

日本神経化学会奨励賞受賞者研究紹介

リン酸化プロテオミクスによる神経軸索成長のメカニズム解明

岡田 正康^{*1,*2}^{*1} 新潟大学医歯学総合病院脳神経外科^{*2} 新潟大学脳研究所脳神経外科学分野

はじめに

“成体の神経回路は固定され、不変である”とする、いわゆる“カハール・ドグマ”^{1,2)}が知られている。しかし近年の発達神経科学・神経化学の進歩は、哺乳類の成体脳におけるニューロン新生を明らかにし^{1,3)}、現在損傷を受けた中枢神経を回復させるべく様々な研究が進行している。こうした中枢神経再生への試みにおいて、神経軸索先端における成長円錐の軸索成長やシナプス形成に対する機能は、重要な鍵を担っていると考えられる。

成長円錐は、スペインの神経解剖学者 Santiago Ramón y Cajal が1890年に鶏胚の脊髄で見出し⁴⁾、その後、成長期の神経細胞の神経突起先端に存在する運動性に富んだ構造体であることが明らかとなった。Ramón y Cajalはこの成長円錐が何らかの物質に反応して遊走し、軸索が成長するのではないかと考えた⁵⁾。その後、このアイデアのもとに軸索ガイダンス分子が発見されてきた。一方、成長円錐の内部の分子メカニズムについては、Karl H. Pfenninger らが1983年にCell誌に*in vivo*のラット脳組織から成長円錐画分 (Growth cone particle) の単離を報告したこと⁶⁾で、生化学的な解析が進むこととなった。2009年には五十嵐道弘らが、ラットの新生仔脳の*in vivo*組織から成長円錐画分と成長円錐膜画分をプロテオミクス解析し、成長円錐の分子基盤となる分子マーカーとして neuronal growth-associated proteins (nGAPs) を報告した⁷⁾。こうして成長円錐の内部に存在する分子について生化学的な解析を行う土壌が形成された。

本稿では、発生段階のラットの成長円錐膜画分のリン酸化タンパク質を網羅的解析し、明らかにした神経成長や再生に関連する分子について齧歯類から霊長類に至る解析に進化させた方法論を紹介する。

1. リン酸化タンパク質の検出

タンパク質のリン酸化は細胞内シグナル伝達経路の一要素であり、生体のエネルギー通貨ATPからリン酸基がタンパク質に供与され、プロテインキナーゼやホスファターゼによって迅速に制御される生命共通の翻訳後修飾の一つである。ノーベル化学賞を受賞された田中耕一博士が開発に成功した、プロテオミクスに応用可能な質量分析装置によって網羅的なリン酸化タンパク質の解析はその後、大きく進歩した。

質量分析装置によってイオン化されたリン酸化ペプチドは、リン酸基を1つ含むペプチドが、リン酸基を含まないペプチドと比較して80 Da分増加することを指標として検出できる。我々は、生後1日目のラットの前脳から前出のPfenningerらの方法で得た成長円錐画分から成長円錐膜を単離し、リン酸化ペプチドを濃縮した上で液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析計を連結した装置 (Liquid chromatography-Mass spectrometry (LC-MS/MS)) で解析した。詳細は、参考文献を参照頂きたい^{8,9)}。1% FDR (False Discovery Rate) の感度で4,596種類のリン酸化ペプチド (タンパク質の種類では1,223種類) を検出した。このうち同定されたペプチド数でタンパク質の存在量を推定できる

スペクトルアカウン法によって、“量的に重要なものから研究を進める”というアプローチ⁴⁾で研究を進めた。その結果、GAP-43 (growth associated protein-43 kDa) という脊椎動物の神経特異タンパク質が、1位の頻度(セリン(S)96)と9位の頻度(トレオニン(T)172)で検出され、さらに低頻度ながらGAP-43の142番目のセリン(S142)も検出された⁸⁾。

