

助成番号 25-2-50

神経・精神疾患を惹起する軸索起始部の構造破綻の分子機構解明

大阪大学大学院 連合小児発達学研究所 分子生物遺伝学

吉村 武

1.緒言

神経軸索の根元（軸索起始部）は構造的にも機能的にも高度に特殊化された区画である（図1）。軸索起始部は活動電位発生の場であり情報出力装置である。さらに、軸索起始部は軸索と細胞体／樹状突起の架け橋であり、軸索に必要なものだけを通過させ不要なものを遮断するバリアとしての機能を持つ。軸索起始部の構造は Ankyrin-G や β IV-spectrin などの軸索起始部に特有な膜裏打ち細胞骨格により形成されている¹⁾。Ankyrin-G は軸索起始部の最高位支配者（マスターオーガナイザー）として知られており、Ankyrin-G が失われると、今までに知られている全ての軸索起始部構成分子が軸索起始部に局在出来なくなる²⁾。Ankyrin-G (ANK3) の遺伝子変異は自閉スペクトラム症や知的発達症、てんかんなどを引き起こす³⁾。このように、神経細胞が正常に機能するためには軸索起始部の膜裏打ち細胞骨格が正常に形成されることが必須であり、この構造の破綻は様々な神経・精神疾患を引き起こす。しかしながら、軸索起始部の構造がどのように形成されるのか、その分子メカニズムはほとんど理解されていない。

細胞骨格の制御には多くのリン酸化シグナルが関与していることが知られている。そして、軸索起始部の細胞骨格もリン酸化によって形成が制御される可能性が提唱されている²⁾。申請者は培養神経細胞を用いて網羅的な蛋白質リン酸化解析を行い、Ankyrin-G がリン酸化されていることを見出した（未発表）。故に、本研究の目的は、Ankyrin-G をリン酸化し制御する蛋白質リン酸化酵素を見出し、この酵素によるリン酸化制御が軸索起始部の形成に果たす役割を明らかにすることである。

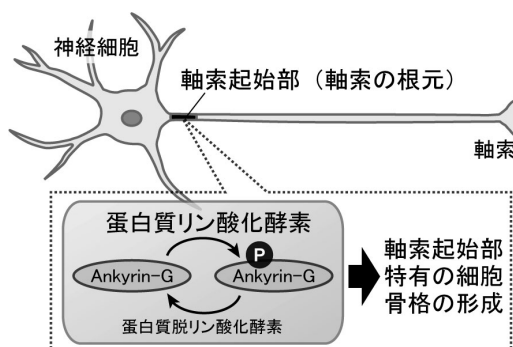


図1：軸索起始部における細胞骨格の形成機構
神経細胞が正しく機能するには軸索起始部の細胞骨格が正常に形成されることが必須であり、この構造の破綻は様々な神経・精神疾患を引き起こす。本研究では Ankyrin-G をリン酸化し制御する蛋白質リン酸化酵素を見出すことで軸索起始部の形成機構の解明を目指した。

2.方法

GST-Ankyrin-G 変異体発現のための COS7 細胞の培養：COS7 細胞を 10%ウシ胎仔血清および

2 mM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific) 入りの DMEM 培地を用いて 60 mm ディッシュに蒔き、5% CO₂ インキュベーターに入れ一定湿度の条件下 37 °C で一晚培養した。GST-Ankyrin-G 各種変異体を発現させるため、プラスミドを Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて COS7 細胞に遺伝子導入を行った。COS7 細胞を 10% ウシ胎仔血清および 2 mM GlutaMAX 入りの DMEM 培地中で 36 時間培養した。

In vitro キナーゼアッセイ: GST-Ankyrin-G 変異体を発現させた COS7 細胞を PBS で洗浄後、溶解バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTA、100 mM NaCl、0.5% NP-40 Substitute、1 mM DTT、2 µg/mL aprotinin、1 µg/mL leupeptin、2 µg/mL antipain、10 µg/mL benzamidin and 0.5 mM PMSF) を加えて細胞を 1.5 ml チューブに回収した。20 分間氷上に置いた後、遠心分離 (20,000 x g, 10 分間、4 °C) を行い、上澄み液を回収した。上澄み液に Glutathione Sepharose 4B ビーズ (GE Healthcare) を加え、4 °C で 2 時間ローテートした。遠心分離 (800 x g、3 分間、4 °C) を行い、上澄み液を捨てた後、溶解バッファーで 2 回洗浄した。沈殿したビーズを反応バッファー (25 mM Tris-HCl pH 7.5、5 mM MgCl₂、1 mM DTT) で 2 回洗浄後、反応バッファーを加えた。ビーズと His6-Cdk5/GST-p35 (Millipore) を加えた反応混合液 {25 mM Tris-HCl pH 7.5、5 mM MgCl₂、1 mM DTT、1 x phosSTOP (Roche)、200 µM ATP ([γ-³²P]ATP を含む)} を震盪しながら 30 °C で 1 時間反応させた。反応後、SDS サンプルバッファーを加えてボイルした。試料を SDS-PAGE で分離後、オートラジオグラフィーを用いて放射能標識されたバンドを検出した。また、銀染色により基質蛋白質を検出した。

