

機関番号：32684

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2011

課題番号：21890269

研究課題名（和文）軸索側での ADAM22 の局在機構及びミエリン形成機構と結合分子の解析

研究課題名（英文）ADAM22 localization mechanism and myelin formation at the Axon.

研究代表者

小川 泰弘 (OGAWA YASUHIRO)

明治薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00531948

研究成果の概要（和文）：本研究は、神経細胞に発現する ADAM22 タンパク質の機能を、情報を送る構造である軸索において解明することを目的としていた。研究の結果、ADAM22 が軸索に局在するための領域を解明することができた。さらに、ADAM22 と結合する新規の分子群を発見し、実際に ADAM22 と結合することが解明された。これにより、ADAM22 が神経細胞のイオンチャネルを調節する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to analyze the function of ADAM22 in the neuronal axonal side. We found new interacting molecules with ADAM22, and showed that these molecules associate with ADAM22. Our data suggest that ADAM22 modulate ion-channel activity in neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：遺伝子、神経科学、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

(1) Kv1 チャンネルは PDZ 結合領域を有しており、この領域は PDZ 領域を 3 つ有する PSD-95/PSD-93 など MAGUK ファミリー分子と結合する。申請者らは、軸索起始部において Nav1 チャンネルの局在だけでなく Kv1 チャンネルも同領域に局在することを解明し、この局在機構には PSD-93 が必要であることを RNAi 法

およびノックアウトマウスの解析により解明した。

(2) 興味深いことに、Horresh らはランビエ絞輪でのジャクスタパラノード領域で PSD-95/93 非依存的に Kv1 チャンネルが局在することを示した (Horresh et al., *J Neurosci* 28, 14213-22, 2008)。そこで申請者らは、

Kv1 チャンネルと結合する分子が他にも存在すると考え、Kv1.2 チャンネルの免疫沈降と質量分析法により、Kv1 チャンネルと結合する分子を解析した。その結果、免疫沈降法により Kv1 チャンネル結合タンパク複合体の中に、ADAM22 が存在することが解析された。また、ADAM22 の免疫染色によりこの局在が Kv1 チャンネルと一致し、ランビエ絞輪のジャクスタパラノード領域に存在すること、そして Kv1 チャンネルと同様に PDZ 結合領域を有する ADAM22 が、PSD-95/93 の PDZ ドメインを介して結合していることを解明した。しかしながら、PSD-95/93 の両方をノックアウトしたマウスにおいて、ADAM22 及び Kv1 チャンネルはランビエ絞輪でのジャクスタパラノードに局在できることがわかった。すなわち、Kv1 および ADAM22 は PSD-95/93 のような PDZ 領域を介した結合に依存することなく、ジャクスタパラノード領域に局在することが解明された。しかしながら、Kv1 チャンネル及び ADAM22 のジャクスタパラノード領域での詳細な局在機構は解明されていない。

(3) ADAM22 のノックアウトマウスは、末梢神経系でのミエリン形成不全および運動失調を起こすことが示された (Sagane et al., *BMC Neurosci*, 6, 33, 2005)。そのため、ミエリン形成及びそれに付随したランビエ絞輪における ADAM22 の役割は非常に重要であろうと考えられるが、ミエリン形成に対しどのような機構で ADAM22 が関わってくるかは全く不明である。

2. 研究の目的

ADAM22 はシナプス後膜での調節機能に着目されてきたが、申請者は、免疫染色において ADAM22 は軸索側に局在して観察されることから、「ADAM22 は多機能な膜タンパクであり、これと結合する分子の違いやニューロンでの局在領域によって多種の機能を示す」こと

を予想していた。背景2の知見において、Kv1 チャンネルや ADAM22 のような膜タンパクの局在には PDZ 結合領域を介したものの以外にも新規の機構が存在することが示される。また背景3において、ミエリン形成は通常、ニューロンの軸索側からシュワン細胞に対しサイトカインによるシグナルを伝達することでミエリン形成を調節することが定説であったが、本研究ではそれとは逆にシュワン細胞からのシグナルで軸索に対し何らかの影響を与えることでミエリン形成を調節する機構の存在が示される。そこで、申請者は ADAM22 の軸索側での機能に焦点をあて、ADAM22 と結合する分子群の探索及びそれらの機能解析を行った。

