

平成21年 4月 3日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790087

研究課題名（和文）セプチン結合タンパク質の探索と性状・機能解析

研究課題名（英文）Identification and characterization of septin binding proteins

研究代表者

伊東 秀記（ITO HIDENORI）

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経制御学部・主任研究員

研究者番号：40311443

研究成果の概要：脳の発達に伴い増加する Sept8 に結合する分子の探索を行い、VAMP2 および dysbindin-1 を同定した。Sept8 と VAMP2 の結合を解析し、Sept8 は、神経伝達物質放出を制御している可能性があることを明らかにした。また、dysbindin-1 の神経組織における解析を行い、dysbindin-1 は、神経細胞の樹状突起形態を制御している可能性があることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：神経化学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ニューロン、シナプス、シナプス小胞、開口放出

1. 研究開始当初の背景

セプチンは、酵母から哺乳動物まで保存された分子量4万から8万のGTP結合タンパク質で、酵母では、細胞分裂や小胞輸送に関与していることが知られている。哺乳動物では、14種類の分子（Sept1～Sept14）が同定されており、それぞれの分子には数種類のスプライシングバリエーションが存在し、分子多様性を示している。哺乳動物セプチンの研究は、多くの分子がゲノムデータベース解析から同定されていることもあり、生理機能に根ざした研究は、あまり進んで

いなかった。そのような状況下で、国内外の研究グループにより、Sept5は、シナプス前膜に存在するSNARE分子の1つであるシンタキシンと結合すること、また、Sept4ノックアウトマウスは、精子形態の異常がみられ、雄不妊となること、Sept6が細胞分裂時の染色体凝集を制御していることなど、セプチンの生理機能の一端を明らかにする研究成果が報告され始めていた。私共の研究グループは、独自に作製した5種類のセプチン分子（Sept6, Sept7, Sept8, Sept9, Sept11）に対する特異抗体を用いて、ラッ

ト臓器における分布をウェスタンブロット法で解析した。その結果、これらすべてのセプチン分子は、脳組織に豊富に発現していることが分かった。また、胎生期から生後発達期のラット脳におけるセプチンの発現変化を同様に解析したところ、Sept8 が発達に伴って顕著に増加することを見つけた。酵母ツーハイブリッド法により、Sept8 結合タンパク質を探索したところ、予備的にはあったが、シナプス小胞に存在する SNARE 分子の 1 つである VAMP2 などの分子を陽性クローンとして同定した。このような経緯から、本研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

(1) Sept8 と VAMP2 の結合の性状機能解析

Sept8 は、Sept5 に結合する分子として同定されているが、その生理機能については全く分かっていない。そこで、酵母ツーハイブリッドスクリーニングで同定された VAMP2 との結合を、生化学的、分子生物学的手法により解析し、神経細胞のシナプスにおける Sept8 の生理機能を明らかにする。

(2) dysbindin-1 の性状機能解析

Sept8 結合タンパク質のスクリーニングの過程で、dysbindin-1 が陽性クローンとして同定された。この分子の遺伝子多型が統合失調症と関連することが知られているが、神経細胞における機能については未解明の点が多い。そこで、dysbindin-1 の神経組織における生理機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Sept8 と VAMP2 の結合の性状機能解析

① Sept8 と VAMP2 の結合の確認

哺乳動物細胞の過剰発現系を用いた免疫沈降法により結合を確認した。また、ラット脳抽出液を用いた免疫沈降法により、生理条件下での複合体形成を確認した。

② Sept8 と VAMP2 の細胞内局在の解析

蛍光抗体法により、ラット海馬神経細胞における Sept8 と VAMP2 の局在を検討した。また、ラット脳を用いた大脳分画を行い、Sept8 の局在を生化学的に解析した。

③ VAMP2 とシナプス関連分子の結合に対する Sept8 の影響

VAMP2 とシナプス関連分子（シナプトフィシン、シンタキシン、SNAP25）の結合に及ぼす Sept8 の影響を、哺乳動物細胞過剰発現系を用いた免疫沈降法により解析した。

(2) dysbindin-1 の性状機能解析

① ラット臓器における dysbindin-1 の発現解析

dysbindin-1 に対する特異抗体を作製し、ラット全身臓器における dysbindin-1 の分布をウェスタンブロット法により解析した。また、13カ所のラット脳部位における発

