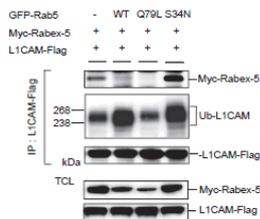


3) L1CAMのUbを介したエンドサイトーシスの分子メカニズムを解明した。

3)-1 : L1CAM-UbE3リガーゼを同定の過程で発見されたL1CAMのエンドサイトーシスに重要な役割を担っていることが示唆された。

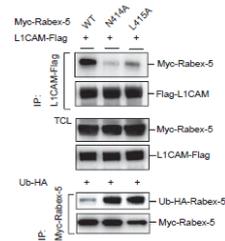


3)-2 : Ub-L1CAMがユビキチン結合ドメイン (MIUドメイン)とRabファミリーのGEF を有するRabex-5がUb-L1CAMとRab5のGDP型と複合体を形成することにより、細胞内に移行することを示した。

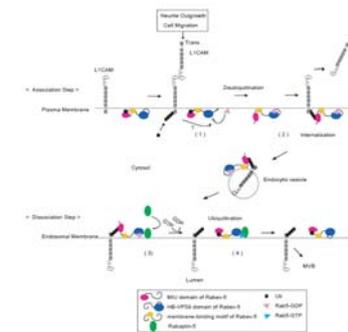


3)-3 : この複合体が初期エンドソームに細胞内移行し、Rab5がRabex-5のGEF活性によりGTP型に変換され、Rabex-5から解離し、

Ub-L1CAMもRabex-5から解離することを示した。



本研究課題の一番の成果は、L1CAM が L1CAM 同士のホモフィリック結合により Ub 化され、この Ub 化が L1CAM のエンドサイトーシスにおける最も重要な最初のステップである可能性を示したこと。さらに、この膜タンパク質の Ub 化と細胞内輸送機構は、スモール G タンパク質の GDP-GTP 交換反応 (GEF 活性) によって制御されている可能性を示唆したことである。



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 0 件)
投稿中

[学会発表] (計 2 件)

① Molecular dynamics of cell adhesion molecule L1 induced by theta burst stimulation in rat hippocampus. Y. Aikawa, M. Watanabe and K. Itoh, 第 30 回日本神経科学会・年会、横浜 2007 年 9 月

② Rabex-5, a guanine exchange factor for Rab5, Regulates the Ubiquitin-dependent Endocytic Trafficking of Neural Cell Adhesion Molecule L1, Y. Aikawa, Y. Shigemi, M. Watanabe, V. Lemmon, K. Itoh, 48rd Annual meeting, American Society for Cell Biology, サンフランシスコ・米国 2008 年 12 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 康一 (ITO KOUICHI)
徳島文理大学・香川薬学部 教授
研究者番号：3029114

(2) 研究分担者

渡邊 正知 (WATANABE MASATOMO)
徳島文理大学・香川薬学部 准教授
研究者番号：30306203

相川 義勝 (AIKAWA YOSHIKATU)
徳島文理大学・香川薬学部 助教
研究者番号：10412397

(3) 連携研究者