

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500398

研究課題名(和文) 選択的タンパク質分解を介したブレインサイズ決定機構の解明

研究課題名(英文) Towards a better understanding of corticogenesis by the selective proteolysis of a protein kinase

研究代表者

若月 修二 (Wakatsuki, Shuji)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第五部・室長

研究者番号：00378887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、研究代表者のグループが独自に発見したユビキチンリガーゼZNR1が酸化・還元環境の変化に応答して活性化し、神経細胞の細胞内反応を調節することによって、大脳皮質形成を制御する可能性が示唆された。今後、選択的タンパク質分解制御の観点からこの可能性をさらに詳細に検討することにより、大脳皮質形成過程のさらなる理解に繋がる新しい知見が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported that ZNR1 ubiquitin ligase promotes Wallerian degeneration by degrading AKT to induce GSK3B activation. ZNR1 starts to degrade AKT only after neuronal injury, but the mechanism of ZNR1 activation in response to invasive stimulations has been unclear. Here we show that oxidative stress activates ZNR1 by inducing its phosphorylation in neurons. We also found by using in vitro and in vivo models that the pathophysiological significance of ZNR1-mediated signaling in the regulation of murine corticogenesis, and elucidating the underlying the phosphorylation mediated regulatory mechanism of its catalytic activity is useful for a better understanding of corticogenesis by the selective proteolysis of AKT.

研究分野：神経科学

キーワード：プロテアソーム リン酸化シグナル 神経発生 大脳皮質形成 小頭症

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質形成の初期過程では脳室帯に生じた神経前駆細胞が大脳の表面へ向かい移動を開始し、移動した先で分化を遂げた神経細胞が層構造を構築することにより大脳皮質を形成する。脳室帯における神経前駆細胞の産生や神経前駆細胞の大脳の表面への細胞移動は大脳皮質形成のために必須の過程であり、この過程に関与する遺伝子の機能が異常になると大脳の層構造の形成が正しく行われなくなり、結果としててんかんや精神発達遅滞などの原因となることが報告されている。例えば、小頭症や滑脳症は大脳皮質の形成異常を形態的特徴とする症候群であり、脳室帯での細胞分裂において染色体の分配不全による神経前駆細胞の産生異常(中心体形成に必要な CENPJ の機能異常による小頭症など)や、細胞骨格系の制御異常による細胞移動の異常(細胞移動の制御に関与する細胞内シグナルを制御分子である cyclin-dependent kinase 5 の機能異常による滑脳症など)などについては原因遺伝子が同定されているが、分子機構の詳細を説明する十分な理解が得られていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者のグループは、末梢神経傷害後に神経繊維を構成する軸索の持ち主である神経節において発現が上昇する遺伝子のスクリーニングを行い、RING フィンガー領域に E3 ユビキチンリガーゼ活性を持つ新規タンパク質 zinc and ring finger 1 (ZNR1) を同定した (Araki T. et al. J Biol Chem. 2001)。その後の解析から、ZNR1 は軸索変性過程においてセリン・スレオニンキナーゼ AKT を UPS 依存的に分解し、AKT およびその下流シグナルを軸索から失わせることによって軸索変性の進行を促進することが明らかとなった (Wakatsuki S. et al. Nat Cell Biol 2011)。ZNR1 は神経細胞全般に発現を認めるが、詳細な組織学的解析により、脳室帯など発生過程初期の神経細胞、ならびに神経前駆細胞に強く発現することから、神経前駆細胞の分裂、移動、分化など神経発生への寄与が示唆されていた。実際、Cre/loxP システムにより野生型 ZNR1 を過剰発現できる Tg マウスを作出し、nestin-Cre Tg マウスとの掛け合わせにより ZNR1 を神経細胞全般に発現させたところ、顕著な大脳皮質形成異常を認めた。これらのことから、ZNR1 を起点としたシグナルカスケードが調節する分子メカニズムが大脳皮質形成に関与する可能性が強く示唆された。本研究では、この可能性に関して実験的検証を与えることにより、大脳皮質形成過程の理解に貢献する新たな知見を得ることを目的として開始された。

