

研究課題別評価

1 研究課題名:

膜輸送分子 Protrudin による神経突起形成機構の解明と神経再生への応用

2 研究者氏名:

白根 道子

3 研究のねらい:

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、神経突起と呼ばれる突起を有している。神経変性疾患や、脳虚血・脳挫傷・脊髄損傷といった神経損傷において、神経再生の為に神経突起形成の分子機構を解明することは重要な問題である。私は中枢神経系に高発現しているイムノフィリン FKBP38 に結合する新規タンパク質 protrudin を同定し、その神経突起形成能を見出した。本研究課題においては、protrudin による神経突起形成のメカニズムを解明し、更に神経再生への応用を目指すことを目的とした。

4 研究成果:

脳の構成単位である神経細胞は、神経回路を形成するために多数の神経突起を出しており、情報の入力・出力を担っている。神経突起の中には1メートルにも及ぶ長いものも存在する。

これまで神経突起形成のメカニズムについては、細胞骨格の再構築の制御という観点で多くの研究がなされてきた。しかし、突起が形成されるということは必然的にその部位における細胞膜の表面積が増大することでもある。つまり神経突起を形成するためには突起部分の細胞膜を構成する材料を供給する必要があるが、細胞膜成分の輸送システムの機構についてはほとんど知られていなかった。

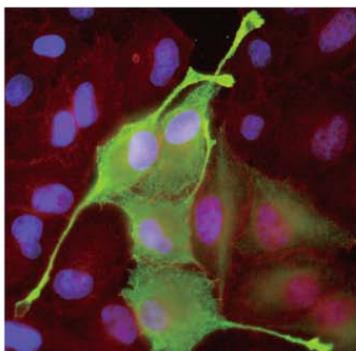
1) 膜のリサイクルによる神経突起形成

神経突起が形成されるためには、細胞内の膜成分が突起形成部位に限定して供給されなければならない。その突起への膜成分の供給は、細胞膜のリサイクルを介してなされていることが既に知られていた。細胞膜のリサイクルとは、細胞膜の一部が細胞内に取り込まれて(エンドサイトーシス)、リサイクルエンドソームという細胞内小器官にいったん回収され、再び特異的な部位に向けて分泌される(エキソサイトーシス)システムである。私は、このリサイクルシステムを制御することにより神経突起形成を誘導する活性を持つ新規のタンパク質を発見した。

2) 突起形成を誘導する protrudin の発見

私は、膜シャペロンタンパク質の FKBP38 が、結合分子の細胞内局在や機能を制御していることを明らかにしてきたが、FKBP38 の結合タンパク質を探索し、新規の膜タンパク質を同定した。たまたまこのタンパク質を HeLa 細胞(ヒト子宮頸癌由来)に過剰発現させたところ、神経突起を思わせるような突起が出現した(図 1)。

図1



Protrudinによる突起形成誘導

Protrudinを非神経細胞である子宮頸癌細胞株(HeLa細胞)に強制的に発現させると、神経突起に類似した突起が出現した。

(緑:Protrudin、赤:アクチンフィラメント、青:核)

この突起は、いわゆる filopodia と呼ばれるアクチンフィラメントを主体とする微小な構造物ではなく、

microtubule の芯が通ったシャフトのような大型の構造物であり、その先端は神経突起の成長円錐のような形態をしていた。そこで「突起が伸びる」という意味の“protrude(プロトルード)”という英語にちなんで、このタンパク質を“protrudin(プロトルーディン)”と命名した。

3) Protrudin の発現分布

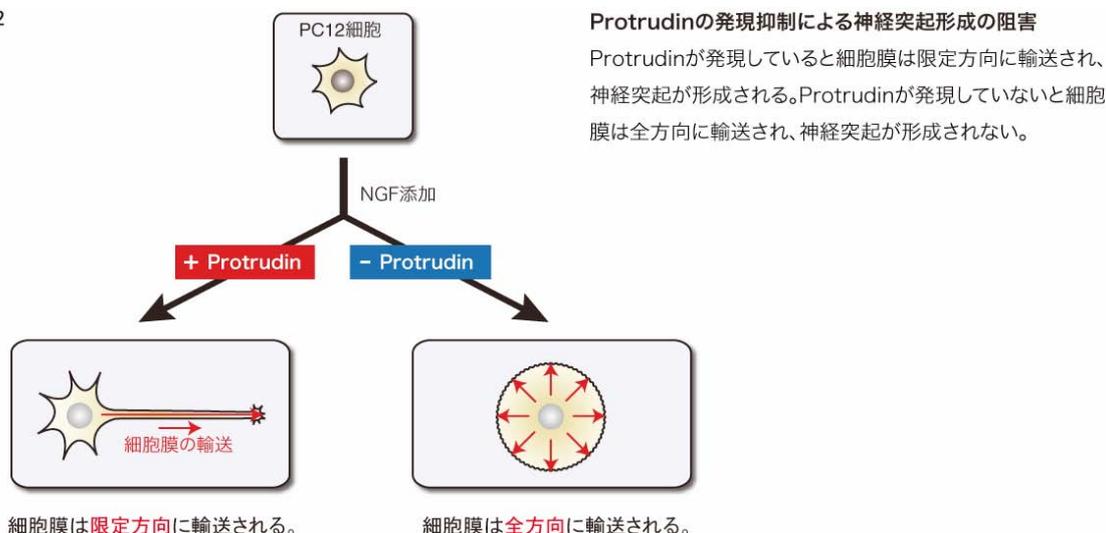
Protrudin の組織発現分布を調べたところ、脳、脊髄などの中枢神経系に高い発現が認められた。さまざまな細胞株において protrudin の発現レベルを比較すると、PC12 細胞などの神経細胞株で高い発現が認められた。

また、マウス脳神経の初代培養細胞において protrudin の細胞内発現分布を観察すると、細胞周縁の細胞膜や核に近接した中心体近傍、さらに神経突起先端の成長円錐に強い発現が認められた。PC12 細胞は神経成長因子 NGF を添加すると神経突起を形成する。PC12 細胞に NGF を添加すると、初め細胞質全体に分散していた Protrudin は、数時間後にいったん中心体近傍に強く蓄積し、その後突起の伸長と共に突起先端へと移動する、という特徴的な局在変化が観察された。また中心体近傍の protrudin が集積する部位は、Rab11 が局在するリサイクルエンドソームという細胞内小器官であった。

4) Protrudin の抑制による神経突起形成の阻害

PC12 細胞において RNAi により protrudin のタンパク質発現を低下(ノックダウン)させたところ、NGF 添加による神経突起形成が阻害された。NGF 添加の時間経過と共に、コントロール細胞では限定方向へ細胞膜が伸展して突起形成を示したのに対し、ノックダウン細胞では全方向へ細胞膜が伸展して細胞全体が広がった形態を示した(図 2)。よって protrudin は神経突起の形成に必要なタンパク質であることがわかった。

図 2



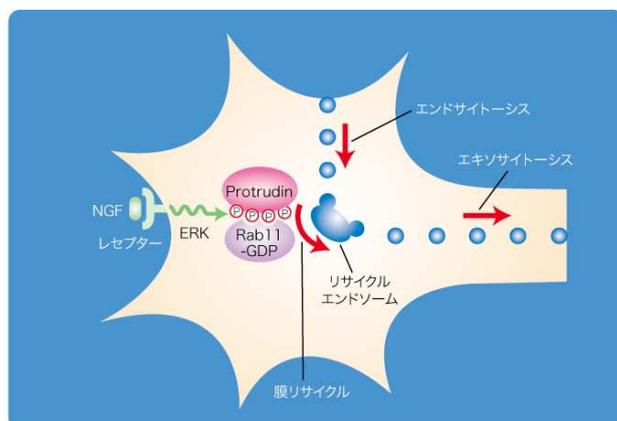
5) Protrudin と Rab11 の結合による膜リサイクルの制御

細胞内のさまざまな小胞輸送は各種膜系の変形や移動などを行っており、それらは Rab という GTPase タンパク質ファミリーによって厳密に制御されている。Rab11 はリサイクルエンドソームにおいて膜のリサイクル輸送を制御している分子である。共免疫沈降結合実験により、protrudin は GDP 結合型の Rab11 と結合することがわかった。Rab ファミリーを含む多くの GTP 結合タンパク質のエフェクター分子のほとんどが GTP 結合型に親和性を持ち、GDP 結合型には付かないことを考えると、protrudin はその点において特殊である。Protrudin の Rab11 結合部位は、GDP 結合型の Rab と結合する GDI(GDP Dissociation Inhibitor)と部分的に類似性があり、この点からも GDP 結合型に親和性を示す数少ないタンパク質のひとつであることが支持される。Protrudin と Rab11 の結合は、NGF 依存的に protrudin がリン酸化されることで促進されることがわかった。この詳細を検

討すると、NGFによって活性化されるMAPKのERKがprotrudinをリン酸化していることが明らかになった。さらにprotrudinが及ぼす膜リサイクルへの影響について検討するために、神経軸索特異的に輸送されるリサイクルエンドソームの動態を間接的な方法で観察した。その結果、protrudinが実際に方向限定的な膜リサイクルの促進作用を有することが明らかになった。

以上、protrudinの作用機序を解析し、以下のようなメカニズムで神経突起が形成されることを突き止めた(図3)。

図3



Protrudinによる神経突起形成のメカニズム

ProtrudinはNGFからのシグナルの下流でERKによってリン酸化され、Rab11-GDPと結合する。そして細胞膜成分がリサイクル輸送によって突起形成部位に運ばれ、神経突起の形成が誘導される。

①NGFが細胞表面の受容体に結合する。②そのシグナルに応じてERKが活性化され、protrudinの複数の部位がリン酸化される。③リン酸化されたprotrudinがRab11-GDPと結合する。④それに伴い、突起形成部位への方向限定的な細胞膜成分のリサイクル輸送が促進される。⑤その結果、神経突起形成が誘導される。Protrudinがないと、この方向限定性が失われ、細胞膜全体に小胞輸送が起こる結果、細胞膜は全方向に向けて伸展し、細胞が菲薄化する。

6) Protrudinの神経変性疾患への関与

遺伝性痙性対麻痺は皮質脊髄路の神経変性によって徐々に歩行困難になる疾患であり、細胞膜輸送の異常が関与することが示唆されている。最近、遺伝性痙性対麻痺の患者においてprotrudinの遺伝子変異が報告された。私の結果と併せて考えると、遺伝性痙性対麻痺患者の神経細胞においてprotrudinの機能異常によって細胞膜の輸送に障害が生じることが、この疾患の発症メカニズムであると推定される。

私の発見は、この疾患の病因解明に大きく寄与するだけでなく、protrudinによる神経変性疾患の治療や神経移植への応用の可能性を示すものである。

5 自己評価:

神経突起形成の分子機構として、新たに細胞膜のリサイクリングシステムの関与を見出した。またその鍵となるタンパク質protrudinによる、神経突起形成の詳細な作用機序を明らかにした。更に、神経変性疾患の発症原因との関連性が明らかになった。

期間内に達成できなかったこととして、神経変性疾患への応用を試みるまでに至らなかった。また、研究課題を提案した当初、protrudinとリン脂質との関連を解明することを研究項目のひとつに掲げていたが、期間内に明らかに出来なかった。

6 研究総括の見解:

自ら見いだしたprotrudinの膜輸送分子としての機能を解析し、神経突起形成機構の新しい局面を開いたことは、その結果がScience誌から発信されたことから明らかなように高く評価できる。Protrudinのリン酸化、GDPと結合したRab11との反応、方向限定的な細胞膜成分のリサイクル輸送の促進など独自のProtrudin世界を作り出したことはさきがけ研究の成果として誇るべきものである。この成果を神経変性疾患の理解、治療への応用が次の課題と考える。

7 主な論文等

原著論文

1. Shirane, M., and Nakayama, K.-i.:
Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. **Science**. 314:
818–821, 2006
2. Wang, H. Q., Nakaya, Y., Du, Z., Yamane, T., Shirane, M., Kudo, T., Takeda, M., Takebayashi, K.,
Noda, Y., Nakayama, K. I., Nishimura, M.:
Interaction of presenilins with FKBP38 promotes apoptosis by reducing mitochondrial Bcl-2.
Hum. Mol. Genet. 14: 1889–1902, 2005

他に論文 0 件、総説 3 件(国内 3 件)、口頭発表 6 件(国際 4 件、国内 2 件)

特許出願: 外国 1 件

受賞: 無し

招待講演: 無し