

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22300121

研究課題名(和文)神経骨格ダイナミズムの陰陽制御と神経寿命

研究課題名(英文)Positive and negative regulations of cytoskeletal dynamism and neuronal lifespan

研究代表者

森 望 (Mori, Nozomu)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00130394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円、(間接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：経特異的なホスホチロシンアダプター分子N-Shcと Grit/RICSの両方を欠損したマウスを樹立し解析を進めたが、顕著な表現型を見出せなかった。一方、N-Shc/ShcCと同様に神経系での発現の高いSck/ShcBの遺伝子欠損マウスの解析を進めた結果、こちらは小脳依存性の運動協調学習に欠損があり、小脳の長期抑圧が減退し、プルキンエ細胞での小胞体からのカルシウムイオンの放出に異常があることが判明した。また、神経細胞でのアセチル化制御に関係すると考えられるMdm20の蛋白質凝集制御への関わりを検討した結果、Mdm20はAKTのリン酸化を調節することでPolyQ凝集を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：While we explored functional deficits in the newly made N-Shc and Grit/RICS double KO mice, we were unable to define a specific phenotype. However, in ShcB deficient mice, we found a unique change in cerebellar-dependent motor learning, which was associated with reduced long-term depression as well as a deficit in calcium release from the endoplasmic reticulum store of Purkinje cells. We also examined a potential role of Mdm20, an auxiliary subunit of protein N-terminal acetyl transferase, and found that Mdm20 promotes polyQ aggregation via inhibiting autophagy through affecting serine-473 phosphorylation of AKT, an upstream kinase in the regulation of cytoplasmic proteostasis. These results suggest that neural enriched ShcB and Mdm20 play independent roles in neuronal synaptic plasticity and proteostasis, respectively.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学・神経薬理学

キーワード：老化 寿命 脳 神経可塑性 シグナル伝達 蛋白質凝集 アセチル化

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまで成体脳と老化脳における種々の神経特異的分子群の役割についての解析を進め、神経の構造的および機能的可塑性応答に関する分子的な劣化がその後の神経変性等の病的老化に至る前の生理的な老化につながることを主張してきた。ひとつには、神経の突起伸長に関する微小管崩壊因子 SCG10 を単離し、そのホモログも同様に微小管崩壊活性をもつことを示した。その後の研究を進める過程で、SCG10 群の微小管崩壊因子に対して、CRMP2 や Doublecortin などの拮抗因子との機能相関を検討したが、その結果、SCG10 は CRMP2 の機能を凌駕するが、double-cortin の作用には負けることがわかってきた。神経の突起伸長や軸索変性における微小管ダイナミズムの分子機構を理解するには、このような崩壊因子と重合促進因子の両方の機能性や相互関係を明らかにする必要性が浮かび上がってきた。

一方、神経栄養因子 BDNF の受容体 TrkB のシグナリングに關与する中枢特異的なシグナル伝達分子として単離していた N-Shc (ShcC) は、NMDA 受容体のモジュレーターともなりうる。N-Shc/ShcC 遺伝子欠損マウスの記憶学習能が上がり、同時に海馬での長期増強 LTP が亢進していた。N-Shc は PTB ドメインで NR2B サブユニットに直接結合するが、ShcA に関して従来知られていた Grb2 結合サイトではない新しいシグナルアウトプットがあるが、そのどこを介してスパイン形態の変化から記憶学習能の向上へ向かわせるのか、その理解へ向けて研究を続けた。その結果、N-Shc の CH1 ドメインの下流の Grb2 結合部位から MAPK 経路を介してスパインのアクチン制御へ向かうことが判明した。以前 N-Shc の PTB ドメインへの結合分子として単離していた脳での発現が強い新規 Rho-GAP/Grit がこのスパインでのアクチン制御に関わる可能性が浮上してきた。最近この Grit が、神経ネットワーク形成に関わるカドヘリンシグナリングに関わるとされた RICS と同一

分子であって、海馬での NMDA 受容体シグナリングにも直接關与すること、脳での発現が強いある種の Rho-GEF と拮抗することも示唆されてきた。このような状況から、老化脳におけるシナプス機能の劣化に關連して、この Rho-GAP/Grit/ RICS の機能性とそれと拮抗すると思われる Rho-GEF の機能性や老化過程での発現変動などを検討する必要性が高まった。