3. 研究の方法

本研究では ZNR1 を起点とした UPS 依存的なタンパク質分解機構が大脳皮質形成においてどのような生理的役割を担うのかを明確にするための以下の実験を行った。

ZNR1 活性化メカニズムに関する解析

ZNR1 はそのユビキチンリガーゼ活性によって軸索変性を進行させるが、ZNR1 を過剰発現させるだけでは軸索変性を誘導できないことから、軸索変性開始前後で ZNR1 のユビキチンリガーゼ活性を亢進させるメカニズムを想定された。軸索変性過程では活性酸素種による酸化ストレスの上昇、細胞内カルシウムイオンレベルの上昇や細胞内 ATP レベルの変化など、アポトーシスを誘導するメカニズムとよく似た変化が観察されている。そこで、これらの変化を人工的に誘導した場合の ZNR1 の活性化状態の変化、すなわちユビキチンリガーゼ活性の変化について、AKT のユビキチン化を指標に調べることにより、活性制御に関連するに刺激を調べた。また、ZNR1 を対象にチロシンリン酸化サイトやチロシンリン酸化に直接関わるチロシンキナーゼを生物情報科学的なアルゴリズムに基づいて予測し、これに基づいて作製した ZNR1 チロシンリン酸化不全変異分子を活用したり、チロシンキナーゼ阻害剤の利用により実験的に検証したりすることにより、ZNR1 の活性化メカニズムの詳細を調査した。

大脳皮質形成における ZNR1-AKT-GSK シグナルの生理的意義に関する解析

子宮内エレクトロポレーション法を応用して、研究代表者らが独自に同定した ZNR1-AKT-GSK シグナルカスケードの分子機能をマウス胎仔の大脳皮質細胞で任意の発生段階で操作し、それぞれの分子の果たす役割の詳細を調べた。具体的には、ZNR1-AKT-GSK シグナルカスケードのそれぞれの分子を過剰発現、あるいは RNA 干渉による発現抑制し、遺伝子導入した細胞を追跡することによって、細胞移動、細胞増殖、細胞死について調べ、大脳皮質形成に与える影響を総合的に評価した。

ZNR1 Tg マウスの解析

神経前駆細胞特異的に ZNR1 を過剰発現する Tg マウス系統は野生型マウスと比べて大脳が特異的に小さく小頭症様の所見を示した。本研究ではこの表現型について、免疫染色を中心とする組織学的な解析を行った。

4. 研究成果

計画を進めていく上で、これまでに次に示すような研究結果を得ている。

動物個体を用いた解析により明らかとなったこととして、

マウス胚大脳皮質の神経前駆細胞に対して ZNR1 遺伝子を過剰発現させることにより、大脳皮質形成、特に神経細胞が構築する層構造の形成が異常になった。

ZNR1 の分子生化学的解析により明らかとなったこととして、

AKT がプロテアソーム依存的に分解されることにより、Glycogen synthase kinase 3B が活性化した。

酸化ストレスを与えて細胞内を酸化条件にすることにより、チロシンリン酸化された

ZNRF1 の存在量が相対的に増加するとともに、
ユビキチンリガーゼ活性が亢進した。

ZNRF1は細胞内 ROS 産生を介して活性化する、
上皮細胞増殖因子受容体などのチロシンキ
ナーゼによって直接リン酸化された。

発生段階の神経細胞に ZNRF1 を過剰発現
させたトランスジェニックマウスは小頭症
の症例とよく似た所見を示した。

小頭症の原因遺伝子に関する報告例は有糸
分裂に直接関連する 8 種のみであり、有糸分
裂の異常が細胞数の減少を来とし、結果とし
て小頭症の症状に繋がるとされる。ZNRF1 の
過剰発現は培養細胞レベルでは細胞増殖には
影響を与えないことから、野生型 ZNRF1 Tg
マウス系統の表現型は有糸分裂の異常とは
別の分子メカニズムによって生じていると
考えられた。

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 3 件)

Wakatsuki, S., Saitoh, F., Araki, T.,
ZNRF1 promotes Wallerian degeneration by
degrading AKT to induce GSK3B-dependent
CRMP2 phosphorylation. Nat. Cell Biol.,
査読有, vol.13, 2011, 1415-1423.

