

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3月29日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（S）

研究期間：2008～2012

課題番号：20670003

研究課題名（和文） 神経機能制御における小胞膜輸送システムの関与

研究課題名（英文） Molecular mechanisms for neuronal function via vesicular trafficking

研究代表者

白根 道子（SHIRANE MICHIKO）

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：90398082

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、神経の分化や機能調節における細胞内輸送システムの制御機構を明らかにすることであった。特に、神経細胞における膜シャペロンタンパク質 FKBP38、および輸送制御タンパク質プロトルーディンの作用機序の解明を目指した。その結果、パーキンソン病や遺伝性痙性対麻痺などの神経疾患の発症原因の機構の一部が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of our study was to clarify the regulatory mechanism of intracellular transport in nervous system. Particularly, we aimed at the elucidation of the function of the molecular chaperon protein FKBP38 and the trafficking regulatory protein protrudin. As a result, we revealed the part of the causal mechanisms of neurological disorders such as Parkinson's disease or hereditary spastic paraplegia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
2009年度	15,200,000	4,560,000	19,760,000
2010年度	15,200,000	4,560,000	19,760,000
2011年度	15,200,000	4,560,000	19,760,000
2012年度	15,200,000	4,560,000	19,760,000
総計	77,000,200	23,100,000	100,100,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経細胞、脳神経疾患、細胞内輸送、プロトルーディン、FKBP38

1. 研究開始当初の背景

神経管形成過程においては、神経外胚葉由来細胞の適切な構築が重要となる。その分子機構は二分脊椎などの神経管閉鎖不全モデルマウスの研究などにより示唆されているが、それらの統合的な作用機序に関しては未

解明の部分が多い。われわれは、多機能分子シャペロン FKBP38 が、結合タンパク質の細胞内局在や活性を制御していることを明らかにした[Shirane and Nakayama, *Nature Cell Biol.* (2003)]。予備的研究により、FKBP38 ノックアウトマウスを作製したところ、脳や脊

髄において神経外胚葉由来細胞の構築に異常が認められ、二分脊椎を伴う激しい神経管形成異常を示し、FKBP38 によるシャペロン作用が発生期の神経管形成に必須であることを見出した。また FKBP38 はプロテアソームと結合し、膜タンパク質の分解制御に関与する[Nakagawa, et. al., *Genes to Cells* (2007)]知見より、神経管形成に膜タンパク質分解が関与している可能性が示唆されている。

一方、脳の複雑な働きを担っている神経細胞は、情報ネットワークを身体中に張り巡らせるために神経突起を有している。神経突起形成の際には突起部の細胞膜面積が増大するが、そのための小胞輸送システムの機構については未解明のままであった。われわれは、FKBP38 結合分子として、小胞輸送制御分子 Protrudin (プロトルーディン) を同定し、Protrudin が Rab11 結合を介しリサイクル膜輸送を促進し神経突起形成を誘導する分子機構を明らかにした [Shirane and Nakayama, *Science* (2006)]。この知見は、小胞輸送システムの神経細胞分化への関与を示している。因みにヒト Protrudin 遺伝子の変異は遺伝性痙性対麻痺の原因となる。

以上より、発生期の神経管形成から成体における神経機能調節にわたり、“FKBP38-Protrudin 複合体”が小胞輸送制御を介して特定のタンパク質や脂質輸送を行い、神経細胞の適切な分化、移動、構築、機能制御に関与している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、神経発生、神経機能調節における小胞輸送システムの関与およびその分子機構を明らかにすることを目的とする。特に神経細胞の分化、移動、構築、機能制御に焦点を当て、“FKBP38-Protrudin 複合体”による制御機構を解明する。そして、それらの機構のヒトの二分脊椎などの神経形成不全や遺伝性痙性対麻痺などの神経疾患の病因への関与を解明し、さらに治療への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) FKBP38 ノックアウトマウス(KO)を用い、脳や脊髄のディファレンシャル・プロテオミクス解析によりタンパク質レベルの変化を網羅的に解析し、FKBP38 の下流の神経管形成機構を解明する。また、初代神

経培養や組織解剖学的手法により、神経外胚葉由来細胞の移動や構築に関与する分子の変化を解析する。

(2) FKBP38KOにおける Protrudin の小胞輸送活性の異常を解析し、FKBP38 と Protrudin の制御関係を明らかにする。

(3) マウス脳組織より脂質を抽出し、Protrudin 結合脂質を同定する。結合脂質の神経機能への関与を解析する。

(4) Protrudin KO を作製する。そのマウスを用い、神経細胞における小胞輸送の異常、脂質分布の異常、神経疾患の発症、電気生理学的異常などについて解析する。そして小胞輸送制御の神経機能調節への関与や神経疾患との関連を明らかにする。

