

論文の内容の要旨

中枢神経系における Fyn チロシンキナーゼ

標的タンパク質の機能解析

(Functional analysis of substrates for Fyn tyrosine
kinase in the central nervous system)

星名 直祐

Src 型チロシンキナーゼファミリーに属する Fyn チロシンキナーゼは脳神経系に高く発現しており、中枢神経系の発達と機能に重要な役割を果たす。Fyn 欠損マウスは長期増強の減弱、空間記憶の障害、海馬・大脳皮質の形成異常、ミエリン形成不全などの様々な神経系の障害を引き起こす。このような多様な表現型を示すのは、Fyn がシナプス可塑性、オリゴデンドロサイトの分化、軸索ガイダンスなどの様々な細胞内シグナル伝達に関与するためであるが、個々のシグナル伝達経路については未だ明らかになっていない部分が多い。本研究では中枢神経系の細胞における Fyn チロシンキナーゼシグナルを明らかにすることを目的として、リン酸化プロテオーム解析により Fyn 標的タンパク質の探索を行った。そして同定した基質候補分子の中から、オリゴデンドロサイトにおける focal adhesion kinase (FAK)の機能解析と、神経細胞における機能未知の接着分子 Protocadherin17 (PCDH17)の解析を進めた。

1. オリゴデンドロサイトの突起伸長における FAK の機能解析

ミエリンは神経細胞の軸索を取り巻く脂質に富んだ絶縁体構造であり、中枢神経系においてはオリゴデンドロサイトが担っている。Fyn がミエリン形成及びオリゴデンドロサイトの分化に重要であることが明らかとなっているが、オリゴデンドロサイトにおける Fyn の基質分子については十分な知見が得られていない。本研究では、オリゴデンドロサイトの分化誘導が可能な CG4 細胞をモデル系として用い、CG4 細胞における Fyn の基質分子を同定するため、抗リン酸化チロシン抗体を用いたタンパク質精製と質

量分析法による解析を行った。その結果、細胞質型チロシンキナーゼ FAK の同定に成功した。

オリゴデンドロサイトでの FAK の役割は未知のため、CG4 細胞における FAK の機能解析を進めた。CG4 細胞の分化誘導に伴い FAK のチロシンリン酸化が亢進することを確認し、このリン酸化が Fyn 依存的であることを示した (図 1. A)。また、Integrin のリガンドの一つである Laminin 刺激により FAK のチロシンリン酸化が亢進することを見出し、このパスウェイに FAK が関与していることを示した。続いて、FAK のオリゴデンドロサイトの機能を明らかにするために、CG4 細胞において FAK のノックダウンを行い、CG4 細胞の形態と下流のシグナルについて調べた。その結果、FAK ノックダウン CG4 細胞において Laminin 上での突起伸長が有意に抑制されることを見出した (図 1. B)。また、オリゴデンドロサイトの形態制御に重要な Rho ファミリー G タンパク質 Rac1 と Cdc42 の活性が、FAK ノックダウン CG4 細胞で低下した。さらに、FAK ノックダウン CG4 細胞に野生型 FAK を発現させると突起伸長の抑制を回復したが、FAK Y397F 変異体 (不活性型) を発現させても回復しなかった。以上より、オリゴデンドロサイトの突起伸長に Fyn/FAK により動員される Rac1, Cdc42 のシグナル系 (図 1. C) が関与することを提唱した。

続いて、ミエリン形成における Fyn チロシンキナーゼシグナル系の全貌を明らかにする目的で、CG4 細胞におけるチロシンリン酸化タンパク質の網羅的な同定を試みた。CG4 細胞に Src 型キナーゼを活性化させる刺激として過酸化水素・バナジン酸を加え、細胞内のチロシンリン酸化レベルを過剰に亢進させ、この条件下で質量分析法による解析を行う実験系を確立した。その結果、多数のシグナル伝達分子を含む 200 種類近くのタンパク質の同定に成功した。同定したタンパク質の中で、Fyn が主要なチロシンキナーゼであり、既存の Src 型キナーゼの基質分子を数多く同定した。このようなリン酸化プロテオーム解析から、Fyn を介した新たなシグナル伝達機構の発見につながると予想される。

