

主論文の要旨

## **ERK2-Mediated Phosphorylation of Par3 Regulates Neuronal Polarization**

〔 ERK2 による Par3 のリン酸化は神経細胞の極性形成を制御する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻  
神経科学講座 神経情報薬理学分野

(指導：貝淵 弘三 教授)

船橋 靖広

## 【緒言】

神経細胞は脳内において複雑なネットワークを形成する。その基本機能は信号を受け取り統合して他の細胞に伝えることである。そのため、神経細胞は分化の過程で一本の軸索と複数の樹状突起を形成し、樹状突起から信号を入力して軸索から信号を出力するという極性を獲得する。軸索も樹状突起も分化の過程で共通の未成熟な神経突起から形成されることが知られているが、どのような分子機構によって未成熟な神経突起が軸索あるいは樹状突起へと運命決定されるのかは長らく不明であった。Partition-defective 3 (Par3) は Par6 及び atypical PKC (aPKC) と複合体を形成し、神経細胞を含む様々な細胞種において細胞極性形成に重要であると考えられている。以前、我々の研究室では、Par3 がキネシンモータータンパク質である Kinesin-2 (KIF3A) と直接結合すること、Par3 が KIF3A によって将来軸索となる未成熟な神経突起の先端に輸送されることで、神経細胞の軸索形成を促し、極性を制御することを明らかにした。また Phosphoinositide 3 (PI3)-キナーゼの下流で、Par3/Par6/aPKC 複合体と低分子量 G タンパク質 Cdc42 が Rac1 のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である Tiam1/2 を介して Rac1 を活性化し軸索形成を誘導することを発見した。しかしながら、Par3 と KIF3A の結合を制御する分子機構は未だ明らかになっていない。

最近、我々の研究室では Par3 のさらなる機能を調べるため、Par3 をリガンドとしたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行い結合タンパク質の探索を行った。質量分析装置 (LC/MS/MS) による解析の結果、Par3 の新規結合タンパク質の候補として Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) を同定した。ERK2 は Mitogen-activated protein (MAP) キナーゼファミリーの一つで、神経栄養因子などの刺激に応答して活性化し、神経細胞の軸索形成に寄与することが報告されているが、ERK2 と Par3 の相互作用関係については不明である。そこで私は、神経細胞が軸索を形成し極性を獲得する過程における ERK2 と Par3 の関係に着目し研究を行った。

## 【方法及び結果】

はじめに、Par3 と ERK2 が生体内で相互作用するかどうかを検討した。脳可溶化物を用いた免疫沈降実験を行ったところ、内在性の Par3 と ERK2 が共沈降した。また Par3 と ERK2 は培養海馬神経細胞の細胞体および軸索において部分的に共局在した。さらに in vitro の結合実験により、Par3 の C 末領域と ERK2 が直接結合した。これらの結果から、ERK2 は神経細胞内で Par3 の C 末領域と相互作用することが示唆された。

次に、ERK2 が Par3 をリン酸化するかどうかを検討した。大腸菌から精製したリコンビナント Par3 と ERK2 を ATP の存在下で反応させたところ、ERK2 は Par3 の C 末領域をリン酸化した。ERK2 による Par3 のリン酸化部位の同定を行うために、Par3 の C 末領域内のセリンとスレオニンをアラニン置換した変異体を作成し、ERK2 と反応させた。1116 番目のセリンをアラニン置換した変異体でリン酸化レベ

ルが顕著に減少したことから、ERK2 による Par3 の主要なリン酸化部位は 1116 番目のセリンであることが示された。

生体内で ERK2 が Par3 の 1116 番目のセリンをリン酸化するかどうかを検討するために、リン酸化部位特異的抗体の作成を行い、培養海馬神経細胞を用いて Par3 のリン酸化状態をウェスタンブロット法によりモニターした。培養海馬神経細胞をタンパク質の脱リン酸化酵素であるオカダ酸あるいは神経栄養因子の 1 つである Neurotrophin-3 (NT-3) で処置したところ、ERK2 のリン酸化および、Par3 のリン酸化が上昇した。これらのリン酸化は MAP キナーゼ/ERK 経路の阻害剤である U0126 で抑制された。また、リン酸化された Par3 の細胞内局在を調べるために、リン酸化部位特異的抗体を用い培養海馬神経細胞の免疫染色を行ったところ、リン酸化された Par3 は軸索の遠位部に豊富に存在した。これらの結果から、Par3 は軸索の遠位部で神経栄養因子の下流で ERK2 によりリン酸化されることが示された。

以前、我々の研究室では、1116 番目のセリンを含む Par3 の C 末領域が KIF3A の C 末領域と直接結合することを報告した。そこで ERK2 による Par3 の 1116 番目のセリンのリン酸化が、Par3 と KIF3A との結合に影響するかどうかを検討した。ERK2 により Par3 をリン酸化させた後に、Par3 と KIF3A との結合実験を行ったところ、ERK2 が Par3 をリン酸化することで Par3 と KIF3A の結合が減弱した。一方、このリン酸化は Par6 および aPKC との結合には影響を及ぼさなかった。また、Par3 の 1116 番目のセリンをアスパラギン酸に置換したリン酸化ミミック変異体も同様に、KIF3A との結合が減弱した。これらの結果から、ERK2 による Par3 のリン酸化は Par 複合体形成には影響を及ぼさず、Par3 と KIF3A との結合を抑制することが示された。

さらに、ERK2 による Par3 のリン酸化が Par3 の軸索輸送に影響を及ぼすかどうかを、FRAP 法（光褪色後蛍光回復法）により検討した。緑色蛍光タンパク質（GFP）融合 Par3 の野生型あるいはリン酸化ミミック変異体を培養海馬神経細胞に発現させ、神経細胞の軸索遠位部にレーザーを集光し褪色させた後、その部分の蛍光の回復を観察した。野生型 Par3 と比較してリン酸化ミミック変異体では蛍光の回復が遅延した。この結果から、リン酸化ミミック変異体は KIF3A と結合出来ないことで、軸索遠位部への輸送が障害されることが示唆された。

最後に、ERK2 による Par3 のリン酸化が、培養海馬神経細胞および発生期の大脳皮質の神経細胞の極性形成に与える影響を検討した。Par3 を発現抑制した細胞で神経細胞の軸索形成が阻害された。Par3 の発現抑制の効果は Par3 の野生型を発現させることで回復するのに対して、KIF3A が結合できないリン酸化ミミック変異体を発現させても回復できなかった。これらの結果から、ERK2 による Par3 のリン酸化は培養神経細胞のみならず生体内での神経細胞の極性形成にも重要であることが明らかになった。

### 【結語】

神経細胞においてキネシンモータータンパク質による Par3 などの積み荷タンパク質の輸送は神経細胞の極性形成に重要である。積み荷タンパク質は細胞体でキネシンに荷積みされ (loading)、最終目的地である神経突起の先端 (成長円錐) でキネシンモーターから荷下ろし (unloading) される必要があると考えられているが、そのメカニズムは不明な点が多い。本研究は、ERK2 による Par3 のリン酸化が、Par3 とキネシンモータータンパク質である KIF3A との結合を抑制することを明らかにし、Par3 の軸索輸送及び、神経細胞の極性形成を制御するという重要な知見を提供した (図 1 に ERK2 による Par3 の軸索輸送制御のモデル図を示す)。多くの神経変性疾患で軸索輸送の異常が報告されていることから、これらの研究成果は、生物学上重要であるだけでなく神経変性疾患・精神疾患の病態解明に貢献するとともに創薬のターゲットになりうることを期待される。