本研究は、その間の研究結果を踏まえて神経老化におけるアクチン骨格制御と微小管骨格制御の正負(陰陽)の因子群による機能制御の理解へ向けて、新たな基盤研究として展開した。

2. 研究の目的

神経特異的なホスホチロシンシグナルアダプター N-Shc/ShcC から p250kD-RhoGAP(GRIT/RICS)を介してスパインのアクチン骨格再編へいたる分子機構を明らかにする。N-Shc と Grit/RICS の両遺伝子欠損マウスを利用して、このシグナル系の神経機能への意義を探る。また、ShcB 欠損マウスを用いて、ShcB の新たな機能(特に、神経細胞におけるカルシウムイオン応答)を明らかにする。

ネットワーク再編に関わる微小管崩壊因子 SCG10 とそれに拮抗する CRMP2 および Doublecortin の作用機構を明確にする。また、神経細胞内で SCG10 が大きな複合体を形成している事実があるので、その実態に踏み込み、その分子構成を明らかにする。この複合体サブユニット中に微小管重合と崩壊のバランスセンサーがあるかどうかを見極め、それが老化で変化するかどうかを検討する。

微小管安定化および崩壊因子の活性制御はすべてリン酸化制御だが、本体である微小管そのものの化学修飾は生物界の常道のリン酸化制御ではなくアセチル化とチロシン化という非常に特殊な形態をとる。そのアセチル化の制御には現在、寿命遺伝子ともいえる SIRT 系の class III HDAC (NAD 依存性の HDAC) が關与する。チューブリン DAC (いわば TDACs) ともいえる SIRT2 と HDAC6 は、最近オートファジーや神経変性への關与が濃厚になってきているので、神経系におけるこの微小管のアセチル化制御の面から神経の老化や寿命制御への關与を探る。

3. 研究の方法

(1) N-Shc-Grit 系分子による脳海馬神経の機能的可塑性におけるアクチン骨格動態制御：東京大学分子細胞生物学研究所の秋山研究室より GRIT/RICS 遺伝子欠損マウスを移入し N-Shc 遺伝子欠損マウスと交配した。神経突起伸展における N-Shc からアクチン骨格制御の分子機構については初代培養神経細胞への遺伝子導入と欠損マウスからの培養細胞との比較検討を行った。

(2) SCG10 関連分子のリン酸化制御による神経の構造可塑性および機能可塑性への微小管動態制御：神経細胞における神経骨格制御への SCG10 関連分子の寄与について、当初 CRMP2 との機能競合を中心に解析する予定だったが、他の関連研究の進展を鑑み、シナプスへの局在性の高いアクチン制御分子である drebrin への新規結合分子の解析を進めた。酵母ツーハイブリッド系での探索から始め、Spikar 単離後は群馬大学の白尾研究室と共同で Spikar からアクチン骨格制御の分子作用を共沈法など生化学的な常法によって解析を進めた。

(3) 神経骨格動態制御因子からみる神経老化と寿命の制御：

SIRT2, HDAC6 関連クローンはそれぞれ鳥取大押村研究室、理化学研究所吉田研究室より入手した。Mdm20/p120 関連分子群は Dr. 安田が京都大学から移入した。HEK293 細胞と初代培養神経細胞への遺伝子導入と siRNA 等の実験により polyQ 凝集への効果を比較検討した。

4. 研究成果

(1) N-Shc-Grit 系分子による脳海馬神経の機能的可塑性におけるアクチン骨格動態制御：

これまで研究の主体としてきた N-Shc と相互作用し、NMDA 受容体や Trk 受容体からのシグナル伝達に関係すると目される Grit/RICS の遺伝子欠損マウスを東大分生研から移入し交配を続け、N-Shc とのダブル KO マウスの作成をした。顕著な異常症状はなく、神経細胞の培養などで比較を進めている。一方、N-Shc-Grit/RICS からアクチン骨格制御への経路に関わると想定される p190 RhoGAP と ARAP3 の機能連関について韓国ハーリム大学の JB Park 研究室と共同研究を進め、RhoA の不活性化の機構について論文公表した (Jeon CY et al., JCP 2010)。また、N-Shc 関連分子の老化脳での発現レベルを比較検討した結果、p66-Shc の発現が老化脳で若干だが有意に上昇していることが判明した (Sone et al., AGG 2012)。

