

# 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

白根 道子

## 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膜シャペロン 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。

## 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

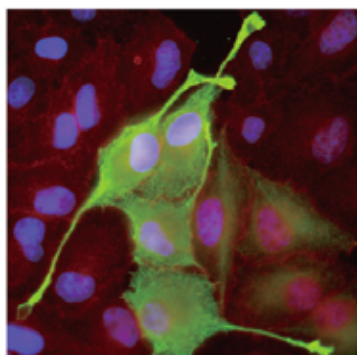
神経突起が形成されるためには、細胞内の膜成分が突起形成部位に限定して供給されなければならない。その突起への膜成分の供給は、細胞膜のリサイクルを介してなされていることが既に知られていた。細胞膜のリサイクルとは、細胞膜の一部が細胞内に取り込まれて(エンドサイトーシス)、リサイクルエンドソームという細胞内小器官にいったん回収され、再び特異的な部位に向けて分泌される(エキソサイトーシス)システムである。私は、このリサイクルシステムを制御することにより神経突起形成を誘導する活性を持つ新規のタンパク質を発見した。

### 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)。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。

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)

### 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。

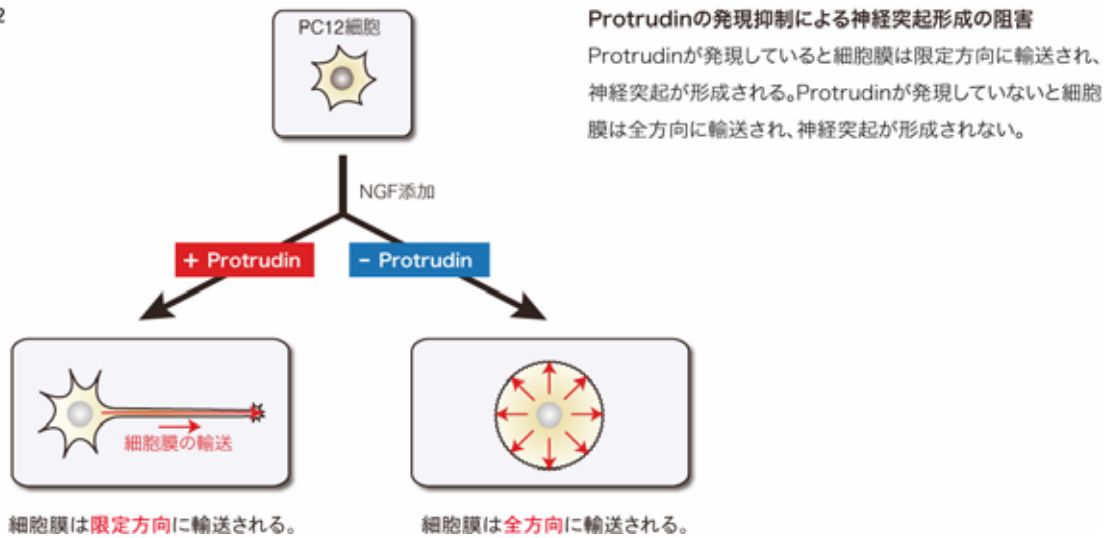
また、マウス脳神経の初代培養細胞において Protrudin の細胞内発現分布を観察すると、細胞周縁の細胞膜や核に近接した中心体近傍、さらに神経突起先端の成長円錐に強い発現が認められた。PC12 細胞は神経成長因子 NGF を添加すると神経突起を形成する。PC12 細胞に NGF を添加すると、初め細胞質全体に分散していた Protrudin は、数時間後にいったん中心体近傍に強く蓄積し、その後突起の伸長と共に突起先端へと移動する、という特徴的な局在変化が観察された。また中心体近傍の Protrudin が集積する部位は、Rab11 が局在するリサイクルエンドソームという細胞内小器官であった。

### 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

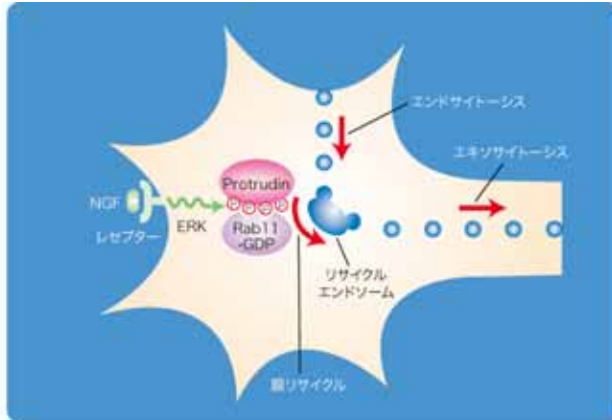


### 5) Protrudin と Rab11 の結合による膜リサイクルの制御

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。

NGF が細胞表面の受容体に結合する。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。リン酸化された Protrudin が Rab11-GDP と結合する。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。その結果、神経突起形成が誘導される。Protrudin がいないと、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。

## 今後の展開

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。この疾患は皮質脊髄路の神経変性で起こることが知られており、膜輸送の異常が関連することが示唆されている。つまり Protrudin の機能異常によって細胞膜の輸送に障害を来すことが遺伝性痙性対麻痺の原因であると考えられた。本研究の成果は、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応用できる可能性を示すものである。

## 研究成果

### (1) 原著論文

1. 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
2. Shirane, M., and Nakayama, K.-i.: Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. Science. 314: 818-821, 2006

### (2) その他の成果

#### 総説等の著作物

1. 白根 道子, 中山 敬一: 膜輸送制御タンパク質 Protrudin による神経突起の形成機構, 実験医学 Current topics: Vol. 25, No. 2, 2007
2. 白根 道子, 中山 敬一: 細胞膜の輸送調節による細胞の形づくり: 神経突起形成のメカニズム, 細胞工学 Hot press: Vol. 26, No. 1, 2007
3. 白根 道子, 中山 敬一: 「HeLa 細胞に神経突起が ???」, 細胞工学 一枚の写真館: Vol. 26, No. 1, 2007

#### 学会発表

1. 白根 道子、中山 敬一  
FYVE ドメインタンパク質 Protrudin と PI(5)P による神経突起形成機構  
第 26 回日本分子生物学会大会 (2003, 神戸)
2. Michiko Shirane and Keiichi Nakayama  
FYVE-domain protein Protrudin induces neurite extension by membrane traffic  
第 27 回日本分子生物学会大会 (2004, 神戸)
3. 白根 道子、中山 敬一  
Protrudin による神経突起伸長は Rab および MAPK によって制御されている  
第 28 回日本分子生物学会大会 (2005, 福岡)
4. Michiko Shirane and Keiichi Nakayama  
Protrudin-Rab11 system regulates directional membrane traffic to induce neurite formation  
1st. International Symposium of Institutes Network (2005, 東京)
5. Michiko Shirane and Keiichi Nakayama  
Protrudin induces neurite extension by regulating post-Golgi membrane traffic  
第 78 回日本生化学会大会 (2005, 神戸)
6. Michiko Shirane and Keiichi Nakayama  
Protrudin interacts with Rab11-GDP and induces neurite formation by directional membrane trafficking  
US-Japan Cooperative Research Workshop on Mouse Models for Cell Cycle and Ubiquitin-mediated Degradation (2006, Frederick, USA)

#### 特許出願

研究期間累積件数: 外国 1 件