培養海馬神経細胞の Cdk5 阻害剤および免疫染色: 胎生 18 日目のラット胎仔脳から初代培養海馬神経細胞を得た⁴⁾。培養 3 日目または 7 日目の培養海馬神経細胞に Cdk 阻害剤 (20 µM Roscovitine, Calbiochem) を加えた後に、5% CO₂ インキュベーターに入れ一定湿度の条件下 37 °C で 4 日間培養した。培養海馬神経細胞を PBS で洗浄後、4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定した。固定した神経細胞を PBS で洗浄後、PBTGS バッファー (0.3% Triton X-100 と 10% goat serum を含む 0.1M リン酸バッファー) に室温で 1 時間浸した。その後、試料に PBTGS バッファーで希釈した 1 次抗体 (抗 Ankyrin-G および MAP2 抗体) を乗せて 4 °C において一晚反応させた。PBS で洗浄後、試料に PBTGS バッファーで希釈した 2 次抗体を乗せて室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、試料を封入した。AxioImager Z1 顕微鏡 (Carl Zeiss) を用いて免疫染色した神経細胞を観察した。

3.結果

蛋白質リン酸化酵素 Cdk5 はショウジョウバエ脳のキノコ体の軸索起始部様区画の形成に重要な役割を果たしている⁵⁾。ゆえに、Cdk5 は軸索基始部構造の形成に関わっていると考えられる。われわれは、Cdk5 が Ankyrin-G をリン酸化するか調べるために、GST-Ankyrin-G 変異体と Cdk5 を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行った (図 2)。Cdk5 により Ankyrin-G は数カ所リン酸化されていた。特に、GST-Ankyrin-G No.3 と No.5 変異体が Cdk5 により強くリン酸化されていた。

Ankyrin-G の No.3 領域は β IV-spectrin との結合領域であるため、Cdk5 による Ankyrin-G のリン酸化が β IV-spectrin との結合に影響を与えると考えられる。Ankyrin-G の No.5 領域の役割は分かっていないが、Cdk5 によりリン酸化されることから未知な制御分子機構が存在する可能性がある。

次に、神経細胞において Cdk5 のキナーゼ活性の抑制が軸索に与える影響を検討した。ラット培養海馬神経細胞において培養 4 日目から軸索起始部は形成され始める⁶⁾。軸索起始部が形成される前の培養 3 日目から 4 日間および形成後の培養 7 日目から 4 日間、ラット培養海馬神経細胞に Cdk 阻害剤を処理した。その後、軸索起始部マーカー (Ankyrin-G) と樹状突起マーカー (MAP2) を用いて免疫染色を行った。Cdk 阻害剤を処理した神経細胞において軸索起始部の細胞骨格の破綻および MAP2 の軸索への流入が観察された。これらの結果より、Cdk5 による Ankyrin-G のリン酸化は軸索起始部構造の形成および維持に必須であると考えられる。

