

とが の てつ や

氏 名	梅 野 哲 哉
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第49号
学位授与の日付	平成17年 3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	Role of Ser50 phosphorylation in SCG10 regulation of microtubule depolymerization (微小管脱重合蛋白質 SCG10 の活性制御におけるセリン 50 のリン酸化の役割)
論文審査委員	主査 教授 阿 部 春 樹 副査 教授 五十嵐 道 弘 副査 教授 木 南 凌

#### 博士論文の要旨

微小管脱重合能を持つ stathmin ファミリーに属する SCG10 は、発生段階の神経細胞に特異的発現がみられ、神経成長円錐に局在する。その N 端は palmitoylation シグナルを持ち、小胞を介した成長円錐への輸送に関わっている。一方、C 端は微小管あるいはチューブリン 2 量体との結合部位である。SCG10 は他の stathmin ファミリーのメンバーと同様に 4 つのセリン残基をもち(S50, S62, S73, S97)、これらは神経細胞内でリン酸化される。これまでの知見では、これらのリン酸化部位はいずれも微小管脱重合能を負に調節していると考えられていたが、明確な証拠は得られていなかった。

A キナーゼ (PKA) は成長円錐に豊富に存在し、その活性は成長円錐の軸索ガイダンスに関わっていると考えられる。そこで申請者は、PKA による SCG10 のリン酸化が微小管脱重合能およびチューブリンとの結合に及ぼす影響について *in vitro* における検討を行なった。

疎水性の高い N 端領域を除いた  $\Delta$ SCG10 [35-179] および、さらにリン酸化を受けるセリン残基をアラニンに置換した変異体(S50A および S97A)について *in vitro* でリン酸化反応を行い、urea-PAGE にてリン酸化を確認したところ、PKA によって S50 および S97 が特異的にリン酸化を受けることが確認された。また S97A, S50A を用いて PKA によるリン酸化を行うことにより、S50 のみのリン酸化体(S50-P)、及び S97 のみのリン酸化体(S97-P)を得ることが出来、それらの易動度は  $\Delta$ SCG10(35-179)のリン酸化体(S50/97-P)とは明確に区別された。

これらを用いて、それぞれの微小管結合能への影響を濁度測定により比較したところ、過去の報告から予想される結果とは異なり、 $\Delta$ SCG10 の非リン酸化体  $\approx$  S50-P > S97-P > S50/S97-P であった。

さらに表面プラズモン共鳴法を用いて、SCG10 と tubulin 2 量体との結合解離曲線を作成し、解離定数を算出した。Stathmin が 1 分子あたり 2 個の tubulin 2 量体を結合するという従来の報告に基づき、測定データを bivalent モデルにフィットさせて解析したところ、結合解離曲線は bivalent モデルに良くフィットした。すなわち SCG10 も tubulin 2 量体と 1 : 2 の割合で結合し、T<sub>2</sub>S コンプレックスを形成するという従来の予想を裏付ける結果となった。また、各種(WT, S50A, S97A)の  $\Delta$ SCG10 が固定されたセンサーチップ上に PKA 反応液を低流速で流し、on-chip でこれらをリン酸化することに成功した。それぞれの  $\Delta$ SCG10 のリン酸化前後における tubulin との結合解離曲線を作成して比較

したところ、非リン酸化の状態ではこれら三者の間に大きな差は見られなかったが、リン酸化を受けた場合は tubulin との結合能が低下し、最大結合量は非リン酸化体  $S50-P \approx S97-P > S50/S97-P$  であった。1 個目の tubulin 2 量体との解離定数を  $K_{D1}$ 、2 個目とのものを  $K_{D2}$  とすると、詳細なパラメータ解析によって、 $S50-P$  は他の 2 つのリン酸化体に比べて  $K_{D1}$  が小さかった。また、 $K_{D2}$  に差は見られないが、結合速度定数  $k_{a2}$  および、解離速度定数  $k_{d2}$  はともに大きいことが明らかとなった。このことは  $S50-P$  が他のリン酸化体に比べ、1 個目の tubulin とはより結合しやすく、2 個目の tubulin との結合はターンオーバーが速いということを示していた。

以上の結果より、SCG10 は PKA により  $S50$ 、 $S97$  二つのセリン残基がリン酸化を受けることにより tubulin との結合が抑制されるが、微小管の脱重合能に関しては  $S97$  のリン酸化の方が  $S50$  に比べて関与している割合が大きいことが結論された。この差異は  $S97$  が tubulin 結合領域に存在するのに対し、 $S50$  が結合調節領域に存在していることが理由として挙げられる。五十嵐と Grenningloh により、SCG10 のリン酸化型でもっとも成長円錐で多いものは  $S50-P$  であることが示唆されており、その意義を明らかにすることは成長円錐の機能を明らかにする上で重要である。今回、 $S50-P$  が  $S97-P$  と異なり、微小管脱重合能を保持することが明らかとなったが、これにより  $S50-P$  は微小管を調節しながら、成長円錐内で別の調節機能を果たす可能性が考えられる。

この研究により、成長円錐内における微小管重合・脱重合が SCG10 により調節され、PKA によるリン酸化はその調節能のみならず、さらに別の機能を調節する可能性が示唆された。近年、成長円錐内における cAMP 濃度が、その挙動に深く関与することが明らかにされており、その一端を SCG10 が担っている可能性が示されたといえる。

## 審査結果の要旨

微小管脱重合蛋白質 stathmin/Op18 ファミリーに属する SCG10 は、神経成長円錐に局在する。他の stathmin ファミリー蛋白質と同様、SCG10 は細胞内でリン酸化される 4 つのセリン(S)残基をもち ( $S50$ , 62, 73, 97)、それらはいずれもリン酸化で微小管調節能を失うとの予想はあったが、明確な証拠は得られていなかった。申請者は特定のセリン残基に対するリン酸化体を得ることに成功し、微小管重合・脱重合の測定、および表面プラズモン共鳴法を用いた tubulin 結合のキネティクス測定を行った。その結果、成長円錐機能に深く関係する cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) によって  $S50$  と  $S97$  がリン酸化されて tubulin との結合が抑制されるが、微小管の脱重合能は  $S97$  のリン酸化でのみ低下すること、 $S50$  リン酸化との違いは tubulin 結合・解離の速度の差によることが明らかとなった。

本研究は、成長円錐内の微小管重合・脱重合が SCG10 により調節され、PKA によるリン酸化は微小管調節能に加え、さらに別の機能を調節する可能性を示したもので、神経軸索の形成・再生を考える上で、重要な生化学的原理を明らかにしたものと考えられる。この点に学位論文としての価値を認める。