

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870251

研究課題名(和文) 神経回路形成における新規リン酸化GAP43の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of novel GAP-43 phosphorylation sites in neuronal growth

研究代表者

河崎 麻実 (Kawasaki, Asami)

新潟大学・研究推進機構・超域大学院・助教

研究者番号：10609358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：GAP-43は神経軸索先端に極めて多く発現するリン酸化蛋白質である。近年、我々は神経発生過程のリン酸化プロテオーム解析を行い、GAP-43の新規リン酸化部位(Ser96、Thr172)を同定した。これらpSer/Thrを認識する特異的抗体を作成し、JNKが上流キナーゼとして制御していることを明らかにした。本研究ではJNKを介したGAP-43リン酸化の機能を明らかにするため、非リン酸化型GAP-43のノックインマウスを作製した。このノックインマウスにおいては、神経軸索の長さが野生型の50%程度であったことから、Ser96がGAP-43の軸索伸長機能に關与する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：GAP-43 is thought to be involved in the mechanisms regulating the growth of neuronal processes during development and axon regeneration. However, its role for the molecular signaling is poorly understood. Recently, we performed a quantitative phosphoproteomic analysis of axonal growth cones and identified the novel phosphorylation sites of GAP-43 (Ser96 and Thr172), which are extensively highly phosphorylated in vivo. Using specific antibodies of phospho-GAP-43 at these sites, we identified JNK was a major kinase responsible for these sites. In GAP-43 S96A knock-in mice, axonal growth of the primary cultured neurons was reduced by 50%, compared with that of wild-type mice. These results suggest that JNK-dependent phosphorylation of GAP-43 is one of the important signaling involved in axonal generation and regeneration.

研究分野：細胞生物学

キーワード：成長円錐 JNK GAP-43

1. 研究開始当初の背景

神経軸索の先端には成長円錐と呼ばれる非常に運動性の高い構造体が存在する。成長円錐は細胞骨格の再編成及び膜輸送により運動性を獲得し、軸索伸長を制御する。この成長円錐は、神経回路形成及び損傷後の軸索再生において最も重要な構造である。これまでに我々は *in vivo* 成長円錐におけるプロテオミクスを行い、神経成長に関連する分子基盤を明らかにした (PNAS, 2009)。しかしながら、これらの分子基盤を制御する情報伝達系については十分に理解されていない。

2. 研究の目的

我々は、この成長円錐における軸索成長制御機構の解明を目指し、網羅的な *in vivo* プロテオミクスにより、軸索伸長に必要な分子群を明らかにしてきた。最近では、これをさらに発展させる形で、成長円錐における情報伝達系を明らかにすべく、リン酸化プロテオミクスを行った。検出されたリン酸化ペプチドに関する *in silico* 解析の結果から、MAPK が責任キナーゼであると予測されるリン酸化タンパク質が非常に多く存在する事が明らかとなり、神経成長に重要なリン酸化経路であることが示唆された。中でも、成長円錐のマーカー分子として古くから知られる GAP-43 の新規リン酸化が顕著であった。GAP-43 は IQ モチーフ内の Ser41 が C-キナーゼ (PKC) でリン酸化される分子であり、*in vitro* での神経成長との関連性に関する研究報告が多数存在する。しかし、我々の *in vivo* でのリン酸化プロテオミクスでは、pSer41 は殆ど検出されず、IQ モチーフより C 末側の pSer96 及び pThr172 が高頻度に検出された。本研究では、GAP43 の分子機能を Ser96 及び Thr172 におけるリン酸化から明らかにすることを目的とし、以下の研究内容を実施した。