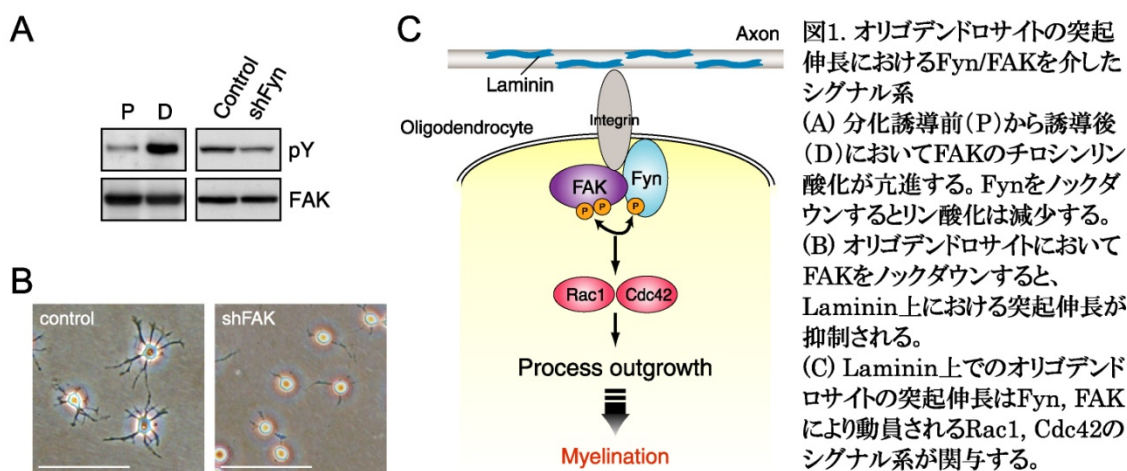


図1. オリゴデンドロサイトの突起伸長におけるFyn/FAKを介したシグナル系 (A) 分化誘導前(P)から誘導後(D)においてFAKのチロシンリン酸化が亢進する。Fynをノックダウンするとリン酸化は減少する。(B) オリゴデンドロサイトにおいてFAKをノックダウンすると、Laminin上における突起伸長が抑制される。(C) Laminin上でのオリゴデンドロサイトの突起伸長はFyn, FAKにより動員されるRac1, Cdc42のシグナル系が関与する。

2. 神経回路形成における PCDH17 の解析

中枢神経系の複雑な神経回路は、多様な神経細胞がシナプスを形成することにより構築される。このような神経ネットワークの構築には神経細胞同士の細胞間相互作用が重要な役割を果たしており、様々なシナプス接着分子が神経細胞の標的認識、シナプス形成の開始、成熟シナプスの安定化さらにシナプス可塑性においてそれぞれ機能していると考えられている。カドヘリンスーパーファミリーも神経細胞間の接着を介したシナプス形成に関与することが示唆されているが、N-Cadherin に代表されるクラシックカドヘリンに比べて、プロトカドヘリンのシナプス形成を介した神経回路網構築機構はほとんど明らかになっていない。そこで、前述のリン酸化プロテオーム解析より Fyn 基質候補分子として同定した $\delta 2$ -プロトカドヘリンファミリーに属する Protocadherin17 (PCDH17)に着目し、中枢神経系の神経回路形成における役割を解析した。

まず、PCDH17 特異的抗体を作製し、詳細な発現プロファイル解析を行った。PCDH17 は脳特異的に発現しており、胎生期から生後一週まで発現量が上昇し、それ以降に減少していくことを見出した。このような発現時期は神経細胞の軸索投射からシナプス形成が起き始める時期に対応しており、この分子がこれらのプロセスに関与している可能性がある。また、この発現変動パターンはクラシックカドヘリンに属する N-Cadherin とは異なるが、PCDH17 と同じ $\delta 2$ -ファミリーに属する PCDH10 とは同様なパターンを示し両者の関連性を示唆した。続いて、PCDH17 の生後 10 日前後の脳内における発現分布を検討したところ、線条体—淡蒼球/黒質経路に沿って強い発現が見られた (図 2. A)。その中でも、線条体では吻側、淡蒼球外節及び内節においては内方、さらに黒質網様部では後方のみで発現を示し、大脳基底核の神経回路内でゾーン特異的な発現パターンを示した。また、同ファミリーの PCDH10 との発現の関連性を検討したところ、線条体、淡蒼球外節/内節、黒質網様部において PCDH17/PCDH10 の両分子の発現が完全に相補的なパターンを示すことが分かった。続いて、PCDH17 の結合様式を検討したところ、PCDH17 はカルシウム依存的にホモフィリック結合をするが (図 2. B)、PCDH10 とはヘテロフィリック結合をしないことを示した。以上のことを踏まえると、PCDH17 と PCDH10 の結合特異性が特定の神経細胞を認識する符号となり、大脳基底核におけるゾーン特異的な投射を担っていると考えられる。