2. GAP-43 について

GAP-43はNeuromodulin、F1、B-50、pp46などの別名称でも発見され、後に同一分子として名称が統一されたタンパク質である。このタンパク質は、ウサギの末梢神経(舌下神経)の圧縮後の再生神経において軸索内輸送量が増加し¹⁰⁾、また長期記憶増強(LTP)では、リン酸化タンパク質として増加することが当初報告された¹¹⁾。成長円錐の主要な分子としても認識されている¹²⁾。GAP-43分子は、N末端側の10残基内に細胞膜との結合領域(パルミチン酸結合部位)を持ち、さらにIQモチーフと呼ばれるカルモジュリン(CaM)結合のコンセンサス配列[(I/L/V)QXXXRXXXX(R/K)]が確立された最初の分子である。細胞内のCa²⁺濃度が上昇するとPKC(protein kinase C)がそのS41をリン酸化することでCaM結合は阻害される^{12, 13)}。このIQモチーフは、結晶構造解析で両親媒性の α -helix構造と解かれている¹⁴⁻¹⁶⁾が、それ以降の長いC末側は、特定の2次構造を持たない天然変性領域ではないかと考えられる¹⁷⁾。我々が成長円錐膜画分から同定したGAP-43 S96/T172のリン酸化については、PKC以外のキナーゼによってリン酸化される可能性があるGAP-43のリン酸化部位として、JNK発見¹⁸⁾前の1992年に報告されていた¹⁹⁾。一方GAP-43 S142のリン酸化も生後3週のマウス脳から検出されていた²⁰⁾。しかしこれらは、リン酸化特異抗体を作成するなどしての検証はなされてこなかったリン酸化部位で、神経成長との関連性も明確には解析されていない、「忘れ去られたリン酸化部位」であった。

3. JNK1 によって制御される GAP-43 のリン酸化

ラットの成長期脳の成長円錐膜画分から検出したGAP-43 S96/S142/T172のアミノ酸配列は、いずれもリン酸化部位であるセリンやトレオニン残基の次にプロリンが来るプロリン指向性をもつ、いわゆるProline-directed phosphorylation siteである。ラットの成長期脳の成長円錐膜画分に存在するリン酸化タンパク質は、セリンやトレオニン残基のリン酸化部位は60%以上がプロリン指向性もち、バイオインフォマティクス解析によってその大部分が、Mitogen activated protein kinase (MAPK)によってリン酸化されることが明らかとなった。脊椎動物ではこれらのMAPKの高頻度部位は、無脊椎動物に比べて保存の度合いが高く、線虫・ショウジョウバエとはリン酸化の重要部位が異なっていて、これら無脊椎のモデル動物の解析のみでは、ヒトを含む哺乳動物の神経成長・軸索再生の分子機構を明らかにしえないことが分かっている²¹⁾。

我々は、GAP-43 S96/S142/T172のそれぞれのリン酸化検出抗体(pS96 Ab/pS142 Ab/pT172 Ab)を作製し、これらの制御キナーゼについて生化学的に検証してERK(Extracellular Signal-regulated Kinase)、JNK(c-Jun N-terminal kinase)、p38と3種類あるMAPKファミリーの中からJNK1と同定した^{8, 22, 23)}(図1)。JNKはアポトーシスを招くシグナルと考えられてきたが、Tedeschi & Bradkeの総説は、線虫から哺乳類まで共通の軸索再生因子として働くJNKシグナルは、非細胞死の機能として軸索成長や再生に働くキナーゼであり、MAP1B(microtubule-associated protein 1B)やSCG10(superior cervical ganglion 10)などが基質として解説されており²⁴⁾、GAP-43 S96/S142/T172もここに加わ

