

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500282

研究課題名（和文）足場タンパク質 JSAP1 による小脳顆粒前駆細胞の増殖・分化制御機構の解析

研究課題名（英文）Research of the scaffold protein JSAP1 during the differentiation of cerebellar granule cell precursors

研究代表者

善岡 克次（YOSHIOKA KATSUJI）

金沢大学・がん研究所・教授

研究者番号：60200937

研究成果の概要（和文）：

発達期小脳の免疫組織染色を行い、JSAP1 および活性型 JNK は増殖を停止した顆粒前駆細胞で強く共発現していることを見出した。また、小脳顆粒前駆細胞の分化過程における足場タンパク質 JSAP1 の細胞膜移行とその役割を明らかにした。本研究成果は、哺乳類 JNK 経路の空間的制御に足場タンパク質 JSAP1 が関与することを示した最初の知見である。さらに、小脳初代培養系を用いた解析を行い、JSAP1-JNK シグナル伝達系は小脳顆粒前駆細胞のプログラムを増殖型から分化型に変換する役割を担っていることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

We performed immunohistochemical analysis and found that JSAP1, a scaffold protein for JNK signaling pathways, is expressed predominantly in the post-mitotic granule cell precursors (GCPs) of the inner external granular layer. We also showed that when stimulated by FGF receptor, JSAP1 translocates to the plasma membrane, where it recruits JNK and facilitates the activation of JNK, leading to the differentiation of cerebellar GCPs. Furthermore, we found that JSAP1-JNK signaling promotes the cell cycle exit and differentiation of cerebellar GCPs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：マウス、小脳、顆粒前駆細胞、シグナル伝達、足場タンパク質、発生・分化、MAPキナーゼ、JNK

1. 研究開始当初の背景

小脳顆粒前駆細胞は、外顆粒層で爆発的に増殖後、分化・移動を経て、最終的には顆粒細胞層を形成する。顆粒前駆細胞の増殖促進は、小脳プルキンエ細胞から分泌されるソニックヘッジホッグがマイトジェンとして中心的な役割を担っている。一方、

顆粒前駆細胞の増殖停止や分化促進には、サイクリン依存性キナーゼインヒビター p27^{Kip1}、FGF 経路、ビトロネクチン、癌抑制因子 REN などの関与が示唆されている。しかし、顆粒前駆細胞のプログラムを増殖型から分化型に変換する細胞内情報伝達系については、不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は、最終的には発達期小脳における神経細胞（前駆細胞を含む）の増殖、分化、移動、シナプス形成などを制御するメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目指している。その中で本研究課題では、JNK MAPキナーゼ（MAPK）経路の足場タンパク質を切り口とした解析により得られた研究成果をさらに発展させ、小脳顆粒前駆細胞のプログラムを増殖型から分化型に変換する分子メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

発達期小脳における JSAP1、JNK の免疫組織学的解析、株化細胞および小脳初代培養系を用いた JSAP1-JNK シグナル伝達系の分子細胞生物学的解析などを行った。

4. 研究成果

発達期小脳に注目して、JSAP1、活性型 JNK、細胞増殖マーカーKi67、および分化マーカー NeuN に対する抗体を用いた免疫組織染色を行った。その結果、JSAP1 および活性型 JNK は、外顆粒層特に、増殖を停止した顆粒前駆細胞で強く共発現していることを見出した（図 1）。小脳初代培養系を用いて

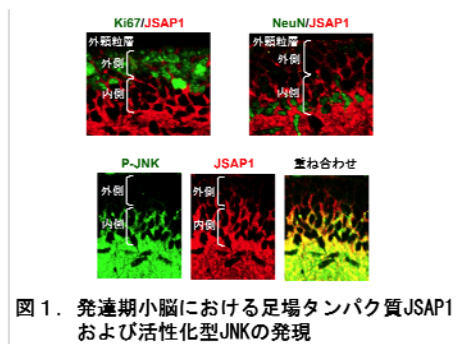


図 1. 発達期小脳における足場タンパク質 JSAP1 および活性化型 JNK の発現

JSAP1-JNK シグナル伝達系に関する解析を行った。その際、野生型 JSAP1、JNK 結合能を欠く変異 JSAP1、および JSAP1 特異的 shRNA 発現ベクターを使用した。また、足場タンパク質 JSAP1 の質的および量的変化に伴う顆粒前駆細胞の運命（増殖・分化）は、抗 BrdU、NeuN 抗体を用いた