次に、PCDH17 の神経細胞におけるシナプス形成との関わりについて検討した。アデノウイルス発現系を用いて初代培養神経細胞に発現させた PCDH17 は、培養 4 日目の未成熟神経細胞では神経突起の接触部位に集積し、アクチンフィラメントと共局在していた。培養 18 日前後の成熟神経細胞ではアクチンフィラメントと共局在し、さらに、シナプスに局在する N-Cadherin と一部、共局在することを見出した。また、プレシナプスマーカーである Synaptophysin との共染色から、PCDH17 の一部がプレ及びポストシナプスに局在することを見出した。さらに、PSD 画分を生化学的に精製し PCDH17 の存在を検討したところ、PSD に強い濃縮は見られないものの、その存在を確認する

ことができた。従って、PCDH17 はプレ及びポストシナプスに局在するシナプス接着分子であると考えている。続いて、野生型 PCDH17 を神経細胞に過剰発現させると、神経細胞のシナプス部位の形態が異常になるが、細胞質領域欠損型 PCDH17 を発現させるとシナプス部位での異常は見られなかった。以上の結果より、PCDH17 は個々の神経細胞を細胞間相互作用により標的認識していることに加えて、シナプス間における接着を通してシナプス形態を制御し得ることを示した。

シナプス形態の制御には PCDH17 の細胞質領域が必要であることを見出したため、PCDH17 細胞質領域との結合分子を同定してその分子機構を明らかにすることを試みた。その結果、マウス脳を材料とした免疫沈降による精製と質量分析法による解析から、PCDH17 が Rac の下流でアクチン細胞骨格の再編成を行う WAVE 複合体因子 Nap1、CYFIP1/2 及び WAVE1 と結合することを見出した (図 2. C)。これまでに、個々の WAVE 複合体因子 (WAVE1, Nap1 及び Abi-1/2) がシナプス形成の初期過程において、樹状突起スパインの形成を促進することが報告されており、PCDH17 と WAVE 複合体因子の相互作用がシナプス形態を制御し得ると考えている。さらに、PCDH17 の細胞内領域のどの部位で WAVE 複合体構成因子と結合するかを検討したところ、PCDH10 を含む $\delta 2$ -ファミリーに保存されている領域が必須であることが明らかとなった。また、PCDH10 も WAVE 複合体因子と結合することが最近報告されている。以上のことから、 $\delta 2$ -ファミリーの細胞外領域に基づく結合特異性がシナプス結合の特異性を決定し、細胞内領域における結合分子の保存性がシナプス形態制御において同一の分子機構を保障している可能性がある。さらに、PCDH17 は Fyn の基質候補として同定した分子であり、HEK293T 細胞において Fyn によってリン酸化されることを示した。また、神経細胞に過酸化水素・バナジン酸刺激を与えると、内在性の PCDH17 のチロシンリン酸化が亢進することを見出した。そして、PCDH17 のチロシンリン酸化が WAVE 複合体因子との結合を制御することを見出し、チロシンリン酸化を介したダイナミックな制御がシナプス形成において重要な役割を果たすと考えている。

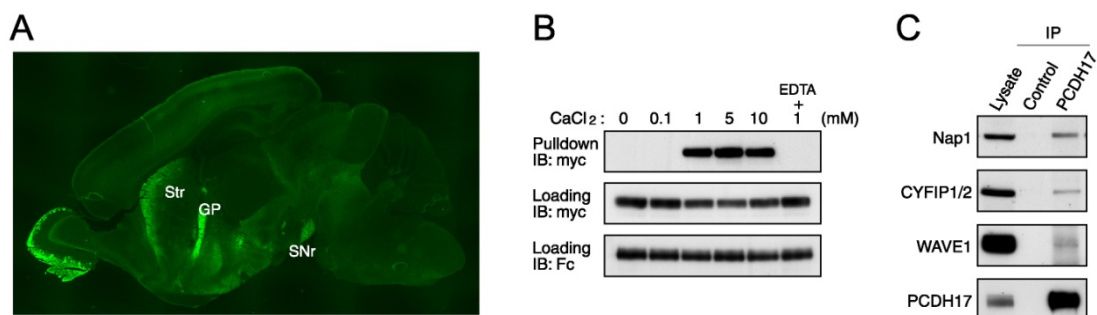


図2. PCDH17の脳内での発現パターンと結合タンパク質
 (A) PCDH17は大脳基底核の神経回路(線条体(Str)、淡蒼球(GP)、黒質網様部(SNr))に発現が高い。
 (B) PCDH17はカルシウム依存的にホモフィリック結合する。
 (C) PCDH17は脳内で、WAVE複合体と結合している。