<http://www.nature.com/ncb/journal/v13/n12/full/ncb2373.html>

Togashi, K., Wakatsuki, S., Furuno, A,
Tokunaga, S, Nagai, Y, Araki, T., Na+/H+
exchangers induce autophagy in neurons and
inhibit polyglutamine-induced aggregate
formation. PLoS ONE, 査読有, vol.8, 2013,
e81313.

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0081313>

Wakatsuki, S., Araki T., Sehara-
Fujisawa A., Neuregulin-1/glia1 growth
factor stimulates Schwann cell migration
by inducing alpha5beta1 integrin-ErbB-
focal adhesion kinase complex formation.
Genes Cells, 査読有, vol.19, 2014, 66-77.
<http://online.library.wiley.com/doi/10.1111/gtc.12108/abstract>

[学会発表](計 23 件)

若月 修二

軸索変性の分子細胞生物学的解析とその治
療応用に関する研究

新学術領域研究「脳内環境：恒常性維持機構
とその破綻」冬の班会議 2015 年 1 月 8 日, 9
日 広島 広島大学 応仁会館

若月 修二

区画化培養を用いた in vitro NMJ 形成の評
価系の確立

再生医療実現拠点 NW プログラム 疾患特異
的 iPS 細胞を活用した難病研究 疾患特異的
iPS 細胞を活用した筋骨格系難病研究 平成
26 年度筋骨格領域カンファレンス第 3 回
2015 年 2 月 27 日 東京 国立精神・神経医療
研究センター 神経研究所 研究棟本館

若月 修二

神経軸索を壊す分子メカニズム

国立精神・神経医療研究センター・山梨大学
医学研究科若手研究者セミナー

2015 年 3 月 16 日 山梨 山梨大学医学部臨床
小講堂

若月 修二

軸索変性の分子細胞生物学的解析とその治
療応用に関する研究

新学術領域研究「脳内環境：恒常性維持機構
とその破綻」班会議 2014 年 7 月 24 日, 25
日 名古屋 WINC AICHI

若月 修二, 荒木 敏之

神経軸索変性におけるオートファジーの生
理的意義

第 87 回日本生化学会年会シンポジウム「病
態メカニズムへのオートファジーの多様な
関与」2014 年 10 月 15 日~10 月 18 日 京都
京都国際会議場

荒木 敏之, 若月 修二

MCL1 リン酸化反応が誘導するオートファジ
ーのワーラー変性における役割

第 14 回日本ミトコンドリア学会年会 2014 年
12 月 3 日~12 月 5 日 福岡 九州大学 百年
講堂

荒木 敏之, 若月 修二

平成 26 年度精神・神経疾患研究開発費 25-4
「難治性ニューロパチーの診断技術と治療
法の開発に関する研究」班 班会議 2014
年 12 月 18 日 東京 都市センターホテル

若月 修二

軸索変性の分子細胞生物学的解析とその治
療応用に関する研究

新学術領域研究「脳内環境：恒常性維持機構
とその破綻」班会議 2014 年 1 月 8 日, 9 日
東京 東京ガーデンパレス

若月 修二

神経変性におけるオートファジー誘導の分
子メカニズム

第 7 回オートファジー研究会 2013 年 12 月
19 日~12 月 21 日 掛川 ヤマハリゾートつ
ま恋

萩原 裕子, 齋藤 文典, 若月 修二,
荒木 敏之

糖化タンパク質が関与する末梢神経ミエリ
ン化調節機構の解明

第 35 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3
日~12 月 6 日 神戸 神戸ポートアイランド