3. 研究の方法

(1) ADAM22 の軸索への局在機構を解明する目的で、HA タグ付き ADAM22 改変タンパク質を、PCR 法を用いて常法に従い作製した。胎生期 18.5 日齢ラット胎仔より調整した培養海馬神経細胞、培養 7-9 日目に lipofection 法を用いてこれらの発現コンストラクトを導入し、その後、免疫染色法を用いて解析した。

(2) ADAM22 は細胞内領域において 2 カ所の 14-3-3 タンパク質結合領域を有する。そのため、ADAM22 と 14-3-3 タンパク質の相互作用さらに Kv1 チャンネルと PSD-95 等との相互作用を検討する目的で、14-3-3 タンパク質をクローニングし、GFP 融合タンパク質発現コンストラクトを作製した。これらを基に、Cos7 細胞に、ADAM22、PSD-95、Kv1.4、14-3-3-GFP タンパク質をそれぞれの組合せで共発現し、その後免疫染色法により解析した。

(3) ADAM22 と新規に結合するタンパク質を解析する目的で抗 ADAM22 抗体を用いた免疫沈降と質量分析 (LC-MS) を組み合わせて結合タンパク質の同定を行った。このとき、免疫

沈降法では、使用される界面活性剤によってその結合分子が変化することから、界面活性剤として通常使用される TritonX-100 及び、Brij98、Lubrol WX と、Caspr2-Kv1 チャンネルの結合を解析することができる sucrose monolaurate を使用した。免疫沈降した共沈物は 1D ゲルにて展開後直ちに Oriole (BioRad) にて蛍光染色し、ゲル片を切り出した後質量分析(LC-MS)を受託にて行った。また、これによって解析された標的タンパク質をクローニングし、ADAM22 と共発現することによって実際に結合するか、またその領域で結合するかを検討した。

4. 研究成果

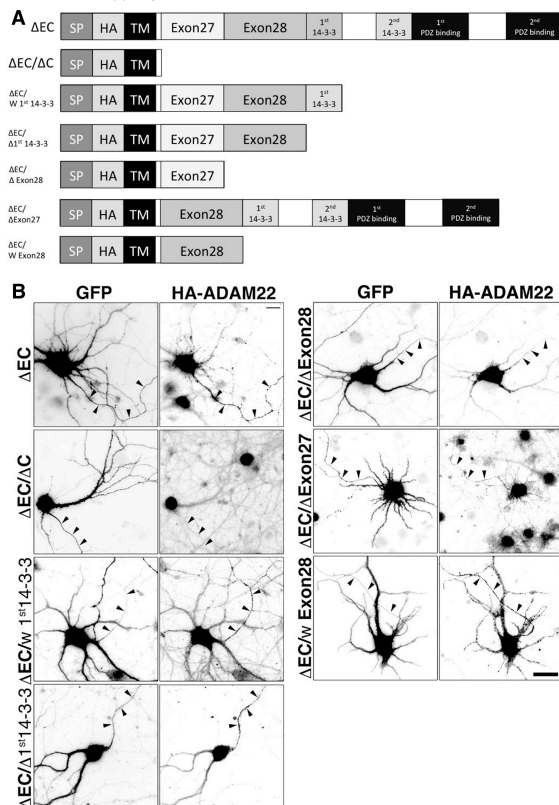


図 1 (A) ADAM22 の種々の細胞内領域改変体の模式図。(B) それぞれの改変体を培養海馬神経細胞に発現し、その局在を抗 HA 抗体により解析

(1) ADAM22 の軸索へのターゲティング機構を解明する目的で培養神経細胞に様々な ADAM22 の改変体発現コンストラクト (図 1 A) を導入したところ、ADAM22 の細胞外領域を欠