N-Shc (ShcC) の遺伝子欠損マウスは脳海馬での神経可塑性が亢進し記憶学習能力が高まっていることをすでに報告したが、今度

は ShcB の遺伝子欠損マウスの表現型が明確になった。すなわち、ShcB 欠損マウスは小脳依存性の運動協調能に障害があり、その原因は小脳の顆粒細胞からの平行線維からプルキンエ細胞へのシナプス可塑性に異変があることがわかってきた (柿澤ら、投稿準備中)。この小脳の平行線維とプルキンエ細胞間のシナプス可塑性は若齢脳に比して老齢脳では顕著に減退することもわかった (Kakizawa et al., NBA 2012)。その主因は酸化ストレスによるもので、小脳の何らかの蛋白質の酸化によってこのシナプス機能の低下が起きると考えられた。その実態はまだ不明だが、小脳の一酸化窒素依存性のこのプルキンエ細胞の可塑性は、その後、東京大学の飯野研究室との共同研究で、リアノジン受容体の Cys 残基がその活性に非常に重要ということもわかってきたので、今後その周辺の分子変化を検討していく必要性がでてきた (Kakizawa et al., EMBO J, 2013)。

(2) 微小管崩壊因子 SCG10 と重合促進因子 CRMP2 による微小管ダイナミズムの制御：

SCG10 は PKA, MAPK, cdk5 などリン酸化酵素でリン酸化を受け不活化される。GSK3b は CRMP2, EB/APC, CLIP/CLASP, MAP1b, tau, MAP2 など多くの安定化因子をリン酸化し、重要な分子調節機構として働くが、SCG10 を始めとする不安定化因子の制御に関しては現在まで報告がない。SCG10 のアミノ酸配列を検索すると N 末端側の神経成長円錐への輸送に関連する領域の脂肪酸結合配列付近に GSK3 のリン酸化コンセンサス配列があるので SCG10 が GSK3 によりリン酸化を受ける可能性がある。そこで、海馬初代培養神経細胞を用いて、GSK3b による SCG10 制御を検証した。BIO は、GSK3 特異的な阻害剤として開発され、海馬初代培養神経細胞においては作用濃度により効果が異なり、低濃度 (10 nM) ではプランチング増加や CRMP2 リン酸化阻害、高濃度 (300 nM) では神経突起伸展阻害や MAP1b リン酸化阻害が生じた。GSK3b の阻害は、微小管を安定化方向へと導き、その結果、神経突起伸展の阻害が起こると想定される。このとき、SCG10 の細胞内局在は、見かけ上、BIO による影響はなかった。しかし、免疫染色時の蛍光強度を細胞体、神経突起内で比較すると、細胞体での濃度依存的な蛍光強度の増加が見られ、300 nM BIO では約 3 倍の増加が観察され、SCG10 が細胞体に蓄積していると考えられた。同様な結果が、GSK3b-KD 変異体の強制発現においても見られ、SCG10 が GSK3b により制御されている可能性を示唆した。しかし、神経成長円錐において SCG10 のシグナル消失が見られないことから、この効

果は SCG10 輸送の直接的な阻害によるものとは考えにくい。代わる可能性としては、SCG10 の安定化に起因するターンオーバーの低下がありうる。

(3) 神経骨格動態制御因子からみる神経老化と寿命の制御への基礎研究：

最近注目をあびるようになった寿命関連遺伝子である SIRT について、SIRT2 と同じく チュープリンの脱アセチル化酵素である HDAC6 とアセチル化蛋白質複合体のサブユニットである Mdm20/p120 の機能性に着目し、特に老化細胞で生じやすい蛋白質凝集プロセスへの関与を検討した。その結果、Mdm20 は Poly Q を使ったモデル系で蛋白質凝集を促進すること、その理由は AKT の 473 位の Ser 残基のリン酸化を促進することでオートファジーを阻害する結果蛋白質凝集が促進されることがわかり、論文として公表した (Yasuda et al., PLoS ONE, 2013)。