若月 修二, 荒木 敏之

GSK3B が制御する軸索変性の分子メカニズム
とミトコンドリア機能

第 86 回日本生化学会年会シンポジウム「ミ
トコンドリア新機能と破綻による疾患」2013
年 9 月 11 日 横浜 パシフィコ横浜

若月 修二

軸索変性の分子細胞生物学的解析とその治
療応用に関する研究

新学術領域研究「脳内環境：恒常性維持機構
とその破綻」班会議 2013 年 8 月 29 日, 30
日

京都 京都大学 芝蘭会館

若月 修二

軸索変性の分子細胞生物学的解析とその治療応用に関する研究

新学術領域研究「脳内環境：恒常性維持機構とその破綻」班会議 2013年1月16日, 17日

京都 京都大学 芝蘭会館

萩原 裕子, 齋藤 文典, 若月 修二, 荒木 敏之

糖化タンパク質が関与する末梢神経ミエリン化調節機構の解明と脱髄性疾患への治療応用

第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11日~12月14日 福岡 マリンメッセ福岡

齋藤 文典, 若月 修二, 荒木 敏之
代謝型グルタミン酸受容体を介したシュワン細胞の増殖・分化制御機構

第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11日~12月14日 福岡 マリンメッセ福岡

山崎 昂彦, 若月 修二, 荒木 敏之
軸索変性過程におけるチロシンキナーゼ JAK の機能解析

第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11日~12月14日 福岡 マリンメッセ福岡

Araki T. and Wakatsuki S.

Mechanism of axonal degeneration and its possible therapeutic application against neurological disorders

第55回日本神経化学会大会シンポジウム 2012年9月29日~10月2日 神戸 神戸コンベンションセンター

若月 修二

軸索変性の分子細胞生物学的解析とその治療応用に関する研究

新学術領域研究「脳内環境：恒常性維持機構とその破綻」班会議 2012年7月23日, 24日

仙台 TKP ガーデンシティ仙台

国際学会発表

Hagiwara S., Saito F., Wakatsuki S., and Araki T.

Protein glycation affects peripheral nerve myelination mechanism and is involved in the pathogenesis of demyelinating disorders.

Society for Neuroscience 44th Annual Meeting (Neuroscience 2014) 2014. 11. 15-11.19. Washington. DC, US. Walter E. Washington Convention Center

Wakatsuki S.

Oxidative stress-dependent phosphorylation activates ZNRF1 ubiquitin ligase to induce neuronal apoptosis and Wallerian degeneration.

Neurodegenerative diseases conference in Cold Spring Harbor Laboratory "Neurodegenerative Diseases: Biology & Therapeutics" 2014. 12. 4. New York US. Cold Spring Harbor Laboratory

21 Araki T. and Wakatsuki S.

GSK3B Activity Affects Mitochondrial Functions and Autophagy during Wallerian Degeneration.

International Symposium on Mitochondria 2013/The 13th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine 2013. 11. 07. Tokyo Japan. Roppngi Academy Hills.

22 Wakatsuki S. and Araki T.

Role of ubiquitin proteasome system in axon degeneration: ZNRF1 E3 ubiquitin ligase promotes Wallerian degeneration by degrading AKT to induce GSK3B-dependent CRMP2 phosphorylation.

Neurodegenerative diseases conference in Cold Spring Harbor Laboratory 2012. 11. 29. New York US. Cold Spring Harbor Laboratory

23 Wakatsuki S.

Role of ubiquitin proteasome system in axon degeneration.

Joint Symposium Max Planck Institute of Psychiatry and NCNP. 2012. 10. 4. Munich Germany. Castle Ringberg

〔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〕

ホームページ等

若月 修二, 荒木 敏之

ユビキチンリガーゼ ZNRF1 は AKT をプロテアソーム依存的に分解し GSK3B による CRMP2 のリン酸化を誘導することにより神経軸索の変性を促進する

ライフサイエンス新着論文レビュー
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/3957>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若月 修二 (WAKATSUKI, Shuji)

国立精神・神経医療研究センター

・神経研究所・室長

研究者番号：0037887

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし