

SAD キナーゼによる Slingshot 1 フォスファターゼを介した 神経細胞極性化の分子機構

犬束 歩・岸 将史

新潟大学大学院医歯学総合研究科・分子ニューロイメージング研究室

SAD Kinases Regulate Neuronal Polarization Through Slingshot1 Protein Phosphatase

Ayumu INUTSUKA and Masashi KISHI

*Laboratory of Molecular Neuroimaging, Graduate School of Medical
and Dental Sciences, Niigata University*

要 旨

神経細胞の極性化，すなわち軸索突起と樹状突起の選別，に関わるシグナル分子は近年になって複数報告されてきましたが，その *in vivo* での必要性が遺伝学的に証明されたものは多くありません。我々は神経系に特異的に発現するセリンスレオニン蛋白キナーゼ SAD キナーゼの遺伝子欠損マウス作製とその解析を世界に先駆けて行い，SAD キナーゼが神経細胞極性化に必要な分子であることを明らかにしました。更に，その作用機構を解析するため，SAD キナーゼの直接的なターゲットとなりうるペプチド配列を有する分子を検索し，それらの中でアクチン繊維の制御因子である Slingshot 1 フォスファターゼが *in vitro* で SAD キナーゼの極めて良い基質となることを明らかにしました。この結果は，SAD キナーゼが少なくとも部分的には Slingshot 1 の下流に位置する Cofilin によるアクチン繊維の制御を通じて神経細胞極性化を引き起こしているという可能性を示唆しています。

神経細胞の極性化とは

成熟した神経細胞が有する神経突起のうち，樹状突起は神経電気シグナルを受容し細胞体にまで

伝える役割を，逆に，軸索突起はその電気シグナルを細胞体から遠く離れた標的にまで伝播する役割を，それぞれ担っています。発生過程の若い神経細胞は，未分化かつほぼ均質な神経突起を複数

Reprint requests to: Masashi KISHI
Laboratory of Molecular Neuroimaging
Graduate School of Medical and Dental Sciences
Niigata University
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科・分子ニューロイ
メージング研究室 岸 将史



図1 神経細胞の極性化

発生中の神経細胞の多くはほぼ均質な短い神経突起を伸展させた後、1つだけを長い軸索突起に、他を短い樹状突起に分化させます。

伸展させた後、その中から一つだけを長い軸索突起として、また、残りを短い樹状突起として分化させますが、この神経突起の分化に伴う非対称性の形成を、神経細胞の極性化と呼びます。従って、この極性化の過程は、幼若な神経細胞が神経回路網の一単位としての機能性を獲得していく上で、特に重要な分化ステップの一つであると考えられます¹⁾ (図1)。

国内外の研究動向

米国の Banker 博士らは 1980 年代後半よりこの軸索突起・樹状突起の形成に伴う神経細胞の極性化に注目し、一連の培養下での細胞生物学的な解析を元に、その確立にはアクチン繊維や微小管といった細胞骨格の制御が最も重要な役割を果たしているという解析結果を報告して来ました²⁾。彼らは幼若な海馬神経細胞を単離し経時的に観察する培養システムを利用することで、アクチン繊維の脱重合を促す薬剤であるアクチノマイシン D を局所的に与えられた神経突起が極めて高い確率で軸索突起に分化すること³⁾、また、その選ばれた突起においては微小管の方向性が一定方向に定まっており、樹状突起におけるランダムに近い方向性を持った微小管とは対照的であるということ⁴⁾を示しました。これらの結果から、アクチン繊維の安定性が何らかの要因で低下した神経突起が軸

索突起として選ばれ、更に微小管の伸展が非対称に促されることで、両突起の運命が決定され極性が確立するというモデルが考えられます。2000 年代に入って、どういった分子が軸索突起の選択に関わっているのかという分子的な解析が進められるようになり、微小管の重合に関わる CRMP2⁵⁾ や DOCK7⁶⁾、また、一般的な細胞極性の確立に関わる GSK3beta⁷⁾ や Par3/Par6⁸⁾ などのシグナル分子が、伸長中の軸索突起と樹状突起との間で不均等に分布しているという報告がなされ、その中のいくつかについては、神経細胞に過剰発現させると複数の軸索突起を形成するようになるという軸索突起の決定因子である可能性を強く示唆する結果が得られております。これらは神経初代培養の系における RNAi を用いた機能障害実験によってもその重要性が間違いなく詳細に示されておりますが、実際に *in vivo* の神経組織内でその必要性が示されているものは少なく⁹⁾、また、ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析では、その重要性に否定的な結果が得られている例も存在し¹⁰⁾、どのシグナルパスウェイが普遍的に重要であるのかという問題点は未だ解決されていません。