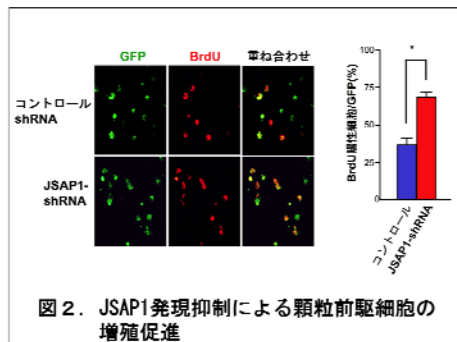


図 2. JSAP1発現抑制による顆粒前駆細胞の増殖促進

免疫細胞化学法により評価した（図 2～図 4）。その結果、JSAP1-JNK シグナル伝達

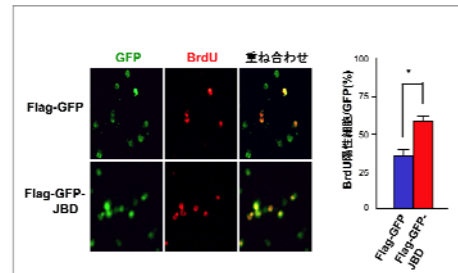


図 3. JNK活性化阻害による顆粒前駆細胞の増殖促進

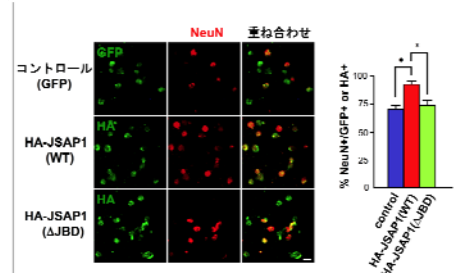


図 4. JSAP1強制発現による顆粒前駆細胞の増殖促進

系は、小脳顆粒前駆細胞のプログラムを増殖型から分化型に変換する役割を担っていることが強く示唆された。本研究成果は、JSAP1-JNK シグナル伝達系が正常な小脳発生に必須であり、その破綻は髄芽腫を引き起こす可能性を示唆している。

小脳初代培養系を用いた解析を行い、JSAP1 タンパク質は FGF-2（小脳顆粒前駆細胞

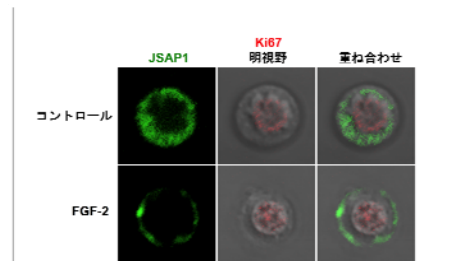


図 5. FGF-2に反応したJSAP1の細胞膜移行

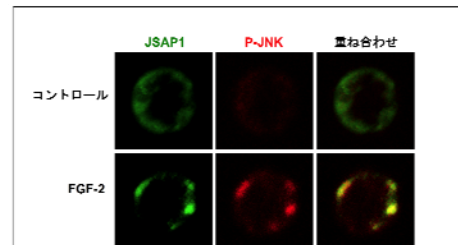


図 6. JSAP1及び活性型JNKの細胞膜近傍での共局在

胞の分化誘導因子) に応答して細胞膜に移行

することを見出した(図5)。また、JSAP1と活性型JNKは細胞膜近傍で共局在することも判明した(図6)。さらに、株化細胞での共発現系を用いた解析を行った。その結果、FGFシグナル伝達系の活性化に伴ってJSAP1は細胞膜移行し、そのJSAP1依存的にJNKも細胞膜に移行することが明らかになった(図7、