損したもの (ΔEC) において軸索へのターゲティングには十分であり、さらに細胞内・外領域を欠損させる ($\Delta EC/\Delta C$) とそのターゲティングは観察されないことから、ターゲティングモチーフは細胞内領域にあることが示された。さらに PSD-95/93 と結合する領域を含まない発現コンストラクト ($\Delta EC/w 1^{st} 14-3-3$)、ADAM22 細胞内領域において結合することがわかっている 14-3-3 と結合する領域 ($\Delta EC/\Delta 1^{st} 14-3-3$) を含まない発現コンストラクトにおいても軸索への局在が確認された。しかし、14-3-3 領域を含まず Exon28 に該当する領域を欠損すると軸索への局在は観察されなかった ($\Delta EC/\Delta Exon28$)。そこで、その先である膜直下の領域である Exon27 のみを欠損させたもの ($\Delta EC/\Delta Exon27$) を発現させると軸索に局在した。さらに、Exon28 に該当し 14-3-3 領域を含まない非常に小さいフラグメント ($\Delta EC/w Exon28$) を発現させたところ軸索に局在することが確認された (図 1 B)。よって、この領域が軸索のターゲティングに必要であることが示され、14-3-3 の結合及び PSD 結合領域と相互作用する MAGUKs ファミリーである PSD-95/93 の結合は必要としないことが解明された。Kv1 チャンネルは膜輸送に MAGUKs を使用し、軸索へは Kv β サブユニットと EB1 分子により輸送されることから、これらとは全く別の輸送経路によって軸索に運ばれることが解明された。

(2) ADAM22 のエンドサイトーシスに対し 14-3-3 タンパク質の存在下において影響が起こるかを検討する目的で種々のサブタイプの 14-3-3 タンパク質をクローニングし細胞外に HA タグを付加した ADAM22 と Cos7 細胞に共発現したが、エンドサイトーシスの延長などは観察されなかった (data not shown)。ADAM22 は、Kv1 チャンネルと

PSD-95 等 MAGUKs タンパク質によって作られるクラスターにおいて PDZ 結合領域を介してそのクラスターに取り込まれることから、14-3-3 タンパク質においてもそのクラスターに取り込まれるかを検討する目的で、4つの遺伝子を Cos7 細胞に共発現した。この結果、14-3-3 は ADAM22 が存在しない状態では 14-3-3 タンパク質はクラスターに含まれないが、ADAM22 存在下ではクラスターに含まれることが明らかになった (図2)。このことから、Kv1 チャネル-PSD-95-ADAM22 クラスターにおいて 14-3-3 タンパク質が膜直下で何らかのシグナル伝達系に関与することが示唆された。