SAD キナーゼは神経細胞極性の確立に必須である

我々は、これらの研究とは全く独立に、哺乳類のシナプス形成機構を解析する目的で、線虫に於いてシナプス形成異常を呈する一変異体の責任遺伝子 SAD キナーゼについて、そのマウスホモログの同定と遺伝子破壊を行いました¹¹⁾。哺乳類ゲノム中には二つの相同遺伝子が存在したもので (SAD-A, SAD-B)、両遺伝子について遺伝子欠損マウスを作製、ダブルノックアウトマウスを解析した結果、SAD キナーゼを完全に欠損したマウスは出生後早い段階で死に至り、その神経組織を解剖学的に解析した結果、神経細胞の高度な形態異常、特に軸索突起の形成不全が観察されました。その細胞生物学的機序を明らかにするため低密度神経初代培養を行い解析した結果、SAD キナーゼダブルノックアウトマウス由来の海馬神経細

胞はどれも同程度の長さの神経突起を有し、両突起分子マーカーの分布パターンも含めて、軸索突起と樹状突起とを区別することができていない、ということが判明致しました。また、分子レベルでは、SAD キナーゼを欠損した神経細胞に於いて微小管結合蛋白 tau のリン酸化が減少しているということが見出され、SAD キナーゼが微小管のダイナミクスを制御することによって神経細胞の極性を司っているという可能性が示唆されました。但し、SAD キナーゼ欠損マウスが神経系の異常を伴う出生後致死となるのに対し、tau 遺伝子破壊マウスの異常は極めて軽度でありますので¹²⁾、他にも SAD キナーゼの下流に位置する分子の存在が予想されます。SAD キナーゼの作用機構については、これまでに、その上流に LKB-1 という蛋白キナーゼが位置し SAD キナーゼを活性化することで突起の伸展を調節し軸索突起の運命を決定しているということ¹³⁾ が示されていますが、逆に神経細胞極性化に直接関わると考えられるような SAD キナーゼの基質分子は未だ報告されていません。

SAD キナーゼ-Slingshot 1 経路

我々は、SAD キナーゼが細胞周期の制御に関わる分子のいくつかを *in vitro* でリン酸化するという報告¹⁴⁾ に着目し、それらのリン酸化部位に共通なアミノ酸配列を特定、更にそれを用いたホモロジーサーチを利用することによって、SAD キナーゼの基質分子としてアクチン繊維の結合因子である Slingshot 1 を同定しました。Slingshot は元々 *Drosophila* を用いた遺伝子スクリーニングによって同定された蛋白脱リン酸化酵素（ホスファターゼ）であり、活性化されると actin-severing 因子であるコフィリン（cofilin）を脱リン酸化することによって活性化し、最終的にアクチン繊維の脱重合を引き起こします¹⁵⁾。また、Slingshot は神経線維の伸展調節にも中心的な役割を果たしている分子です¹⁶⁾。Slingshot 1 の SAD キナーゼによるリン酸化部位は、その脱リン酸化活性の調節に最も重要な部位であり、実際に

それを含むペプチドおよび GST 融合蛋白を合成し、大腸菌より精製した SAD キナーゼと反応させたところ、極めて強いリン酸化を受けることが明らかとなりました。現在、このリン酸化反応が実際に *in vivo* で起きているものであるのかどうかを調べるために、抗リン酸化部位抗体の作製や、SAD キナーゼ欠損マウスにおけるそのリン酸化エピトープ減少の有無を解析しており、将来的には Slingshot 1 欠損マウスとの掛け合せによって *in vivo* での機能的共役の有無を確かめて行く予定であります。