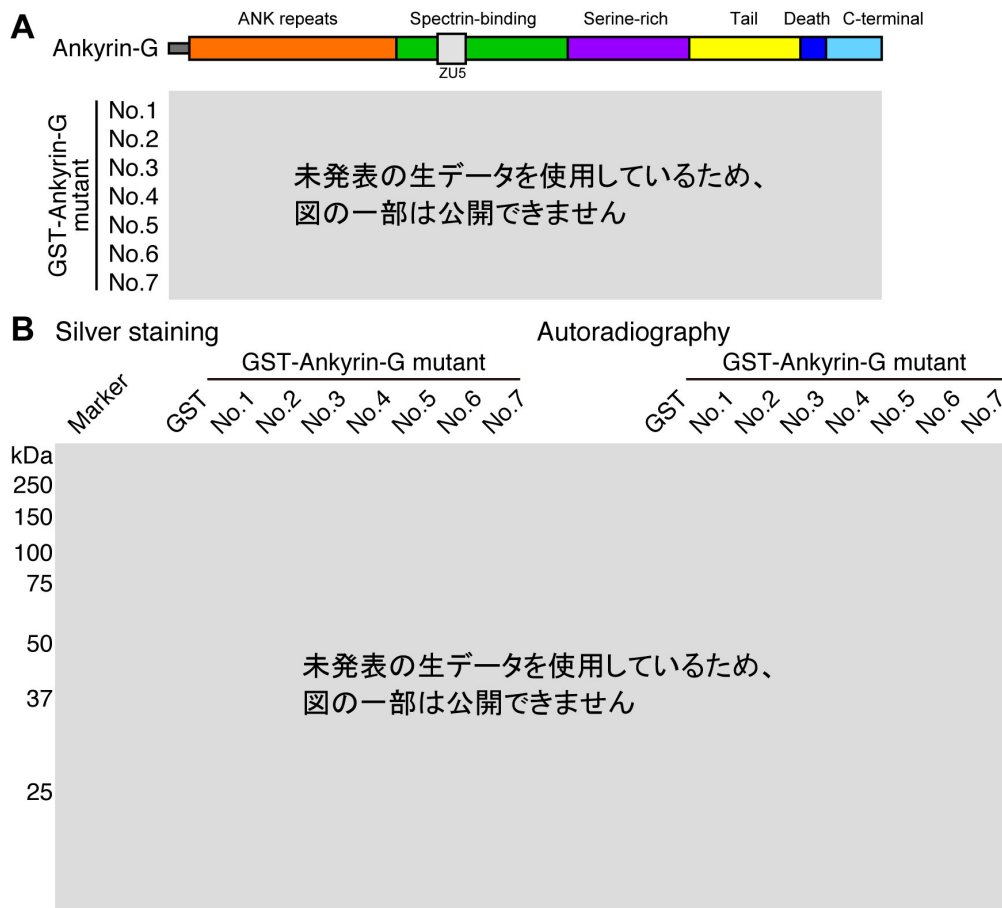


図2 : Cdk5 は Ankyrin-G をリン酸化する
 (A) Ankyrin-G の変異体の模式図。(B) GST-Ankyrin-G 変異体と Cdk5 および RI 標識された ATP を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行った。サンプルを SDS-PAGE で展開後、銀染色を行いタンパク質を検出した (アスタリスク)。オートラジオグラフィーを用いて放射能標識されたバンドを検出した。

4.考察

本研究から Cdk5 が Ankyrin-G をリン酸化することが明らかとなった。特に、Ankyrin-G の No.3 領域は β IV-spectrin と相互作用する領域である⁷⁾。両者は細胞骨格分子であり、軸索起始部に特

有な骨格構造の要である。ゆえに、Cdk5によるAnkyrin-Gのリン酸化による制御が軸索起始部の構造形成に重要な役割を果たすと考えられる。

軸索起始部は軸索に必要な分子のみを通過させ、不必要なものを遮断するバリアとしての機能を持つ。Cdk5のキナーゼ活性を抑制すると、軸索起始部の細胞骨格の破綻およびMAP2の軸索への流入が観察された。これはCdk5がAnkyrin-Gをリン酸化できないために、軸索起始部構造が正しく形成されなかったためと考えられる。Cdk5はAnkyrin-Gのリン酸化を介して、軸索起始部のバリア機能に重要な役割を果たすと考えられる。

5.結語

本研究から、神経細胞においてCdk5がAnkyrin-Gをリン酸化することで軸索起始部に特異的な細胞骨格の形成に重要な働きをすることが示唆された。本研究によるAnkyrin-Gの制御機構の解明は、神経細胞における軸索形成の基盤が分かるだけでなく、自閉スペクトラム症や知的発達症、てんかんなどの神経・精神疾患の病因解明の糸口になると期待されるため、本研究は公益性が高い。

6.文献

- 1) Rasband MN. The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci.*, 2010, 11(8):552-562.
- 2) Yoshimura T, Rasband MN. Axon initial segments: diverse and dynamic neuronal compartments. *Curr Opin Neurobiol.*, 2014, 27:96-102.
- 3) Iqbal Z, Vandeweyer G, van der Voet M, Waryah AM, Zahoor MY, Besseling JA, Roca LT, Vulto-van Silfhout AT, Nijhof B, Kramer JM, Van der Aa N, Ansar M, Peeters H, Helmsmoortel C, Gilissen C, Vissers LE, Veltman JA, de Brouwer AP, Frank Kooy R, Riazuddin S, Schenck A, van Bokhoven H, Rooms L. Homozygous and heterozygous disruptions of ANK3: at the crossroads of neurodevelopmental and psychiatric disorders. *Hum Mol Genet.*, 2013, 22(10):1960-1970.
- 4) Yoshimura T, Stevens SR, Letierrier C, Stankewich MC, Rasband MN. Developmental Changes in Expression of β IV Spectrin Splice Variants at Axon Initial Segments and Nodes of Ranvier. *Front Cell Neurosci.*, 2017, 10:304.
- 5) Trunova S, Baek B, Giniger E. Cdk5 regulates the size of an axon initial segment-like compartment in mushroom body neurons of the *Drosophila* central brain. *J Neurosci.*, 2011, 31(29):10451-10462.
- 6) Galiano MR, Jha S, Ho TS, Zhang C, Ogawa Y, Chang KJ, Stankewich MC, Mohler PJ, Rasband MN. A distal axonal cytoskeleton forms an intra-axonal boundary that controls axon initial segment assembly. *Cell*, 2012, 149(5):1125-1139.
- 7) Yang Y, Ogawa Y, Hedstrom KL, Rasband MN. β IV spectrin is recruited to axon initial segments and nodes of Ranvier by ankyrinG. *J Cell Biol.*, 2007, 176(4):509-519.