(5) タグ付加 Protrudin のトランスジェニックマウス(Tg)を作製し、プルダウンおよび質量分析による Protrudin 複合体の網羅的解析を行う。得られた Protrudin 結合分子について、神経機能調節における関与を解析する。

以上より、小胞輸送システムによる神経機能の調節の制御機構を解明する。

4. 研究成果

(1) 神経細胞における FKBP38 結合タンパク質 ANKMY2 の同定。

His-FLAG-tag 付加 FKBP38 cDNA を prion promoter の下流に繋ぎ、マウスに導入して、神経特異的 FKBP38 トランスジェニックマウスを作製した。その脳抽出物より FKBP38 複合体を Ni resin (His-pull down) および M2 agarose (FLAG-pull down) にて精製し、質量分析計 (LTQ) にて結合タンパク質の網羅的解析を行った。その結果、ANKMY2 (ZMYND20) が同定された。ANKMY2 は Ankyrin repeat ドメインと MYND ドメインとを有する ZMYND ファミリータンパク質のひとつである (別名 ZMYND20)。FKBP38 はこれまでに別の2つの ZMYND タンパク質との結合が報告されている。PHD2 (ZMYND6)はHIFのプロリン水酸化酵素でプロテアソーム分解に関与しており、Zn finger ドメインである MYND ドメインで FKBP38 と結合する。USP19

(ZMYND9)はユビキチン制御に関するタンパク質である。FKBP38 とさまざまな ZMYND ファミリータンパク質との結合を調べた結果、ANKMY2 との結合が最も強いことがわかった。ANKMY2 の FKBP38 結合部位は MYND ドメインで、FKBP38 の ANKMY2 結合部位は N 末端側の Glu-rich 部位であることがわかった。ANKMY2 は、一次繊毛 (Primary cilia) において cGMP 産生酵素である Guanylate cyclase の輸送制御に関与している。cGMP はリン酸化酵素 PKG を活性化する。一方で Shh シグナルも、一次繊毛内での輸送を介して活性制御されているため、FKBP38 による Shh シグナルの制御に ANKMY2 が関与していること、それが一次繊毛内の輸送機構と関係していることが予想された。

(2) FKBP38 によるミトコンドリア品質管理 (マイトファジー応答) 機構の解明。

ミトコンドリアは ATP 供給の重要な器官であると同時にその過程で活性酸素を大量に産生するため、ミトコンドリアが損傷を受けた際には細胞に大きな障害を与える。FKBP38 は、ミトコンドリア依存的アポトーシス抑制分子であるため、ミトコンドリア品質管理機構として重要視されているマイトファジーとの関連を調べてみた。実験系として Parkin を恒常的に発現させた細胞を作製し、CCCP というミトコンドリア損傷薬剤を添加してマイトファジーを人工的に誘導した。その際、ミトコンドリアの消去に伴いほとんどのミトコンドリアタンパク質は分解除去されたが、意外なことに FKBP38 は Bcl-2 と共にミトコンドリアから小胞体に局在変化し分解から逃れるという興味深い結果を得た。その機構を調べたところ、FKBP38 の膜貫通ドメイン近傍に局在変化を決定するシグナル配列を見いだした。そしてミトコンドリア損傷時に FKBP38 が局在変化することにより、細胞のアポトーシス耐性能とミトコンドリア回復能が増強された。よって FKBP38 はミトコンドリア品質管理にポジティブに働いていることが明らかとなった。

(3) Protrudin 結合脂質 PtdIns5P の同定。

Protrudin はホスファチジルイノシトール

(PIP) 結合モチーフの FYVE ドメインを有している。そのリコンビナントタンパク質を作製し、PIP との結合実験を以下の3種類の方法で行った。PIP をスポットした膜 (PIP-Strips) を用いた結合実験、PIP を含むリポソームとの結合実験、PIP 固相化プレートへの結合実験である。その結果、protrudin の FYVE ドメインは PtdIns5P と結合することを見いだした。

(4) Protrudin KO 作製と、神経軸索および樹状突起スパインにおける異常。

Protrudin の KO マウスを作製したところ、軸索輸送不全が示唆され、ポストシナプスにおいても樹状突起スパインの成熟不全が認められた。よって protrudin はスパイン内輸送制御機構にも関与していることが示唆された。また電気生理学的解析により、KO で海馬神経のポストシナプスの過興奮が認められた。マウス海馬初代培養細胞で、Phos-tag-PAGE および質量分析計により、protrudin が神経活動依存的にリン酸化亢進されること、また PKA や PKC の関与を見いだした。そして protrudin の PtdIns5P との結合は、これらキナーゼの活性化により抑制されたため、神経活動依存的なシグナルの下流で protrudin と PtdIns5P の作用が制御されていることが示唆された。