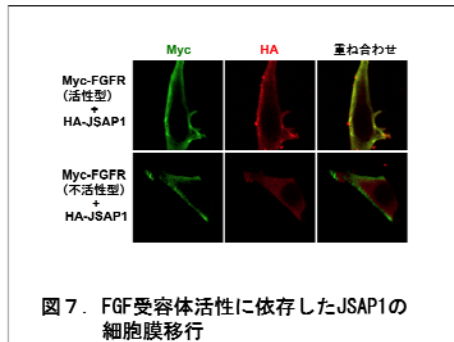
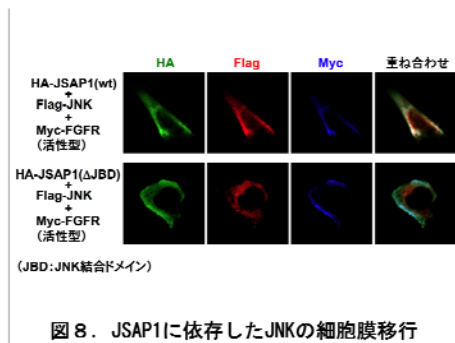


図7. FGF受容体活性に依存したJSAP1の細胞膜移行

図8)。



(JBD: JNK結合ドメイン)

図8. JSAP1に依存したJNKの細胞膜移行

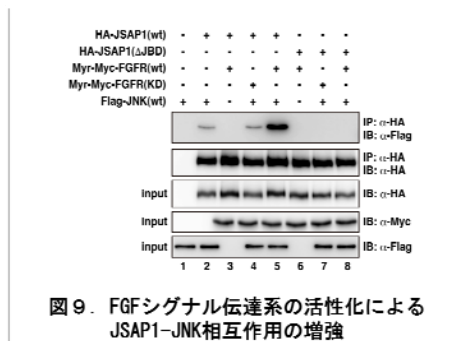


図9. FGFシグナル伝達系の活性化によるJSAP1-JNK相互作用の増強

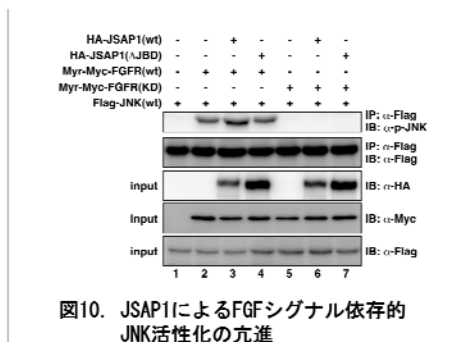


図10. JSAP1によるFGFシグナル依存的JNK活性化の亢進

一方、生化学的解析を行い、FGFシグナル

伝達系の活性化によってJSAP1-JNK相互作用が増強されること、およびFGFシグナル伝達系によるJNKの活性化はJSAP1存在下で亢進することを見出した(図9、図10)。

以上のことから、足場タンパク質JSAP1は、分化誘導因子FGF-2にตอบสนองしてJNKシグナル伝達系を空間的に制御し、最終的には小脳顆粒前駆細胞のプログラムを増殖型から分化型に変換すると考えられる(図11)。

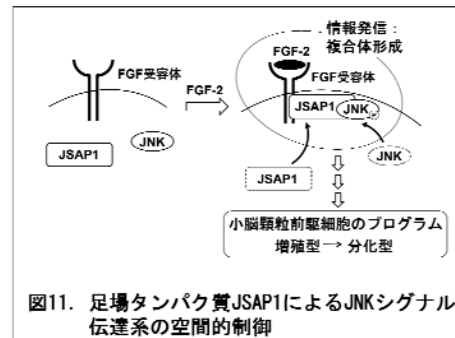


図11. 足場タンパク質JSAP1によるJNKシグナル伝達系の空間的制御

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10件)

- ① Ando, K., Uemura, K., Kuzuya, A., Maesako, M., Asada-Utsugi, M., Kubota, M., Aoyagi, N., Yoshioka, K., Okawa, K., Inoue, H., Kawamata, J., Shimohama, S., Arai, T., Takahashi, R., Kinoshita, A. (2011) N-cadherin regulates p38 MAPK signaling via association with JNK-associated leucine zipper protein: implications for neurodegeneration in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 286:7619-7628. 査読有
- ② Sato, T., Enkhbat, A., Yoshioka, K. (2011) Role of plasma membrane localization of the scaffold protein JSAP1 during differentiation of cerebellar granule cell precursors. *Genes Cells* 16:58-68. 査読有
- ③ Tanahashi, H., Kito, K., Ito, T., Yoshioka, K. (2010) MafB protein stability is regulated by the JNK and ubiquitin-proteasome pathways. *Arch. Biochem. Biophys.*, 494:94-100. 査読有
- ④ Morfini, G. A., You, Y. M., Pollema, S. L., Kaminska, A., Liu, K., Yoshioka, K., Björkblom, B., Coffey, E. T., Bagnato, C., Han, D., Huang, C. F., Banker, G., Pigino, G., Brady, S. T. (2009) Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin. *Nat. Neurosci.*, 12:864-871. 査読有