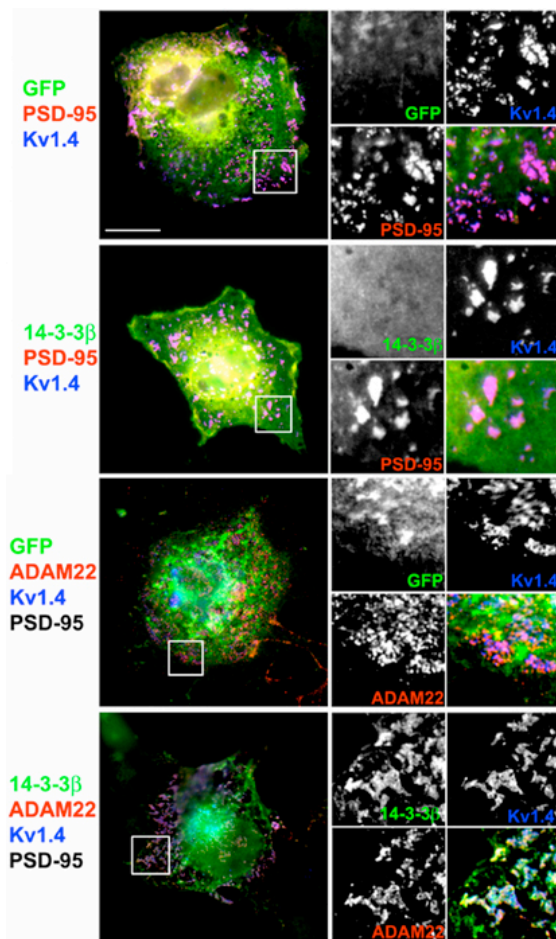


図2 ADAM22 は 14-3-3 タンパク質を Kv1 チャネル-PSD-95 クラスターに取り込む

(3) ADAM22 と結合するタンパク質を網羅的に解析する目的で、ADAM22 抗体を用いて免疫

沈降し、その共沈物を 1D ゲルにて展開後、質量分析によりそのタンパク質を同定した。その結果、ADAM22 と結合することが解明できているもの、ランビエ絞輪に局在しその結合が予想されるもの等を確認することができた。今回さらに全く新規の共沈物として膜タンパク質として Na⁺/K⁺atpase alpha3、Slc8a2、Slc12a5、Tenascin-R が、分泌タンパク質として Cfh (Complement factor H) 及び Olfm1 が、新規の足場タンパク質として Safb が確認できた。Olfm1 は中枢神経系において機能は不明であったことから、これをクローニングし ADAM22 と直接結合できるかを検討した。Cos7 細胞に ADAM22-GFP と Olfm-HA を共発現させ、未固定の条件で抗 HA 抗体を加え、洗浄後通常の抗体染色を行うことにより、細胞外で ADAM22 と結合できるかを検討した。このとき、コントロールとして使用した CD4-GFP と比較して非常に強いシグナルが観察されたことから Olfm1 は ADAM22 と細胞外で結合することが解明された。さらに、ADAM22 のどの領域と結合するかを検討する目的で、ADAM22 の種々の改変タンパク質を構築し同様の解析を行ったところ、メタロプロテアーゼの欠損型において Olfm1 の結合が減少したことから、メタロプロテアーゼ領域を介して結合することが明らかとなった (図3)。次にマウス成獣脳組織を用いて Olfm1 の免疫抗体染色を行ったところ、Olfm1 は大脳皮質においてニューロンにシグナルが観察されたことから Olfm1 はニューロンより分泌されることを解明したが、ADAM22 のシグナルが非常に強い小脳ピンソウシナプスやジャクスタパラノード領域では観察できなかった (data not shown)。ADAM22 はシナプスにおいても局在し、そのシグナルは免疫染色においては観察されないことから、おそらく Olfm1

は ADAM22 とシナプスで相互作用すると予想される。そこで、*Olfm1* のノックダウン用コンストラクトを作製し、現在その機能について解析を進めている。

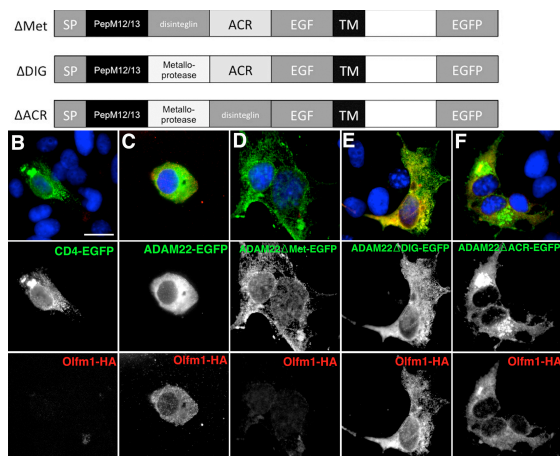


図3 *Olfm1* は ADAM22 の細胞外のメタロプロテアーゼドメインで結合する。

以上の結果から、ADAM22 は Kv1 チャネルとは別の機構を介して軸索上に局在すること、14-3-3 を膜直下に集積させることによってイオンチャネルの活性等に影響を与える可能性が明らかとなった。さらに、*Olfm1* は、神経堤細胞への分化にかかわることが報告されているが、中枢神経系においてはその発現は豊富にあるにもかかわらずその機能は不明であった。今回の研究成果より新たに *Olfm1* が ADAM22 と細胞外ドメインにおいて結合することが解明されたため、ADAM22-*Olfm1* の新たな機能を解明する手助けになると考えられる。

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 2 件)

- ① Ogawa Y., Oses-Prieto J., Kim M.Y., Horresh I., Peles E., Burlingame A.L.,

Trimmer J.S., Meijer D. & Rasband M.N.: ADAM22, a Kv1 channel-interacting protein, recruits membrane-associated guanylate kinases to juxtaparanodes of myelinated axons. *Journal of Neuroscience* (査読有) 30, 2010, 1038-1048.

- ② Ogawa Y., Rasband MN.: Proteomic analysis of optic nerve lipid rafts reveals new paranodal proteins. *Journal of Neuroscience Research* (査読有) 87, 2009, 3502-3510.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 小川 泰弘 (代表) Kv1チャネルと結合するADAM22はジャクスタパラノードにMAGUKsタンパク質を局在させる
Neuro2010 2010年9月2-4日 神戸コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 泰弘 (OGAWA YASUHIRO)

明治薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00531948