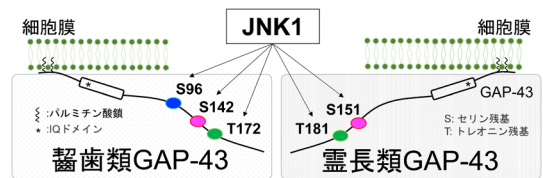


図1 JNK1 に制御される GAP-43 のリン酸化

るものとする。一方で、JNK の作用で軸索変性や神経細胞の損傷後アポトーシスも知られており²⁴⁾、この「両刃の剣」を調節する機構が注目される。

4. 齧歯類以外の GAP-43 のリン酸化

ヒト神経疾患への応用が目標であり、哺乳類タンパク質のホモロジー（相同性）検索を行ったところ、図2のような結果となった。齧歯類の成長

	S96	
	▼	
ホモサピエンス	89 EAAPATGSKPDEPGKAGETPSEEK	113
カニクイザル	89 EAAPATGSKPDEPGKAGETPSEEK	113
コモンマーモセット	89 EAAPATGTKPDETKAGETPSEEK	113
フェレット	90 DAIPASGPKPEESGKAGETPSEEK	114
ラット	90 DAAPATSPKAEEPSKAGDAPSEEK	114
マウス	90 DAAPATSPKAEEPSKAGDAPSEEK	114
	*	
	S142 (#151)	
	▼	
ホモサピエンス	146 ASTDNSPSSKAEDAPA	161
カニクイザル	146 ASTDNSPSSKAEDAPA	161
コモンマーモセット	146 ASTDNSPSSKAEDAPA	161
フェレット	149 ASTDNSPSSKAEDAPA	164
ラット	137 ATTDNSPSSKAEDGPA	152
マウス	137 ATTDNSPSSKAEDGPA	152
	*	
	T172 (#181)	
	▼	
ホモサピエンス	172 AAVT-AAAATTPAAEDAA	188
カニクイザル	172 AAVT-AAAATTPAAEDAA	188
コモンマーモセット	172 AAVT-AAAATTPAAEDAA	188
フェレット	175 AAVTAAAAATTPAAEDAA	192
ラット	163 AAVT-DAATTPAAEDAA	179
マウス	163 AAVT-DAATTPAAEDAA	179
	*	

図2 哺乳類における GAP-43 ホモロジー解析

* リン酸化修飾されるアミノ酸残基を指す。♯ 霊長類の S151 は齧歯類の S142 に一致し、# 霊長類の T181 は齧歯類の T172 に一致する

円錐で最も多く検出された GAP-43 S96 の前後を含めたアミノ酸配列は、哺乳類では齧歯類のみに存在し、GAP-43 T172（霊長類では T181）や S142（霊長類では S151）の前後を含めたアミノ酸配列は、哺乳類に広く保存されていた。我々は、GAP-43 のリン酸化について別組織や他の動物種を検討する際に、リン酸化プロテオミクスで確証を得てから実験を進める戦略をとっている（図3）。霊長類の検証には、新生仔期のコモンマーモセットの摘出脳組織から GAP-43 に焦点を絞り、リン酸化プロテオミクス解析を行った。その結果、T181/S151 それぞれのリン酸化ペプチドの存在が確認できた。この結果を元に自信をもって、マーモセットの新生仔脳中の神経を T181/S151 それぞれのリン酸化検出抗体（pT181 Ab/pS151 Ab; 齧歯類の pT172 Ab/pS142 Ab とそれぞれ同一抗体）で組織学的に検証できた。またヒトへの臨床応用の第一歩として、神経分化させたヒト iPS 細胞の軸索と成長円錐が、pT181 Ab/pS151 Ab によって顆粒状に染まることを確認した^{22,23)}。一方、ヒト GAP-43 のリン酸化に対応するプロテインキナーゼについても、ヒト GAP-43 の野生型、GAP-43 T181A（アラニン変異）体と GAP-43 S151A 体コンストラクトを作製し、pT181 Ab/pS151 Ab の特異性を生化学的に確認するとともに、JNK1 がヒト GAP-43 T181/S151 をリン酸化することを実験的に示した^{22,23)}。

これまでのヒトの組織を用いた GAP-43 の研究は、GAP-43 そのものに焦点を絞った報告がなされてきた²⁵⁻²⁷⁾。今回 pT181 Ab/pS151 Ab を得たことで、今後は JNK1 が制御する GAP-43 のリン酸化の

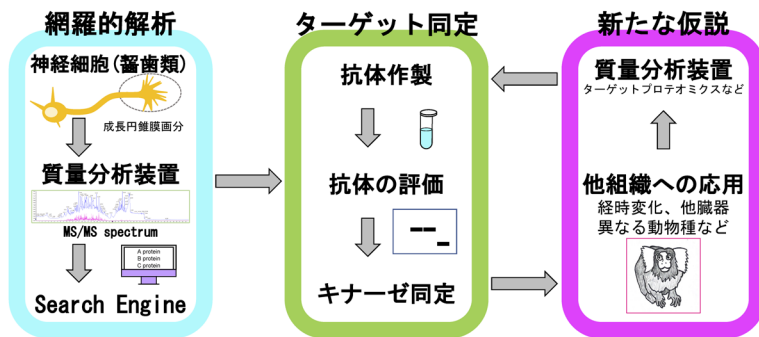


図3 質量分析装置を中心とした研究戦略

観点で、ヒトの軸索伸長や再生、神経回路形成などの分子機構を解明するための一つの土台ができたと確信している。

現在、霊長類でも JNK でリン酸化される第三のリン酸化部位 (齧歯類の S96 とは異なる配列部位) を見出ししており、リン酸化抗体を作製して解析中である (岡田、五十嵐: 投稿準備中)。これによれば、ヒトを含む霊長類も齧歯類同様、神経成長に関係する JNK 依存性リン酸化部位は3か所ある点が保存される、ということになる。