(5) 神経細胞内 protrudin 結合タンパク質 TMEM55 の発見。

神経細胞において protrudin 複合体を精製し、質量分析計により結合タンパク質の網羅的解析を行った。神経細胞内の生理的な複合体を同定するための工夫として、内在性量に近い低発現となるようにレンチウイルスにて遺伝子導入し、また高感度の質量分析計 Orbitrap Velos Pro を使用した。その結果、PtdIns5P 生合成酵素である TMEM55 が高頻度で再現性良く同定され、protrudin、PtdIns5P、TMEM55 の相互作用が示された。

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 7 件)

(1) Saita, S., *Shirane, M. and Nakayama, K.I.:

Selective escape of proteins from mitochondria during mitophagy. *Nature Commun.*, 4: 1410-1423 (2013) [* Corresponding author], DOI: 10.1038/ncomms2400 (査読有)

(2) 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), DOI: 10.1091/mbc.E11-01-0068 (査読有)

(3) Saita S., Shirane M., Natsume T., Iemura S., Nakayama, K.I.: Promotion of Neurite Extension by Protrudin Requires Its Interaction with Vesicle-associated Membrane Protein-associated Protein. *J. Biol. Chem.*, 284: 13766-13777 (2009), DOI: 10.1074/jbc.M807938200 (査読有)

(4) Shirane, M., Ogawa, M., Motoyama, J., Nakayama, K.I.: Regulation of apoptosis and neurite extension by FKBP38 is required for neural tube formation in the mouse. *Genes Cells*, 13:635-651 (2008), DOI: 10.1111/j.1365-2443.2008.01194.x (査読有)

(5) 細田将太郎、白根道子、中山敬一: マイトファジーにおける選択的タンパク質脱出の発見と機構解析 *細胞工学* (2013, in press), <http://gakken-mesh.jp/journal/saibo/> (査読無)

(6) 白根道子: リサイクリング小胞輸送による神経突起形成の機構, *蛋白質核酸酵素 増刊号 メンブレントラフィックの奔流* 53: 2202-2206 (2008), <http://www.kyoritsu-pub.co.jp/> (査読無)

(7) 白根道子: FKBP38と相互作用するタンパク, *生体の科学* 59: 548-552 (2008), <http://www.igaku-shoin.co.jp/journalPortal.do?journalPortalId=425> (査読無)

[学会発表] (計 12 件)

(1) Shirane, M. and Nakayama, I.: Protrudin-binding sphingolipid regulates Rab11-dependent synaptic function via interaction with sphingolipid, **Hot Spring Harbor Symposium** (2010. 8. 20, Fukuoka)

(2) Shirane, M.: Protrudin Interacts with Rab11-GDP and Induces Neurite Formation by Directional Membrane Trafficking, **Symposium on Molecular Soft Interactions at Biomembrane Interface** (2008. 1. 26, Fukuoka)

(3) Shirane, M.: Protrudin Interacts with Rab11-GDP and Induces Neurite Formation by

Directional Membrane Trafficking, **NAIST-GCOE International Symposium** (2008. 1. 15, Nara)

(4) 白根道子: 小胞輸送による樹状突起スパイン制御の分子機構, **第 84 回生化学会シンポジウム「メンブレントラフィック最近のトレンド」** (2011. 9. 24 京都)

(5) 白根道子: プロトルーディンによるスフィンゴ脂質を介した Rab11 依存的シナプス制御, **包括脳ネットワーク研究会「神経科学と構造生物学の融合」** (2010. 10. 29 大阪)

(6) 白根道子: 神経疾患における細胞内輸送の関与, **日本農芸化学会西日本支部若手シンポジウム「農芸化学の新展開」** (2010. 10. 23 福岡)

(7) 白根道子: プロトルーディン変異マウスにおける神経疾患と小胞輸送との関連, **G 蛋白質シグナル公開シンポジウム** (2009. 3. 14 福岡)

(8) 白根道子: 神経機能制御におけるプロトルーディン依存的細胞輸送の関与, **G タンパク質特定領域・膜輸送複合体特定領域合同若手 WS シンポジウム** (2009. 1. 30. 神戸)

(9) 白根道子: 脂質のトラフィックによる神経機能制御, **メンブレントラフィック・細胞内ロジスティクス合同シンポジウム** (2009. 1. 29 東京)

(10) 白根道子: Protrudin ノックアウトマウスにおける神経疾患と膜輸送との関連, **2008 年度シナプス研究会「シナプス成熟と可塑性のダイナミクス」** (2008. 12. 4 岡崎)

(11) 白根道子: Protrudin interacts with Rab11-GDP and induces neurite formation by directional membrane trafficking, **日本細胞生物学会シンポジウム** (2008. 6. 29 横浜)

(12) 白根道子: Protrudin の脂質結合を介した神経機能制御への関与: Protrudin ノックアウトマウスからの知見, **BMB2008 シンポジウム** (2008.12.12 神戸)

[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

白根 道子 (SHIRANE MICHIKO)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授
研究者番号：90398082