- ⑤ Uchida, S., Yoshioka, K., Kizu, R., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Poon, R.Y., Yamashita, K. (2009) Stress-activated mitogen kinase c-Jun NH₂-terminal kinase and p38 target Cdc25B for degradation. *Cancer Res.*, 69:6438-6444. 査読有
- ⑥ Yamaguchi, T., Miyashita, C., Koyano, S., Kanda, H., Yoshioka, K., Shiba, T., Takamatsu, N., Ito, M. (2009) JNK-binding protein 1 regulates NF-kappaB activation through TRAF2 and TAK1. *Cell Biol. Int.*, 33:364-368. 査読有
- ⑦ Gantulga, D., Tuvshintugs, B., Endo, Y., Takino, T., Sato, H., Murakami, S., Yoshioka, K. (2008) The scaffold protein c-Jun NH₂-terminal kinase-associated leucine zipper protein regulates cell migration through interaction with the G protein G(alpha 13). *J. Biochem.*, 144:693-700. 査読有
- ⑧ Sato, T., Torashima, T., Sugihara, K., Hirai, H., Asano, M., Yoshioka, K. (2008) The scaffold protein JSAP1 regulates proliferation and differentiation of cerebellar granule cell precursors by modulating JNK signaling. *Mol. Cell Neurosci.*, 39:569-578. 査読有
- ⑨ Iwanaga, A., Wang, G., Sato, T., Baljinnyam, T., Shimizu, K., Takumi, K., Hayashi, M., Fuse, H., Sugihara, K., Asano, M., Yoshioka, K. (2008) Ablation of the scaffold protein JLP causes reduced fertility in male mice. *Transgenic Res.*, 17:1045-1058. 査読有
- ⑩ Tanahashi, H., Yoshioka K. (2008) RNA interference silencing of DRAL affects processing of amyloid precursor protein. *Neurosci Lett.* 439:293-297. 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 佐藤時春, Enkhbat, A., Baljinnyan, T., 善岡克次 (小脳顆粒前駆細胞の増殖・分化過程における足場タンパク質 JSAP1 の細胞内局在変化) 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学大会合同大会、2010年12月10日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ② 佐藤時春, Enkhbat, A., 善岡克次 (Subcellular localization of the scaffold protein JSAP1 during the differentiation of cerebellar granule

cell precursors) 小脳顆粒前駆細胞の分化過程における足場タンパク質 JSAP1 の細胞内局在) 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日、リーガロイヤルホテル大阪 (大阪府)

- ③ Sato, T., Yoshioka, K. (Role of the scaffold protein JSAP1 during the differentiation of cerebellar granule cell precursors) The Joint Symposium of the 5th International Symposium of Institute Network and the International Symposium Commemorating Inauguration of Kanazawa University Cancer Research Institute, June 24, 2010, KKR Hotel Kanazawa (Ishikawa, Japan).
- ④ 佐藤時春、Anir Enkhbat、善岡克次 (Positive feedback regulation of the scaffold protein *Jsap1* gene expression during the differentiation of cerebellar granule cell precursors) 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月10日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑤ 内田早苗、渡辺信元、工藤保誠、善岡克次、松永司、中釜斉、山下克美 (JNK誘発 SCF^{beta-TrCP} 依存的 Cdc25B ユビキチン化の分子機構) 第68回日本癌学会学術総会、2009年10月3日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑥ 佐藤時春、寅嶋崇、杉原一司、平井宏和、浅野雅秀、善岡克次 (JSAP1-JNK シグナル伝達系による顆粒前駆細胞の増殖・分化制御) 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学大会合同大会、2008年12月10日、神戸ポートアイランド (兵庫県)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 情動障害の治療薬のスクリーニング方法

発明者: 善岡克次、吉原 亨、佐藤時春、浅野雅秀

権利者: 国立大学法人金沢大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-220591

出願年月日: 2009年9月25日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/department/mccb/03.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

善岡 克次 (YOSHIOKA KATSUJI)

金沢大学・がん研究所・教授

研究者番号：60200937

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし