

令和元年5月23日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04672

研究課題名(和文) 低分子量G蛋白質Arf6経路に着目した網膜リボンシナプスの分子解剖学

研究課題名(英文) Molecular anatomy of photoreceptor ribbon synapses with special attention to the ADP ribosylation factor 6 (Arf6) pathway

研究代表者

阪上 洋行 (SAKAGAMI, HIROYUKI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90261528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、網膜の視細胞リボンシナプスにおける低分子量G蛋白質ADPリボシル化因子6経路の役割を明らかにすることを目的として実施した。その結果、Arf6の活性化制御分子であるBRAG2aが視細胞のリボンシナプスの細胞膜にジストロフィン複合体と共存することを免疫組織学的解析により見出した。さらに網膜抽出液を用いたプルダウン法や免疫沈降法により、BRAG2aがジストロフィン及びジストログリカンと複合体と形成することを見出した。以上の結果より、BRAG2aはジストロフィン複合体の新たな構成分子として、Arf6の活性化を介してシナプス形成や維持を制御する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの外界からの情報の大半は視覚に依存しており、視覚障害が生活の質(QOL)に与える影響は著しく大きい。網膜の視細胞は、明暗・色調を鋭敏に感知して神経伝達物質を持続的に放出する特殊なシナプス「リボンシナプス」を持つ。しかしながら、リボンシナプスの生理学的特性を支える分子制御機序は未だ不明である。本研究は、低分子量G蛋白質Arf6経路の網膜リボンシナプスでの機能を明らかにするために実施した。その結果、視細胞リボンシナプスにおいてArf6活性化制御因子BRAG2aがジストロフィン複合体を形成することを見出し、リボンシナプスの形成・維持に関わる新たな制御経路である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to provide the functional importance of the ADP ribosylation factor 6 (Arf6) pathway in the photoreceptor ribbon synapse. By immunofluorescence and immunoelectron microscopy using a novel anti-BRAG2a antibody, we found that BRAG2a, a guanine nucleotide exchange factor specific for Arf6, colocalized to the plasma membrane of lateral walls and processes of photoreceptor terminals within the synaptic cavity with dystroglycan and dystrophin. Pull-down and immunoprecipitation assays using the retinal lysate demonstrated the complex formation of BRAG2a with the dystrophin and beta-dystroglycan. The present study provides evidence for BRAG2a as a novel component of the photoreceptor dystrophin-associated glycoprotein complex (DGC), suggesting the possible functional involvement of the BRAG2a-Arf6 pathway downstream of the DGC in synaptic organization of photoreceptors.

研究分野：神経解剖学

キーワード：リボンシナプス 視覚 筋ジストロフィー 小胞輸送

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

網膜や内耳の感覚受容細胞である視細胞や有毛細胞は、明暗や聴覚・平衡感覚などの感覚情報を鋭敏に感知して、膜電位を変化させて神経伝達物質を持続的に放出する特殊なシナプス「リボンシナプス」を持つ。リボンシナプスの構造は、シナプス終末に存在する板状の電子密度の高い構造物である「シナプスリボン」により特徴付けられる。このシナプスリボンは、多数のシナプス小胞を付着することにより放出可能な小胞プールを確保し、持続的な神経伝達物質の放出を可能にしているものと考えられている。研究開始当初、Schmitz ら(2000)によるシナプスリボンの構造タンパク質として RIBEYE 分子の同定をきっかけに、RIBEYE との分子間相互作用を持つ幾つかの分子が単離されつつあったが、リボンシナプスの生理学的特性を支える分子機序は未だ不明であった。また、網膜視細胞は、双極細胞と水平細胞の突起が陥入しリボンシナプスを形成するが、そのシナプス形成機序は未解明であったが、網膜視細胞のリボンシナプスの細胞膜上に局在するジストログリカンとリボンシナプス間隙の細胞外マトリックスタンパク質としてピカチュリンとの相互作用によるシナプス形成の制御機構が報告され(Sato et al., 2008)、リボンシナプス形成機構の解明の糸口が見出されつつあった。

申請者は、細胞膜とエンドソーム間の小胞輸送を制御する低分子量 G 蛋白質 ADP リボシル化因子(Arf) 6 とその活性化に制御するグアニンヌクレオチド交換因子の BRAG 分子ファミリーに着目して、神経機能解明をこれまで行ってきた。その一連の研究過程で、Arf6 の活性化に関わるグアニンヌクレオチド交換因子の BRAG(Brefeldin A-resistance Arf-GEF)分子ファミリーに属する BRAG1, 2, 3 分子のうち、BRAG1 が、網膜の視細胞において RIBEYE 分子と分子間相互作用を介してシナプスリボンに特異的に局在する新規シナプスリボン構成分子であること(Katsumata et al., 2009)を見出し、BRAG-Arf6 経路が網膜視細胞のリボンシナプスの新たな機能制御経路である可能性を示唆する自己所見を得た。

### 2. 研究の目的

このような研究背景のなか得られた自己所見を発展させて、BRAG-Arf6 経路が網膜視細胞のリボンシナプスにおける役割の解明を目的として

- (1) BRAG ファミリー分子の視細胞リボンシナプスでの発現・局在制御機構の解明
- (2) BRAG1 の遺伝子欠損マウスの樹立と網膜での機能の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

- (1) 免疫組織科学染色：網膜を 4%パラフォルムアルデヒドで固定しスクロースで浸漬した後、クライオトームを用いて 20 $\mu$ m の切片を作製した。切片をペプシン処理した後、正常血清でブロッキングし、一次抗体で一晩反応させた。二次抗体として、蛍光染色法では Alexa488 あるいは Alexa596 標識抗体を、免疫電子顕微鏡法ではナノゴールド標識抗体を用いた。免疫電子顕微鏡法では銀増感法を用いて免疫反応を増幅させた。
- (2) プルダウン法：FLAG エピトープを N 末端に付加した BRAG2 を HeLa 細胞に発現させて 50mM TrisHCl (pH 7.5), 0.15M NaCl, 1% TritonX-100 からなるバッファーで溶出した後、ジストロフィン(2937-3685 残基)及びジストログリカンの細胞質領域(C 末端 120 アミノ酸)の GST 融合タンパクを添加して、プルダウン法を施行した。得られた沈降物に対して抗 BRAG2 抗体を用いたウエスタンブロット法により BRAG2 の存在を検討した。また、網膜の溶出液でも同様にプルダウン法を実施した。
- (3) 免疫沈降法：網膜を 50mM TrisHCl (pH 7.5), 0.15M NaCl, 0.5% Digitonin, 0.05% Nonidet-P40 からなるバッファーで可溶化し、抗ジストロフィン抗体を反応させ免疫沈降法を実施した。その後、免疫沈降物をウエスタンブロット法により解析した。
- (4) In situ Proximity Ligation(PKL) アッセイ：網膜の切片に対して、切片をペプシン処理した後、正常血清でブロッキングを行った後、ウサギ抗 BRAG2a 抗体とマウス抗ジストロフィン抗

体を反応させた。その後、オリゴヌクレオチドを結合させた二次抗体（抗ウサギ PLUS、抗マウス MINUS PLA プローブ, Sigma-Aldrich）を反応させた後、Duolink PLA 免疫染色シグナル増幅キットを用いて反応を可視化した。

- (5) BRAG1 の遺伝子欠損マウスの樹立: 新潟大学・医学部・崎村健司教授との共同研究により、常法に従い、ES 細胞レベルで *BRAG1/Iqsec3* 遺伝子のエクソン 3 の両端のイントロン部分に LoxP 配列を挿入し、キメラマウスを作製した。ヘテロ接合体型マウスを樹立した後、錐体・杆体細胞において Cre リコンビナーゼを発現する Crx-Cre トランスジェニックマウスとの交配を実施した。