現在はこの Mdm20 が老化制御の中核分子のひとつである mTOR をターゲットにしている可能性がでてきており、その分子作用を検討している。

一方、微小管の構成要素のひとつである β III チュープリンは一般には神経特異的に発現していると従来考えられてきたが、細胞分裂のステージ特異的に発現変動することがわかった。しかもその発現は NRSF/REST とよばれる非常委多くの神経特異的分子群を統括的に制御する転写因子の支配下にあることもわかった。神経老化における微小管変動と癌の制御あるいは細胞分裂における微小管制御とは一見、無関係のように思われがちだが、NRSF/REST を介して、細胞分裂あるいは細胞の初期分化と脳老化との接点があるようにも感じられた。これに関して、最近 Nature 誌にハーバード大学の S. Yankner 研究室から NRSF/REST が一般に高齢者の脳での発現が高いが、アルツハイマー病や他の認知症の脳では発現が低いこと、その場合、NRSF/REST の標的遺伝子は従来考えられていた β III チュープリンを含む神経特異的遺伝子というよりむしろ、細胞死(アポトーシス)関連遺伝子や酸化ストレス防御などの神経保護関連遺伝子を統括的に制御するという論文が出た (Lu T et al., Nature 507, 448-454, 2014)。今後 NRSF/REST の老化脳での役割についても重要な焦点となる可能性がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Yamazaki HI, Kojima N, Kato K, Hirose E, Iwasaki T, Mizui T, Takahashi H, Hanamura K, Roppongi RT, Koibuchi N, Sekino Y,

Mori N, Shirao T., Spikar, a novel drebrin-binding protein, regulates the formation and stabilization of dendritic spines. *J Neurochem.* 128(4):507-522 (2014) 査読有

Yasuda K, Ohyama K, Onga K, Kakizuka A, Mori N., Mdm20 stimulates PolyQ aggregation via inhibiting autophagy through Akt-Ser473 phosphorylation. *PLoS One.* 16;8(12):e82523. (2013) 査読有

Kakizawa S, Shibasaki M, Mori N, Protein oxidation inhibits NO-mediated signaling pathway for synaptic plasticity, *Neurobiol. Aging,* 33, 535-545 (2012) 査読有

Kakizawa S, Yamazawa T, Chen Y, Ito A, Murayama T, Oyamada H, Kurebayashi N, Sato O, Watanabe M, Mori N, Oguchi K, Sakurai T, Takeshima H, Saito N, and Iino M. Nitric oxide-induced calcium release via ryanodine receptors regulates neuronal function. *EMBO J.* 31, 417-428 (2012) 査読有

Sone K, Mori M, Mori N., Selective upregulation of p66-Shc gene expression in the liver and brain of aged rats. *Arch Gerontol Geriatr.* 55, 744-748 (2012) 査読有

Ohyama K, Yasuda K, Onga K, Kakizuka A, Mori N. Spatio-temporal expression pattern of the NatB complex, Nat5/Mdm20 in the developing mouse brain: Implications for co-operative versus non-co-operative actions of Mdm20 and Nat5. *Gene Expr Patterns.* 12, 36-45 (2012) 査読有

Shibasaki M, Maesawa C, Akasaka K, Kasai S, Yasuhira S, Kanno K, Nakayama I, Sugiyama T, Wakabayashi G, Masuda T, Mori N., Transcriptional and post-transcriptional regulation of β III-tubulin protein expression in relation with cell cycle-dependent regulation of tumor cells. *Int J Oncol.* 40(3), 695-702 (2012) 査読有

Sone K, Tsuda M, and Mori N, Position-dependent effect of a neural-restrictive silencer-like element present in the promoter downstream of the SCG10-like protein (SCLIP) gene. *J. Biochem.,* 150, 451-460 (2011) 査読有

Mori N, Mori M, Quest for a long life: Paradoxes and essentials of evolving longevity. *Acta Med. Nagasaki* 56, 73-80 (2011)

Mori N and Mori M, Neuronal Shc: A gene of longevity in the brain? *Medical Hypotheses* 77, 996-999 (2011) 査読有