5. 神経成長・再生マーカー分子の条件

齧歯類の成体の神経再生について、GAP-43 リン酸化の有無を検証するため、図3の戦略に則り、マウスの坐骨神経損傷後3日目の神経組織と対側の非損傷坐骨神経組織中の GAP-43 S96 にターゲットを絞り、安定同位体標識した AQUA (the absolute quantification) ペプチドを用いた Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) 法でリン酸化プロテオミクス解析した。その結果、再生軸索を含む坐骨神経組織では、対側の非損傷坐骨神経と比べ GAP-43 S96 のリン酸化が4.135倍 (4個体の平均) 多く生じることを確認した⁸⁾。

DiAntonio グループは、*in vivo* の神経再生を解剖学的に検証するには、損傷遠位のワーラー変性を起こした神経と再生神経を選択的に分ける方法が

必要であるとし、感覚神経の再生マーカー抗体として SCG10 抗体の有用性を報告した²⁸⁾。この検討を踏まえ、我々は pS96 Ab/pS142 Ab/pT172 Ab を成体の神経における組織学的な神経軸索再生の検証に適用したところ、成体の非損傷神経ではリン酸化体検出は困難であり、スイッチの ON/OFF のように、損傷後の再生軸索ではリン酸化が急上昇したことから、pS96 Ab/pS142 Ab/pT172 Ab はそれぞれが再生マーカーに求められる特徴 (図4) を有すると報告した^{8, 22, 23)}。再生神経を直接検出できるマーカー抗体は、*in vitro*, *in vivo* 双方の研究で、創薬等を念頭に置いた実験に利用できるツールになると期待できる。

GAP-43 をめぐる今後の展望

近年では、悪性脳腫瘍の膠芽腫においても GAP-43 が形成する腫瘍細胞の microtubules が、腫瘍間ネットワーク形成に関連しているという驚くべき報告がなされた²⁵⁾。またてんかんモデルラットで GAP-43 を shRNA で抑制するとてんかん発作が抑制され、てんかん治療のターゲットとなる報告²⁶⁾ や Alzheimer 病患者の髄液中で GAP-43 が上昇し、疾患進行のバイオマーカーになるという報告²⁷⁾ がある。GAP-43 は発見から四半世紀以上経過し、未だ決定的な機能は明らかではないが、神経可塑性や軸索成長メカニズムに関して様々な視点で現在も研究が続いているタンパク質である²⁹⁾。GAP-43 の生化学的性質も四半世紀前に詳細に研究されたが、その後の神経化学の発展には完全に乗り遅れてしまっており、今再びその重要性を新しい研究技術で俎上にのせるチャンスが巡ってきた。

我々は、神経成長や再生時に JNK1 が齧歯類の GAP-43 S96/S142/T172 とヒトを含む霊長類の GAP-43 S151/T181 をリン酸化するとして報告した。一方で、JNK1 が制御する GAP-43 のリン酸化が、軸索伸長に対しどのような機能を持つのかについて、今後 GAP-43 のリン酸化を制御した実験によって明らかにしなければならない。