#### 4. 研究成果

- (1) BRAG2 の網膜視細胞における局在とジストロフィンとの複合体の形成

BRAG2 はスプライシングの相違により、プロリン・リッチ領域と PDZ 結合モチーフを含む C 末領域の挿入がある 1099 アミノ酸からなる BRAG2a と短い C 末領域からなる 961 アミノ酸の BRAG2a の 2 種類のアイソフォームが存在する。本研究では、まず、BRAG2a 特異抗体を作製し、網膜で免疫組織染色を行った結果、BRAG2a がジストロフィンの局在に一致した発現様式を示すことを見出した(図 1)。

次に BRAG2 がジストロフィン及びジストログリカンと複合体を形成する可能性を検討するために、ジストロフィンの WW 領域を含む 2937-3685 アミノ酸領域(ジストロフィン[2937-3685])と膜

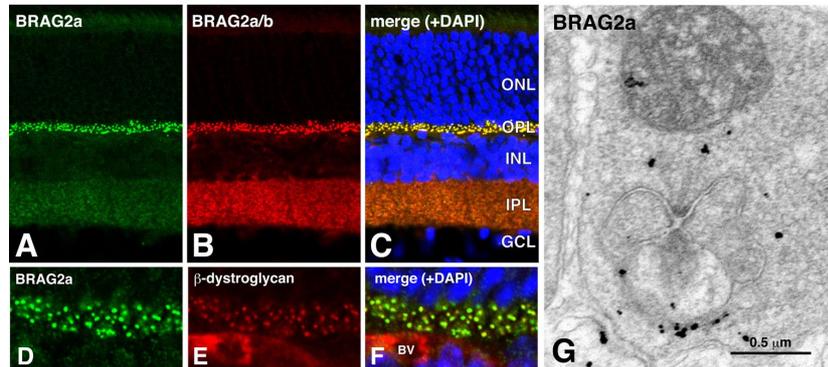
図 1 網膜における BRAG2a の免疫組織学的局在

(A-C) 網膜での BRAG2a と BRAG2a/b の局在

(D-F) 外網状層での BRAG2a と  $\beta$ -ジストログリカンの共局在

(G) 視細胞前シナプス終末での BRAG2a 局在を示す免疫電子顕微鏡像

GCL, 神経節細胞層; INL, 内顆粒層; IPL, 内網状層; 内顆粒層 ONL, 外顆粒層; OPL, 外網状層



タンパク質のジストログリカンの細胞内領域である C 末端 120 アミノ酸(ジストログリカン[C120])の GST 融合タンパク質を用いてプルダウン法を施行した。その結果、GST-ジストロフィン(2937-3685)は、BRAG2a を効率良く沈降させたのに対して、BRAG2b は沈降させなかった。一方、GST-ジストログリカン(C120)は BRAG2a と BRAG2b のいずれも沈降させた。さらに、抗ジストロフィン抗体を用いて網膜の抽出液から免疫沈降を施行した結果、BRAG2a と BRAG2b がジストロフィンとともに免疫沈降産物に検出された。次に、網膜において、抗 BRAG2a 抗体と抗ジストロフィン抗体を用いて in situ PLA 法を行った結果、両抗体を反応させた場合に、特異なシグナルが検出されたことより、両分子が複合体を形成するなどの非常に近接した分子間距離で存在していることが示唆された。さらに、網膜視細胞に発現するジストロフィン Dp426, Dp260, Dp140 の発現を欠損したジストロフィンのエクソン 52 を欠損させたマウスの網膜での BRAG2 の発現を免疫組織学的に検討した。その結果、ジストロフィンの欠損した網膜視細胞において、BRAG2a の発現は顆粒状に分布するが、その発現量は約 50%程に減少することを見出した。以上の結果より、BRAG2 の 2 つのアイソフォームである BRAG2a と BRAG2b の両分子が、網膜の視細胞リボンシナプスにおいてジストログリカン・ジストロフィン複合体と複合体を形成すること、また、BRAG2a はジストロフィンとジストログリカンと、BRAG2b はジストログリカンと結合能を有すること、さらにジストロフィンとの結合は、BRAG2 のリボンシナプスへの局在に重要であることを見出した。ジストロフィン遺伝子欠損を原因とする進行性の筋変性疾患である Duchenne 型筋ジストロフィーや Becker 型筋ジストロフィーの患者において、しばしば網膜電図の異常を示すことが知られている。また、近年、ピカチュリンが視細胞のジストログリカンの生理的リ

グランドとして発見され、ピカチュリンとジストログリカンとの相互作用が視細胞のリボンシナプス部への双極細胞の突起の陥入によるシナプス形成に重要であることが明らかになってきている(Sato et al., 2008; Omori et al., 2012)。BRAG2 による Arf6 活性化が皮質アクチン細胞骨格の再構築を介して細胞の形態変化に関わっていることを考え合わせると、BRAG2 が Arf6 の活性化を介して網膜視細胞のリボンシナプスの形成や維持に深く関与する可能性が示唆された。今後、視細胞特異的 BRAG2 遺伝子欠損マウスにより、リボンシナプス形成への個体レベルでの役割をさらに検討することにより、筋ジストロフィーにおける網膜症状の発症機序の解明に繋がるものと期待される。

## (2) 視細胞特異的 BRAG1 遺伝子欠損マウスの樹立

BRAG1/Iqsec2 遺伝子のエクソン 3 の両端に LoxP 配列を挿入した Flox マウスを樹立し、錐体・杆体細胞において Cre リコンビナーゼを発現する Crx-Cre トランスジェニックマウスと交配させて、視細胞特異的な BRAG1/Iqsec2 遺伝子欠損マウスの作製に成功した。交配効率の低さなどの問題で実験計画は遅延したが、現在、リボンシナプス形成に関する形態学的解析および網膜電図による網膜情報伝達に関する生理学的解析を実施している。

## < 引用文献 >

Katsumata O, Ohara N, Tamaki H, Niimura T, Naganuma H, Watanabe M, Sakagami H. IQ-ArfGEF/BRAG1 is associated with synaptic ribbons in the mouse retina. *Eur. J. Neurosci.*, 30:1509-1516 (2009)

Omori Y, Araki F, Chaya T, et al., Presynaptic dystroglycan-pikachurin complex regulates the proper synaptic connection between retinal photoreceptor and bipolar cells. *J Neurosci.* 32:6126-6137 (2012)

Sato S, Omori Y, et al., Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat Neurosci.* 11:923-931 (2008)

Schmitz F, Königstorfer A, Südhof TC. RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron.* 28:857-872 (2000)

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] ( 計 36 件 )

Saegusa S, Fukaya M, Kakegawa W, Tanaka M, Katsumata O, Sugawara T, Hara Y, Itakura M, Okubo T, Sato T, Yuzaki M, Sakagami M. Mice lacking EFA6C/Psd2, a guanine nucleotide exchange factor for Arf6, exhibit lower Purkinje cell synaptic density but normal cerebellar motor functions. *PLoS One* (2019) in press

Hara Y, Fukaya M, Sugawara T, Sakagami H. FIP4/Arfophilin-2 plays overlapping but distinct roles from FIP3/Arfophilin-1 in neuronal migration during cortical layer formation. *Eur. J. Neurosci.* 査読有 48:3082-3092 (2018) DOI: 10.1111/ejn.14199.

Ito A, Fukaya M, Saegusa S, Kobayashi E, Sugawara T, Hara Y, Yamauchi J, Okamoto H, Sakagami H. Pallidin is a novel interacting protein for cytohesin-2 and regulates the early endosomal pathway and dendritic formation in neurons. *J. Neurochem.* 査読有 147: 153-177 (2018) DOI: 10.1111/jnc.14579.

Sakagami H, Katsumata O, Hara Y, Sasaoka T, Fukaya M. BRAG2a, a guanine nucleotide exchange factor for Arf6, is a component of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the photoreceptor terminal. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 査読有 58:3795-3803 (2017) DOI: 10.1167/iovs.17-21746.

Katsumata O, Mori M, Sawane Y, Niimura T, Ito A, Okamoto H, Fukaya M, Sakagami H. Cellular

and subcellular localization of ADP-ribosylation factor 6 in mouse peripheral tissues. *Histochem Cell Biol.* 査読有 148:577-598 (2017) DOI: 10.1007/s00418-017-1599-8.

Fukaya M, Ohata S, Hara Y, Tamaki H, Sakagami H. Distinct subcellular localization of alternative splicing variants of EFA6D, a guanine nucleotide exchange factor for Arf6, in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 査読有 524:2531-2552 (2016) DOI: 10.1002/cne.24048.

Sakagami H, Hara Y, Fukaya M. Interaction of serologically defined colon cancer antigen-3 with Arf6 and its predominant expression in the mouse testis. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 477: 868-873 (2016) DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.06.150.

Hara Y, Fukaya M, Hayashi K, Kawauchi T, Nakajuma K, Sakagami H. ADP ribosylation factor 6 regulates neuronal migration in the developing cerebral cortex through FIP3/Arfophilin-1-dependent endosomal trafficking of N-cadherin. *eNeuro* 査読有 3(4). pii: ENEURO.0148-16.2016. (2016) DOI: 10.1523/ENEURO.0148-16.2016.

〔学会発表〕(計 18 件)

三枝信太郎、深谷 昌弘、阪上 洋行、低分子量 G タンパク質 Arf6 活性化因子 EFA6C の小脳シナプス形成における役割、第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018 年 3 月 27 日 新潟

伊藤諭子、深谷昌弘、岡本浩嗣、阪上洋行、Arf6 活性化制御因子 cytohesin 2 の局在解析と疼痛制御機構における役割、第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018 年 3 月 27 日 新潟

深谷 昌弘、伊藤 諭子、岡本 浩嗣、阪上 洋行、新規 cytohesin-2 結合分子 Pallidin の細胞内局在とその機能、第 40 回日本神経科学 2017 年 7 月 21 日 幕張

加倉井俊也、深谷昌弘、山内淳司、阪上洋行、中枢神経系髄鞘形成における Arf6 活性調節因子 cytohesin-2 の機能、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017 年 3 月 28 日 長崎

深谷昌弘、小林瑛未、阪上洋行、新規 cytohesin-2 結合分子 Pallidin の生体マウス脳における細胞内局在解析、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017 年 3 月 28 日 長崎

阪上 洋行、深谷 昌弘、Arf6 活性制御因子 BRAG2c はジストロフィン複合体との相互作用を介して網膜視細胞のシナプスに局在する、第 39 回日本神経科学大会 2016 年 7 月 22 日 神戸

深谷 昌弘、阪上 洋行、シナプス後部における BRAG2-Arf6 シグナル経路を介した AMPA 受容体輸送調節機構、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2016 年 3 月 30 日 福島

阪上 洋行、BRAG2-Arf6 経路による新たな AMPA 受容体シナプス発現調節機構、BMB2015(第 86 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会) 2015 年 11 月 7 日 神戸

深谷 昌弘、阪上 洋行、BRAG2 は endophilin3 との相互作用を介してシナプス後部での Arf6 の活性化と AMPA 型受容体のエンドサイトーシスを調節する、第 38 回日本神経科学大会 2015 年 7 月 28 日 神戸

原 芳伸、阪上 洋行、ADP リボシル化因子 6 (Arf6) は脳層形成において神経細胞の移動を制御する。第 38 回日本神経科学大会 2015 年 7 月 28 日 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

北里大学医学部解剖学(阪上単位)教室ホームページ <http://www.med.kitasato-u.ac.jp/~sakagami/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：深谷 昌弘

ローマ字氏名：FUKAYA, Masahiro

研究協力者氏名：原 芳伸

ローマ字氏名：HARA, Yoshinobu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。