- ①責任キナーゼを同定
- ②リン酸化 GAP-43 の分子機能を解明
- ③リン酸化 GAP-43 の神経成長機能を解明

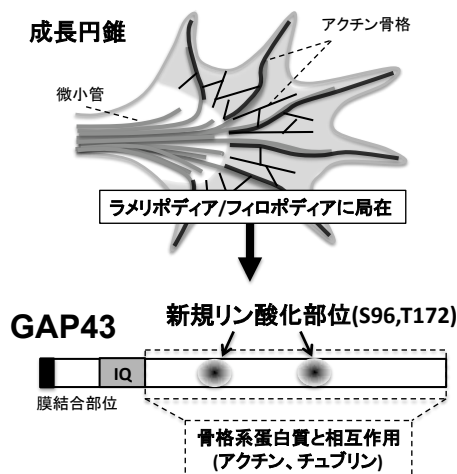


図1 成長円錐内でのGAP43の局在と分子構造

3. 研究の方法

- ①マウス胎仔由来初代培養神経細胞に対し、MAPK 阻害剤及び siRNA を処理し、リン酸化 GAP-43 の発現抑制効果についてイムノブロット法で解析した。
- ②HEK293 細胞に GAP-43(wt,S96A)を過剰発現させ、結合蛋白質を網羅的に解析した。
- ③GAP-43 S96A ノックイン及び GAP-43 T172A ノックインマウスを作製し、初代培養した神経細胞について、神経突起の長さを計測した。また、個体レベルでの神経発生についても、組織学的な解析を行った。

4. 研究成果

①責任キナーゼの同定
GAP-43 の新規リン酸化部位(Ser96, Thr172)とその周辺配列は、MAPK のコンセンサス配列であることが *in silico* 解析から予測された。MAPK にはいくつかのサブファミリーが存在しているため、その中でも代表的な ERK1/2、p38α/β/γ/δ 及び JNK1/2/3 の関与について阻害剤を用いた解析を行った。胎仔脳由来の初代培養神経細胞に対し、ERK1/2 inhibitor (U0126), p38α/β/γ/δ inhibitor (SB203586) 及び JNK1/2/3 inhibitor (SP600125) を処理した結果、SP600125 を添加した細胞においてのみ有為なリン酸化型 GAP-43(Ser96, Thr172) の発現レベルの低下が確認された。この結果から、*in vitro* では JNK1/2/3 が Ser96 及び Thr172 のリン酸化に関与している事が明らかとなった (図 2)。これに加え、JNK1/2/3 の MAPKK である MKK7 のノックアウトマウス(東京医科歯科大学 難治研究所 仁科博史教授より供与)の胎仔期 15.5 日目の脳についても、同様にリン酸化 GAP-43 の発現レベルが低下していた(図 3)。これらの結果から、*in vivo* 及び *in vitro* 共に神経成長過程で JNK1/2/3 を介した GAP-43 のリン酸化経路が活性化されていることが証明された。

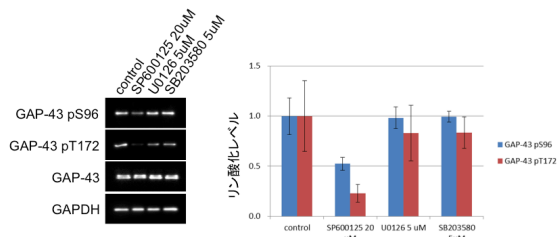


図 2 GAP-43 の責任キナーゼは JNK である (in vitro)

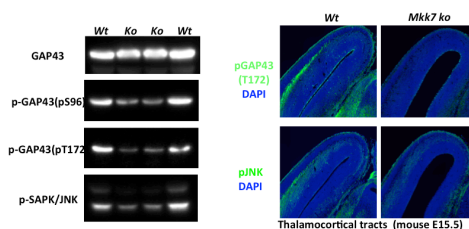


図 3 GAP-43 は MKK7/JNK 経路を介してリン酸化される (in vivo)

次に JNK1、JNK2 および JNK3 の siRNA を用いて RNA 干渉法を行い、ノックダウンした後、リン酸化 GAP-43 の発現レベルを評価した。Ser96 及び Thr172 におけるリン酸化は JNK1 の発現を抑制した細胞においてのみ低下する事が確認された(図 4)。

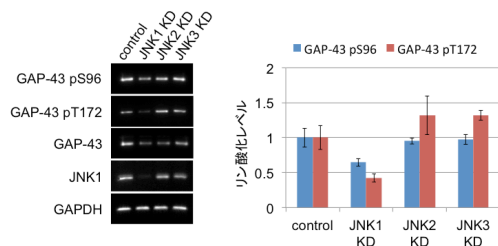


図 4 GAP-43 のリン酸化に関する JNK アイソフォーム特異性(*in vitro*)