森 望 : 老化脳, in *Clinical Neuroscience* (中外医学社) 29 (7),

811-815 (2011) 査読有

Jeon CY, Kim HJ, Morii H, Mori N, Settleman J, Lee JY, Kim JB, Kim SC, and Park JB, Neurite outgrowth from PC12 cells by bFGF is mediated by RhoA inactivation through p190RhoGAP and ARAP3, *J. Cell. Physiol.*, 224, 786-794 (2010) 査読有

Yamaza H, Komatsu T, Wakita S, Kijogi C, Park S, Hayashi H, Chiba T, Mori R, Furuyama T, Mori N, Shimokawa I, FoxO1 is involved in the antineoplastic effect of calorie restriction. *Aging Cell.* 9, 372-382 (2010) 査読有

森 望 : 脳の中の寿命遺伝子, 理大科学フォーラム (特集: アンチエイジング) 312, 7-13 (2010) 査読有

[学会発表] (計 11 件)

安田邦彦, 森望 : N-アセチル化制御関連分子Mdm20はmTORC2活性を介して細胞運動を制御する 第86回日本生化学会大会、2013年9月11日~13日、横浜

Mori N. : Neuronal Shc in development, neuroplasticity, and aging. Cold Spring Harbor Conferences Asia. Suzhou, China. 9 ~ 13 September, 2013.

Ohyama K., Yasuda K., Onga K., and Mori N. : Ageing-dependent adaptive response of primary hippocampal neurons to an oxidative stress by TGF beta1. Cold Spring Harbor Conferences Asia. Suzhou, China. 9 ~ 13 September, 2013.

Okamoto A., Taguchi H., Onga K., Ohyama K., and Mori N. : An in vitro aging model of long-term cultured hippocampal neurons. Cold Spring Harbor Conferences Asia. Suzhou, China. 9~13 September, 2013.

Ohyama K., Yasuda K., Onga K. and Mori N. : Ageing-dependent TGF beta1 signalling in the neuroprotection against an oxidative stress. The 20th IAGG world congress of gerontology and geriatrics Seoul, Korea. 23 ~ 27 June, 2013.

Yasuda K., Ohyama K. and Mori N. : Mdm20, an auxiliary subunit of the N-terminal acetyltransferase complex NatB, involves in polyQ aggregate clearance. The 20th IAGG world congress of gerontology and geriatrics Seoul, Korea. 23~27 June, 2013.

安田邦彦, 大山恭司, 田口祥身, 森望 : 初代培養神経細胞における HDAC6 による mTOR を介したオートファジー誘導について 日本基礎老化学会第 36 回大会、2013 年 6 月 4 日~6 日、大阪

大山恭司, 岡本愛子, 森望 : 神経保護因子 BDNF によるシグナルアダプター

N-Shc 蛋白質 (リン酸化型) の海馬神経細胞内局在の変化 第 28 回日本老年学会総会、2013 年 6 月 4 日~6 日、大阪
森望 : 脳の中の寿命遺伝子 第 28 回日本老年学会総会、2013 年 6 月 4 日~6 日、大阪

安田邦彦, 大山恭司, 大神和子, 垣塚彰, 森望, N-アセチル化制御関連分子 Mdm20 による Akt のリン酸化制御及びオートファジーを介した polyQ タンパク質排除機構 第 85 回日本生化学会大会 (福岡) 2012 年 12 月 14 日~2012 年 12 月 16 日
安田邦彦, 垣塚彰, 森望, N-アセチル化酵素による KAT 活性を介したタンパク質品質管理 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会合同大会 (神戸) 2010 年 12 月 07 日~2010 年 12 月 10 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/anatomy1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 望 (Mori Nozomu)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 00130394

(2) 研究分担者

柴崎 晶彦 (Masahiko Sibasaki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 20445109

研究分担者

柿澤 昌 (Sho Kakizawa)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号: 40291059

研究分担者

大山恭司 (Kyoji Ohyama)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 00255423

研究分担者

安田邦彦 (Kunihiko Yasuda)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 50278446

(3) 連携研究者

白石-山口陽子 (Yoko Shiraiishi-Yamaguchi)
長崎大学・先端生命研究センター
研究者番号: 50311345