

自己評価報告書

平成23年 4月14日現在

機関番号：16101

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20113004

研究課題名（和文） 高次神経機能を支えるロジスティクス機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of intracellular logistics underlying higher neuronal functions

研究代表者

佐々木 卓也 (SASAKI TAKUYA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：40241278

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：高次神経機能、細胞内物流システム、Rabファミリー低分子量G蛋白質

1. 研究計画の概要

高次神経機能を支えるには、個々のシナプスにおける情報伝達の微調整が重要となってくる。その微調整機構として神経伝達物質を含むシナプス小胞の輸送や安定したシナプス形成に必要な接着分子等の輸送の制御があると考えられる。本研究では、小胞輸送の代表的な制御系である Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質とその関連蛋白質に注目してこれらの細胞内物流システムの分子基盤を明らかにすることを目的とする。シナプス小胞輸送については Rab3A 系に、接着分子等の輸送の制御については Rab13-JRAB/MICAL-L2 系に特に焦点をあてて解析を進める。

2. 研究の進捗状況

シナプス形成に関わる接着分子の輸送の制御機構については、神経再生への関与が報告されている Rab13 に注目した研究を進めてきた。本研究を開始する前に、研究代表者は、Rab13 の標的蛋白質として JRAB/MICAL-L2 を見出していた。また、上皮細胞をアッセイ系として用いて Rab13-JRAB 系の機能を解析し、Rab13-JRAB 系が接着分子 claudins と occludin の細胞膜への輸送を制御することにより細胞間接着装置であるタイトジャンクションの形成に関与することを示していた。本研究では、まずこの系が上皮細胞と同様に極性を有する神経細胞でも機能していることを証明するため、神経様細胞株である PC12 細胞を用いて Rab13-JRAB 系の機能を解析し、Rab13-JRAB 系が神経突起形成に関与していることを明らかにした。その際、JRAB が Rab13 依存性にアクチン結合蛋白質 actinin-4

に結合し、actinin-4 を突起先端部に輸送することで先端部でのアクチン細胞骨格の再編成を引き起こし、その結果、突起が伸長することを示した (*Mol. Cell. Biol.* 2010)。神経突起形成においては小胞輸送と細胞骨格の再編成が連動して制御されることが重要であるが、これまでの本研究から、Rab13-JRAB 系はその鍵を握る制御系である可能性が高くなってきている。また、Rab13 と JRAB については、個体レベルの解析を行うため、Cre-loxP 系を用いた conditional ノックアウト (KO) マウスを作製しており、これまでに、どちらもキメラマウスが完成し、一部 flox マウスが確保できた状況にある。一方、シナプス小胞の輸送についての解析は、研究代表者が Rab3A 関連蛋白質のうち、シナプス小胞に局在する巨大蛋白質として同定した Rabconnectin-3 について解析を行った。Rabconnectin-3 は α と β の 2 個のサブユニットからなるが、本研究では、どちらの KO マウスも作製している。これまでの解析から、どちらのサブユニットの KO マウスも胎生致死であることが判明し、Rabconnectin-3 は成体脳でのシナプス小胞輸送の制御だけでなく、神経発生期にも何らかの役割を果たしていることが予想された。現在、Rabconnectin-3 の胎生期の神経発生との関係を解析するとともに、あわせて conditional KO マウスの作製も新たに開始している。

3. 現在までの達成度

<区分>

①当初の計画以上に進展している

(理由)

シナプス小胞の輸送制御機構の解析については、研究代表者が同定した Rabconnectin-3 の α と β の2個のサブユニットの KO マウスの作製に成功して解析を行い、どちらのサブユニットの KO マウスも胎生致死であることが判明したことから、Rabconnectin-3 は神経発生期に何らかの役割を果たしていることが示唆される。神経発生期は形態的にも機能的にもダイナミックな変化が起こる時期であり、特に細胞内物流システムが多いに寄与していると考えられることから、今後の解析により本物流システムにおける Rabconnectin-3 の重要性が明らかになることが期待できる。一方、シナプス形成に関わる接着分子の輸送の制御機構については、研究代表者が見出した Rab13-JRAB 系が神経突起伸長やシナプス形成に重要な役割を果たしていることが明らかになったが、Rab13-JRAB 系は多くの蛋白質の輸送に関与しているだけでなく、輸送を支えるアクチン細胞骨格系の制御にも関与する結果も得ており、当初の予想以上に多彩な機能を果たしていることが明らかになりつつある。以上のように前半は十分な成果が得られたと考えている。

4. 今後の研究の推進方策

シナプス形成に関わる接着分子の輸送の制御機構については、引き続き Rab13-JRAB 系に注目した解析を行うが、今後、新たにこれまでに作製に成功した Rab13 と JRAB の conditional KO マウスを用いた個体レベルの解析も行っていきたい。すなわち、Rab13 と JRAB が神経発生期に KO されたマウスや海馬や小脳プルキンエ細胞特異的に KO されたマウスを解析に用いることが可能となったことから、シナプス形成を支える物流システムについて、時期特異的あるいは領域特異的な解析を行いたいと考えている。一方、シナプス小胞の輸送についての解析は、引き続き、Rabconnectin-3 の両サブユニットの KO マウスの解析を行うとともに、conditional KO マウスを作製し、その解析を行いたい。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Sakane A., Honda K. and Sasaki, T. Rab13 regulates neurite outgrowth in PC12 cells through its effector protein, JRAB/MICAL-L2. *Mol. Cell. Biol.*, 30, 1077-1087 (2010) (査読有)
- ② Tabata, K. Sasaki, T. et al. (6人中4番目) Rubicon and PLEKHM1 negatively regulate

the endocytic/autophagic pathway via a novel Rab7-binding domain. *Mol. Biol. Cell*, 21, 4162-4173 (2010) (査読有)

- ③ Szodorai, A. Sasaki, T. et al. (13人中6番目) APP anterograde transport requires Rab3A GTPase activity for assembly of the transport vesicle. *J. Neurosci.*, 29, 14534-14544 (2009) (査読有)
- ④ Nishimura, N., and Sasaki, T. Rab family small G proteins in regulation of epithelial apical junctions. *Front. Biosci.*, 14, 2115-2129 (2009) (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Sapporo International Cancer Symposium 2010 (June28-June 29, 2010 in Sapporo) Role of Rab small G proteins in cellular morphogenesis. Takuya Sasaki and Ayuko Sakane
- ② 第 62 回日本細胞生物学会大会シンポジウム (2010 年 5 月 20 日、大阪) Functions of Rab family small G proteins in neurite outgrowth. Takuya Sasaki and Ayuko Sakane
- ③ 第 62 回日本細胞生物学会大会 (2010 年 5 月 19 日、大阪) The Rubicon family negatively regulates the endocytic pathway through the interactions with Rab7. Tabata K. Sasaki T. et al. (6人中4番目)
- ④ BMB2008 シンポジウム (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会(2008 年 12 月 11 日、神戸) Exocytotic Rab small G proteins regulate neuronal development and plasticity. Takuya Sasaki and Ayuko Sakane

[図書] (計 4 件)

- ① 坂根亜由子, 佐々木卓也 (2010) Rab3A と神経可塑性
生体の科学 61 巻 5 号 : 426-427 頁
- ② 坂根亜由子, 佐々木卓也 (2009) Rab ファミリー-Small G タンパク質による小胞輸送制御と高次生命機能
細胞工学 28 巻 12 号 : 1247-1251 頁