②Ser96 におけるリン酸化により制御される GAP-43 の分子機能を明らかにするため、HEK293 細胞に GAP-43(wt,S96A)を過剰発現させ、結合蛋白質のスクリーニングを行った。この解析から、これまでに報告されている GAP-43 結合蛋白質以外に、細胞質蛋白質であるペルオキシダーゼが新たな結合分子である事が明らかになった。このペルオキシダーゼは、活性酸素を消去する酵素の中でも特に神経成長円錐に多く存在する分子であることも分かったので、現在 GAP-43 とペルオキシダーゼの結合解離を介した、神経成長に関わるレドックス制御メカニズムの解析を進めている。

③GAP-43 の Ser96 及び Thr172 におけるリン酸化の生理機能を解析するため、GAP-43 S96A ノックイン及び GAP-43 T172A ノックインマウスを作製した(図 5 A)。まずは、最もリン酸化が顕著であった Ser96 を Ala 置換したマウスについて解析を行った。培養細胞レベルでは、GAP-43 S96A KI では野生型と比較して、軸索の長さが顕著に短くなっていた(図 5 B,C)。このことから、Ser96 は GAP-43 の軸索伸長機能を制御する重要なリン酸化部位である事が示唆された。個体レベルでも神経回路形成の遅れについて組織学的な解析を行ったが、今のところ顕著な表現系は認められていない。これについては、②で述べたレドックス制御系の負荷をかけるなどの操作を加えて今後解析を進める予定である。

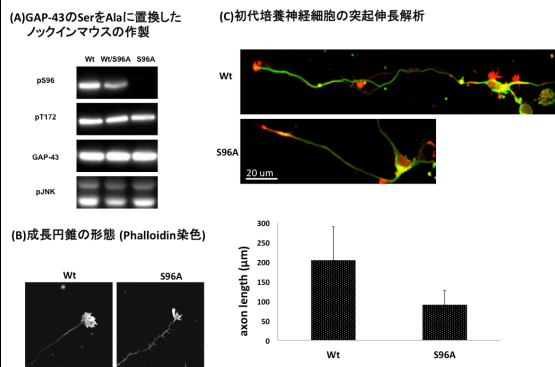


図 5 GAP-43 S96A ノックインマウスの作製及び突起伸長に関する評価(*in vitro*)

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 1 件)

1. Makoto Adachi*, Asami Kawasaki*, Hisashi Nojima, Eisuke Nishida, and Sachiko Tsukita, (*equal contribution), Involvement of IQGAP family proteins in the regulation of mammalian cell cytokinesis, *Genes to Cell*, 2014;19(11):803-20. 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

1. Asami Kawasaki, Masayasu Okada, Kosei Takeuchi, Kenji Sakimura, Michihiro Igarashi, JNK-mediated phosphorylation of GAP-43 promotes axonal growth, 第 5 回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム、新潟、2015/3/4~6

2. 河嵯 麻実、和田 芳野、岡田 正康、吉岡 望、野住 素広、武内 恒成、五十嵐 道弘、神経成長関連蛋白質 GAP-43 の JNK 依存性リン酸化は軸索伸長を促進する / JNK-dependent phosphorylation of GAP-43 promote axonal growth, 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014/11/25~27

3. 河嵯麻実、岡田正康、吉岡望、野住素広、武内恒成、五十嵐道弘、GAP-43 の新規のリン酸化は JNK の下流で軸索伸長を促進する / The novel JNK-dependent phosphorylation sites of GAP-43 promote axonal growth, 第 36 回日本分子生物学会年会、福岡、2013/12/3~6

4. 河嵯麻実、野住素広、武内恒成、五十嵐道弘、神経成長円錐マーカー分子 GAP-43 新規リン酸化ドメインとその認識抗体の応用、第 35 回神経組織培養研究会、大阪、2013/6/29~30

5. 河嵯麻実、武内恒成、野住素広、五十嵐道弘、成長円錐における網羅的なリン酸化タンパク質の探索 / Comprehensive searching of phosphorylated protein of the growth cone、

Neuro2013、京都、2013/6/20~23

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

河崙 麻実 (KAWASAKI ASAMI)
新潟大学・研究推進機構・超域学術院・助教
研究者番号：10609358