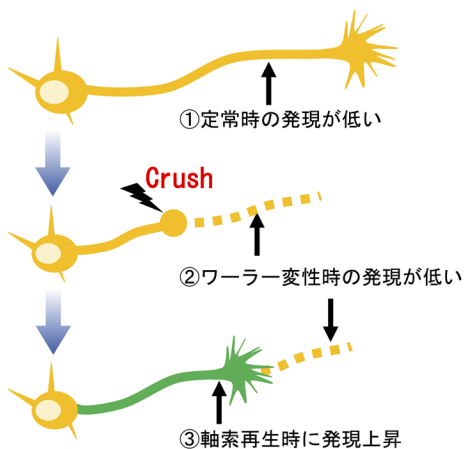


図4 神経再生マーカー抗体に求められる機能

謝 辞

本文で紹介した研究は、新潟大学医歯学系神経生化学分野と新潟大学脳研究所脳神経外科学分野での研究により得られた結果であります。五十嵐道弘教授（新潟大学）には、大学院時代から現在まで手厚いご指導を賜り、この文章を借りて深く御礼を申し上げます。著者が所属する新潟大学脳研究所脳神経外科分野の藤井幸彦教授には、研究への多大なご助言や私の研究環境の整備を頂き、心から感謝申し上げます。また共同研究者として、本研究遂行に貴重なご助言や標本提供などを賜りました澤本和延教授（名古屋市立大）、金子奈穂子教授（同志社大学）、河崎洋志教授・新明洋平准教授（金沢大学）、山崎博幸准教授（群馬医療福祉大学）、金村米博博士（大阪医療センター）、武内恒成教授（愛知医科大学）、玉田篤史准教授（関西医科大学）、河崎麻実特任講師を始めとする新潟大学神経生化学分野の皆様には厚く御礼申し上げます。医師として日常診療のなかでの基礎研究は、家族や新潟大学脳神経外科分野の先生方の支えなしに継続は困難であったことを、心にとめ今後も研究に邁進していく所存です。最後に2022年度日本神経化学会優秀賞・奨励賞選考委員の先生や関係者の皆様方には、本稿執筆の機会をお与え頂き、深く感謝を申し上げます。

文 献

- 1) 澤本和延. 13章 成体におけるニューロン新生. 宮田卓樹, 山本宣彦(編)脳の発生学 ニューロンの誕生・分化・回路形成. 化学同人, 205-220 (2013).
- 2) Teter B, Ashford JW. Neuroplasticity in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, 70(3), 402-437 (2002).
- 3) Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052), 1707-1710 (1992).
- 4) 五十嵐道弘. 成長円錐のタンパク質構成から見たその機能的分子基盤—プロテオミクスからのアプローチ. *生化学*, 84(9), 753-766 (2012).
- 5) 新明洋平, 田中英明. 7章 軸索投射のガイダンス, トポグラフィックマップ形成. 宮田卓樹, 山本宣彦(編)脳の発生学 ニューロンの誕生・分化・回路形成. 化学同人, 107-117 (2013).
- 6) Pfenninger KH, Ellis L, Johnson MP, Friedman LB, Somlo S. Nerve growth cones isolated from fetal rat brain: subcellular fractionation and characterization. *Cell*, 35(2 Pt 1), 573-584 (1983).
- 7) Nozumi M, Togano T, Takahashi-Niki K, Lu J, Honda A, Taoka M, Shinkawa T, Koga H, Takeuchi K, Isobe T, Igarashi M. Identification of functional marker proteins in the mammalian growth cone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(40), 17211-17216 (2009).
- 8) Kawasaki A, Okada M, Tamada A, Okuda S, Nozumi M, Ito Y, Kobayashi D, Yamasaki T, Yokoyama R, Shibata T, Nishina H, Yoshida Y, Fujii Y, Takeuchi K, Igarashi M. Growth cone phosphoproteomics reveals that GAP-43 phosphorylated by JNK is a marker of axon growth and regeneration. *iScience*, 4, 190-203 (2018).
- 9) Igarashi M, Kawasaki A, Ishikawa Y, Honda A, Okada M, Okuda S. Phosphoproteomic and bioinformatic methods for analyzing signaling in vertebrate axon growth and regeneration. *J Neurosci Methods*, 339, 108723 (2020).
- 10) Skene JH, Willard M. Axonally transported proteins associated with axon growth in rabbit central and peripheral nervous systems. *J Cell Biol*, 89(1), 96-103 (1981).
- 11) Lovinger DM, Colley PA, Akers RF, Nelson RB, Routtenberg A. Direct relation of long-term synaptic potentiation to phosphorylation of membrane protein F1, a substrate for membrane protein kinase C. *Brain Res*, 399(2), 205-211 (1986).
- 12) Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci*, 20(2), 84-91 (1997).
- 13) Alexander KA, Cimler BM, Meier KE, Storm DR. Regulation of calmodulin binding to P-57. A neurospecific calmodulin binding protein. *J Biol Chem*, 262(13), 6108-6113 (1987).
- 14) Gerendasy DD, Herron SR, Jennings PA, Sutcliffe JG.