ま と め

SAD キナーゼは *C. elegans* や *Drosophila* 卵細胞極性の制御因子である PAR1 キナーゼと高い相同性を有し¹⁷⁾、神経細胞極性化のメカニズムを考える上で極めて興味深いことです。また、PAR1 キナーゼは一次構造上 Microtubule-Affinity Regulating Kinases (MARKs) という微小管の制御因子と orthologous であり¹⁸⁾、SAD キナーゼが微小管結合蛋白の一つである tau のリン酸化に関与するということはある程度予想された通りの結果でありました。但し、神経細胞極性化という細胞形態変化が微小管の制御だけによって説明されるとは考えにくく、今回見いだされた Slingshot 1 の活性調節によるアクチン繊維の動態制御という新たな役割が、極性の確立に重要な役割を果たしているものと考えられます。

謝 辞

これらの結果は、五十嵐道弘教授（新潟大学医学部第二生化学講座）、横山峯介教授（新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野）、崎村健司教授（新潟大学脳研究所細胞神経生物学講座）、Joshua Sanes 教授（Harvard 大学）、Cori Bargmann 教授（Rockefeller 大学）らとの共同研究の成果であります。新潟大学テニユアトラック委員会の先生方にはその御支援に対し深く感謝致します。

参考文献

- 1) Doe CQ and Kaibuchi K: Neuronal polarity in 2010: A special issue. *Dev Neurobiol.* 2010 Dec 29.
 - 2) Craig AM and Banker G: Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci.* 17: 267 - 310, 1994.
 - 3) Dotti CG and Banker GA: Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature.* Nov 19 - 25; 330: 254 - 256, 1987.
 - 4) Baas PW, Deitch JS, Black MM and Banker GA: Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov; 85: 8335 - 8339, 1988.
 - 5) Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Mé nager C, Kawano Y, Matsuo N, Nishimura T, Amano M and Kaibuchi K: CRMP - 2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci.* Aug; 4: 781 - 782, 2001.
 - 6) Watabe - Uchida M, John KA, Janas JA, Newey SE and Van Aelst L: The Rac activator DOCK7 regulates neuronal polarity through local phosphorylation of stathmin/Op18. *Neuron.* Sep 21; 51: 727 - 739, 2006.
 - 7) Yoshimura T, Kawano Y, Arimura N, Kawabata S, Kikuchi A and Kaibuchi K: GSK - 3 β regulates phosphorylation of CRMP - 2 and neuronal polarity. *Cell.* Jan 14; 120: 137 - 149, 2005.
 - 8) Shi SH, Jan LY and Jan YN: Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3 - kinase activity. *Cell.* Jan 10; 112: 63 - 75, 2003.
 - 9) Wildonger J, Jan LY and Jan YN: The Tsc1 - Tsc2 complex influences neuronal polarity by modulating TORC1 activity and SAD levels. *Genes Dev.* Sep 15; 22: 2447 - 2453, 2008.
 - 10) Rolls MM and Doe CQ: Baz, Par - 6 and aPKC are not required for axon or dendrite specification in *Drosophila*. *Nat Neurosci.* Dec; 7: 1293 - 1295, 2004.
 - 11) Kishi M, Pan YA, Crump JG and Sanes JR: Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization. *Science.* Feb 11; 307: 929 - 932, 2005.
 - 12) Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato - Yoshitake R, Takei Y, Noda T and Hirokawa N: Altered microtubule organization in small - calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature.* Jun 9; 369: 488 - 491, 1994.
 - 13) Barnes AP, Lilley BN, Pan YA, Plummer LJ, Powell AW, Raines AN, Sanes JR and Polleux F: LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. *Cell.* May 4; 129: 549 - 563, 2007.
 - 14) Lu R, Niida H and Nakanishi M: Human SAD1 kinase is involved in UV - induced DNA damage checkpoint function. *J Biol Chem.* Jul 23; 279: 31164 - 31170, 2004.
 - 15) Niwa R, Nagata - Ohashi K, Takeichi M, Mizuno K and Uemura T: Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell.* Jan 25; 108: 233 - 246, 2002.
 - 16) Endo M, Ohashi K, Sasaki Y, Goshima Y, Niwa R, Uemura T and Mizuno K: Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *J Neurosci.* Apr 1; 23: 2527 - 2537, 2003.
 - 17) Crump JG, Zhen M, Jin Y and Bargmann CI: The SAD - 1 kinase regulates presynaptic vesicle clustering and axon termination. *Neuron.* Jan; 29: 115 - 129, 2001.
 - 18) Drewes G, Ebneith A, Preuss U, Mandelkow EM and Mandelkow E: MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule - associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell.* Apr 18; 89: 297 - 308, 1997.
-