現および、ラット脳の発達に伴う dysbindin-1 の発現変化を同様に解析した。②形態学的手法による dysbindin-1 の解析
ラット脳組織における dysbindin-1 の局在を免疫組織化学法により解析した。また、初代培養海馬神経細胞における局在を蛍光抗体法により解析した。

③ 神経発達における dysbindin-1 の機能解析

データベース解析により、dysbindin-1 結合分子の検索を行った。過剰発現系およびラット脳抽出液を用いた免疫沈降法により、結合を確認した。

4. 研究成果

(1) Sept8 と VAMP2 の結合の性状機能解析

COS 細胞に、Sept8 と VAMP2 を発現させ、免疫沈降を行ったところ、両者の結合を確認できた。また、ラット脳抽出液を用いて Sept8 を免疫沈降した時の沈降物にも VAMP2 は含まれていたことから、両者は、生理的条件下においても複合体を形成していると考えられた。蛍光抗体法により、初代培養海馬神経細胞での Sept8 と VAMP2 の局在を比較したところ、両者は部分的ではあるが共局在していた（図 1）。

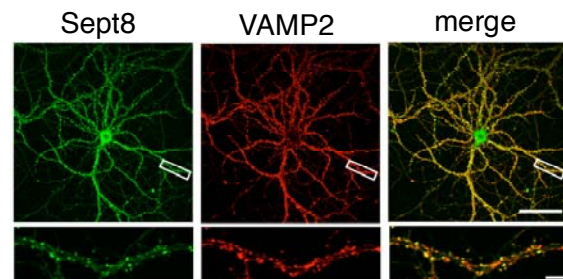


図 1. 初代培養海馬神経細胞における Sept8 と VAMP2 の局在

VAMP2 は、シナプス小胞上でシナプトフィシンと結合しているが、開口放出の際には、シナプトフィシンから解離して、シナプス前膜にあるシンタキシンおよび SNAP25 と結合することが知られている。まず、Sept8 が他のシナプス関連分子と結合するか検討したところ、シンタキシンとは結合したが、シナプトフィシンと SNAP25 とは結合しないことが分かった。また、Sept8 は、VAMP2 とシナプトフィシンの結合を抑制した。一方、Sept8 と VAMP2 の結合は、SNAP25 により抑制された。これらのことから、Sept8 は、神経伝達物質の放出過程において、シナプトフィシンからの VAMP2 の解離を制御し、SNARE コンプレックス形成後に、VAMP2 から解離すると考えられた（図 2）。

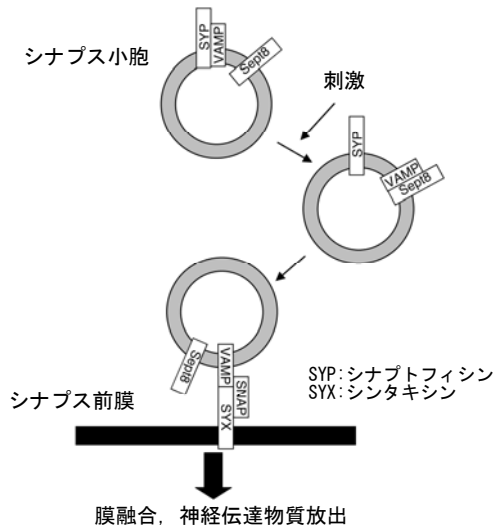


図2. 神経伝達物質放出過程における Sept8 とシナプス関連分子の相互作用 (仮説)

(2) dysbindin-1 の機能解析

ラットの各種臓器における分布を、特異抗体を用いたウェスタンブロット法により解析したところ、分子量 50kDa のアイソフォームは普遍的に発現していたが、40kDa の分子は、脳組織に選択的に発現していた。胎生期から生後発達期のラット脳における dysbindin-1 の発現を検討したところ、胎生期には 50kDa の分子が多く、発達に伴って 40kDa の分子が増加することが分かった (図3)。

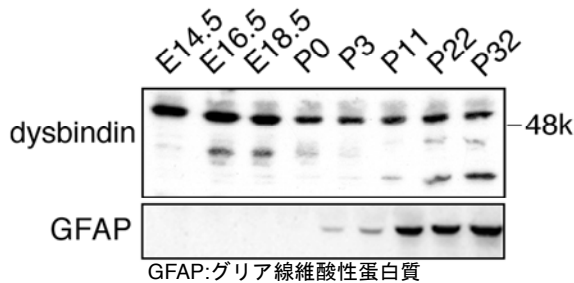


図3. ラット脳の発達に伴う dysbindin-1 の発現変化

組織化学的解析により、大脳皮質、海馬、小脳の神経細胞の細胞体、および樹状突起に dysbindin-1 は局在していることが分かった (図4)。初代培養海馬神経細胞における dysbindin-1 の局在を蛍光抗体法により検討したところ、樹状突起のスパイン様構造での局在が見られた。dysbindin-1 結合分子を、データベースにより検索したところ、WAVE2 が陽性クローンとして同定されていることを見いだした。WAVE2 およびその関連分子は、アクチン細胞骨格の制御に関与し、樹状突起スパインの形態を制御していることから、dysbindin-1 は、WAVE2 と複合体を形成し、スパインの発達過程において

何らかの役割を果たしている可能性があり、現在解析を進めている。

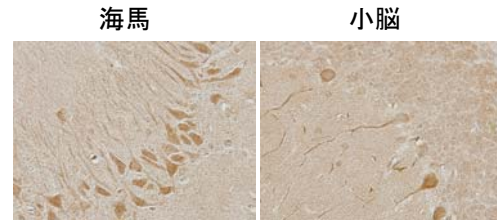


図4. ラット海馬および小脳における dysbindin-1 の局在

5. 主な発表論文等

(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9件)

- ① Ito H, Atsuzawa K, Morishita R, Usuda N, Sudo K, Iwamoto I, Mizutani K, Katoh-Semba R, Nozawa Y, Asano T, Nagata K. (2009) Sept8 controls the binding of vesicle-associated membrane protein 2 to synaptophysin. *J. Neurochem.* 108: 867-880.
- ② Ito H, Atsuzawa K, Sudo K, Di Stefano P, Iwamoto I, Morishita R, Takei S, Semba R, Defilippi P, Asano T, Usuda N, Nagata KI. (2008) Characterization of a multi-domain adaptor protein, p140Cap, as part of a presynaptic complex. *J Neurochem.* 107: 61-72.
- ③ Mizutani K, Nagata KI, Ito H, Ehara H, Nozawa Y, Deguchi, T. (2007) Possible Roles of Vinexin β in Growth and Paclitaxel Sensitivity in Human Prostate Cancer PC-3 Cells. *Cancer Biol. Therapy.* 6: 1800-1804.
- ④ Banu S, Ichihara S, Huang F, Ito H, Inaguma Y, Furuhashi K, Fukunaga Y, Wang Q, Kitoh J, Ando H, Kikkawa F, Ichihara G. (2007) Reversibility of the adverse effects of 1-bromopropane exposure in rats. *Toxicol Sci.* 100: 504-512.
- ⑤ Mizutani K, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Deguchi T, Nozawa Y, Asano T, Nagata KI. (2007) Essential roles of ERK-mediated phosphorylation of vinexin in cell spreading, migration and anchorage-independent growth. *Oncogene.* 26:7122-7131
- ⑥ Morishita R, Ueda H, Ito H, Tasaki J, Nagata KI, Asano T. (2007) Involvement of Gq/11 in both integrin signal-dependent and -independent pathways regulating endothelin-induced neural

progenitor proliferation. *Neurosci Res.* 59: 205-214.

- ⑦ Sudo K, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Asano T, Nagata KI. (2007) Sept9 sequence alterations causing hereditary neuralgic amyotrophy are associated with altered interactions with Sept4/11 and resistance to Rho/Rhotekin-signaling. *Hum Mut.* 28:1005-1013.
- ⑧ Hara A, Taguchi A, Niwa M, Aoki H, Yamada Y, Ito H, Nagata KI, Kunisada T, Mori H. (2007) Localization of septin 8 in murine retina, and spatiotemporal expression of septin 8 in a murine model of photoreceptor cell degeneration. *Neurosci Lett.* 423: 205-210.
- ⑨ Morishita R, Nagata KI, Ito H, Ueda H, Asano M, Shinohara H, Kato K, Asano T. (2007) Expression of smooth muscle cell-specific proteins in neural progenitor cells induced by agonists of G protein-coupled receptors and transforming growth factor-beta. *J Neurochem.* 101: 1031-1040.