- Calmodulin stabilizes an amphiphilic alpha-helix with- in RC3/neurogranin and GAP-43/neuromodulin only when Ca²⁺ is absent. *J Biol Chem*, 270(12), 6741–6750 (1995).
- 15) Terrak M, Wu G, Stafford WF, Lu RC, Dominguez R. Two distinct myosin light chain structures are induced by specific variations within the bound IQ motifs- functional implications. *EMBO J*, 22(3), 362–371 (2003).
 - 16) Kumar V, Chichili VP, Zhong L, Tang X, Velazquez- Campoy A, Sheu FS, Seetharaman J, Gerges NZ, Sivaraman J. Structural basis for the interaction of unstructured neuron specific substrates neuromodulin and neurogranin with Calmodulin. *Sci Rep*, 3(1), 1392 (2013).
 - 17) Forsova OS, Zakharov VV. High-order oligomers of intrinsically disordered brain proteins BASP1 and GAP- 43 preserve the structural disorder. *FEBS J*, 283(8), 1550–1569 (2016).
 - 18) Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identifi- cation of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*, 7(11), 2135–2148 (1993).
 - 19) Spencer SA, Schuh SM, Liu WS, Willard MB. GAP-43, a protein associated with axon growth, is phosphory- lated at three sites in cultured neurons and rat brain. *J Biol Chem*, 267(13), 9059–9064 (1992).
 - 20) Huttlin EL, Jedrychowski MP, Elias JE, Goswami T, Rad R, Beausoleil SA, Villén J, Haas W, Sowa ME, Gygi SP. A tissue-specific atlas of mouse protein phos- phorylation and expression. *Cell*, 143(7), 1174–1189 (2010).
 - 21) Igarashi M, Okuda S. Evolutionary analysis of proline- directed phosphorylation sites in the mammalian growth cone identified using phosphoproteomics. *Mol Brain*, 12(1), 53 (2019).
 - 22) Okada M, Kawagoe Y, Sato Y, Nozumi M, Ishikawa Y, Tamada A, Yamazaki H, Sekino Y, Kanemura Y, Shinmyo Y, Kawasaki H, Kaneko N, Sawamoto K, Fu- jii Y, Igarashi M. Phosphorylation of GAP-43 T172 is a molecular marker of growing axons in a wide range of mammals including primates. *Mol Brain*, 14(1), 66 (2021).
 - 23) Okada M, Kawagoe Y, Takasugi T, Nozumi M, Ito Y, Fukusumi H, Kanemura Y, Fujii Y, Igarashi M. JNK1- dependent phosphorylation of GAP-43 serine 142 is a novel molecular marker for axonal growth. *Neurochem Res*, 47(9), 2668–2682 (2022).
 - 24) Tedeschi A, Bradke F. The DLK signalling pathway— a double-edged sword in neural development and re- generation. *EMBO Rep*, 14(7), 605–614 (2013).
 - 25) Osswald M, Jung E, Sahn F, Solecki G, Venkataram- ani V, Blaes J, Weil S, Horstmann H, Wiestler B, Syed M, Huang L, Ratliff M, Karimian Jazi K, Kurz FT, Schmenger T, Lemke D, Gömmel M, Pauli M, Liao Y, Häring P, Pusch S, Herl V, Steinhäuser C, Kronic D, Jarahian M, Miletic H, Berghoff AS, Griesbeck O, Kalamakis G, Garaschuk O, Preusser M, Weiss S, Liu H, Heiland S, Platten M, Huber PE, Kuner T, von De- imling A, Wick W, Winkler F. Brain tumour cells inter- connect to a functional and resistant network. *Nature*, 528(7580), 93–98 (2015).
 - 26) Nemes AD, Ayasoufi K, Ying Z, Zhou QG, Suh H, Najm IM. Growth associated protein 43 (GAP-43) as a novel target for the diagnosis, treatment and preven- tion of epileptogenesis. *Sci Rep*, 7(1), 17702 (2017).
 - 27) Qiang Q, Skudder-Hill L, Toyota T, Wei W, Adachi H. CSF GAP-43 as a biomarker of synaptic dysfunction is associated with tau pathology in Alzheimer’s disease. *Sci Rep*, 12(1), 17392 (2022).
 - 28) Shin JE, Geisler S, DiAntonio A. Dynamic regulation of SCG10 in regenerating axons after injury. *Exp Neurol*, 252, 1–11 (2014).
 - 29) Holahan MR. A shift from a pivotal to supporting role for the growth-associated protein (GAP-43) in the coordination of axonal structural and functional plas- ticity. *Front Cell Neurosci*, 11, 266 (2017).