[学会発表] (計15件)

- ① 伊東秀記, 森下理香, 須藤香織, 岩本郁子, 篠田友靖, 岡本賢一, 永田浩一. Biochemical and histological analyses of dysbindin-1 in rat brain. 米国細胞生物学会(サンフランシスコ)2008. 12. 16.
- ② 永田浩一, 伊東秀記, 厚沢季美江, 須藤香織, Paola Di Stefano, 岩本郁子, Paola Defilippi, 森下理香, 武井史郎, 仙波禮治, 浅野富子, 臼田信光. Possible role in neurotransmitter release and signaling of a multi-domain adaptor protein, p140Cap, at the presynapse. 米国細胞生物学会(サンフランシスコ)2008. 12. 16.
- ③ 伊東秀記, 森下理香, 須藤香織, 岩本郁子, 篠田友靖, 岡本賢一, 永田浩一. Biochemical and cell biological analysis of dysbindin-1 in rat brain. 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会(神戸)2008. 12. 10.
- ④ 篠田友靖, 伊東秀記, 梶田和男, 須藤香織, 岩本郁子, 森下理香, 岡本賢一, 永田浩一. Possible function of a multi-domain adaptor protein, p140Cap, in exocytosis. 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会(神戸)2008. 12. 10.
- ⑤ 篠田友靖, 伊東秀記, 須藤香織, 岡本賢一, 岩本郁子, 森下理香, 永田浩一. Sept14

の皮質神経細胞局在化における機能. 日本神経化学会大会(富山)2008. 9. 12.

- ⑥ 永田浩一, 伊東秀記, 武井史郎, 須藤香織, 岩本郁子, 森下理香, 浅野富子, 仙波禮治. マルチドメイン・アダプター蛋白質 p140Cap のプレシナプスにおける機能. 日本神経化学会大会(富山)2008. 9. 12.
- ⑦ 伊東秀記, 森下理香, 須藤香織, 岩本郁子, 篠田友靖, 岡本賢一, 永田浩一. Biochemical and histological analysis of MAGI-1 in rat brain. 日本神経化学会大会(富山)2008. 9. 11.
- ⑧ 伊東秀記, 武井史郎, 須藤香織, 岩本郁子, 森下理香, 浅野富子, 仙波禮治, 永田浩一. マルチドメイン・アダプター蛋白質 p140Cap のシナプスにおける性状解析. 日本生化学会中部支部会例会(岐阜)2008. 5. 24.
- ⑨ 須藤香織, 伊東秀記, 岩本郁子, 森下理香, 永田浩一. Rhotekin 結合タンパク質 Lin-7B の性状解析. 日本生化学会大会(横浜)2007. 12. 13.
- ⑩ 永田浩一, 水谷晃輔, 伊東秀記, 岩本郁子, 森下理香, 出口隆, 野澤義則, 浅野富子. ERK-MAP キナーゼによるピネキシンのリン酸化は細胞接着・運動および足場非依存的な細胞増殖に必須の役割を果たす. 日本生化学会大会(横浜)2007. 12. 12.
- ⑪ 伊東秀記, 森下理香, 岩本郁子, 須藤香織, 浅野富子, 永田浩一. Sept8 によるシナプトブレビン/シナプトフィシン複合体形成の抑制. 日本生化学会大会(横浜)2007. 12. 11.
- ⑫ 永田浩一, 水谷晃輔, 伊東秀記, 岩本郁子, 森下理香, 出口隆, 野澤義則, 浅野富子. Essential roles of ERK-mediated phosphorylation of vinexin in cell spreading, migration and anchorage-independent growth. 米国細胞生物学会(ワシントン)2007. 12. 3.
- ⑬ 伊東秀記, 岩本郁子, 須藤香織, 森下理香, 浅野富子, 永田浩一. 脳において生後発達期に増加する Sept8 と VAMP2 の結合の解析. 日本神経科学・神経化学・神経回路学合同大会(横浜)2007. 9. 11.
- ⑭ 永田浩一, 伊東秀記, 須藤香織, 岩本郁子, 森下理香, 浅野富子. 細胞骨格関連分子 Septin12 の生化学・細胞生物学的性状解析. 日本神経科学・神経化学・神経回路学合同大会(横浜)2007. 9. 11.
- ⑮ 須藤香織, 伊東秀記, 岩本郁子, 森下理香, 浅野富子, 永田浩一. 遺伝性神経痛性筋萎縮症を引き起こす Sept9 の点変異は Sept4 と Sept11 の相互作用を変化させ、Rho/Rhotekin シグナル伝達を妨害する. 日本神経科学・神経化学・神経回路学合同大会(横浜)2007. 9. 11.

[その他]
ホームページ等
<http://www.inst-hsc.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊東 秀記 (ITO HIDENORI)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究
所・神経制御学部・主任研究員
研究者番号：40311443

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし