

平成21年 4月 1日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790148

研究課題名（和文） Ras類似低分子量GTP結合タンパク質Rigの分子機能

研究課題名（英文） Molecular mechanism of Ras-like small GTPase protein Rig.

研究代表者

星野 光伸 (HOSHINO MITSUNOBU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60431962

研究成果の概要：本研究課題は、脳をはじめとする神経系に顕著に発現しているが、その機能は未知である Ras 類似低分子量 GTP 結合タンパク質 Rig を扱うもので、神経細胞に於いて Rig がどのような生理機能を担っているのかを探索することを目的とする。本研究では、Rig を培養細胞内に発現させると粒状の Rig 陽性構造物が免疫染色により検出され、その局在は細胞内に取り込ませたトランスフェリンと一致した。つまり、Rig がリサイクリング系の膜輸送に関与する分子であることが示唆された。又、海馬神経初代培養細胞を用いた実験から、Rig は神経細胞の形態変化に関与している実験結果を得た。Rig の変異体を発現させると神経細胞の突起や極性分化に異常を来すことも見出した。これらの研究成果から、Rig が膜輸送や神経突起の形態形成、分化、そして極性決定の局面で重要な機能を担っていることが明らかになった。

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	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：神経生物学、細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学 解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：神経系、Ras、低分子量 GTP 結合タンパク質、Rig、膜輸送、細胞微細形態学、神経細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

本研究では、脳をはじめとする神経系に顕著に発現している、Ras 類似低分子量 GTP 結合タンパク質 Rig をテーマとするもので、神経細胞に於ける Rig の生理機能、即ち神経細胞のメンブレントラフィック及び細胞骨格動態と Rig との関わりに付いて探索することを目的とする。Rig は発現量が少ないこともあり、機能解析がほとんど進んでいな

い状況にあった。開始当初に於いて国内外を含めて僅かながら知られていた知見は以下の3点に集約される。

- (1) 神経系組織と心臓に特異的な発現が認められ、Ras 同様にカルボキシル末端側に脂質の修飾を受けるという特性を有する (*Proceedings of National Academy of Science, USA. 99 (15) 9876 ~ 9881 (2002)*)。

(2) Ras とは異なり、Raf-MAP キナーゼカスケードを活性化しない。結果として、Ras に拮抗して細胞増殖を負に制御する活性を有する (*Proceedings of National Academy of Science, USA.* **99** (15) 9876 ~ 9881 (2002))。

(3) 培養細胞に過剰発現させると細胞内に巨大な空胞を形成する活性を有する (*Journal of Biological Chemistry* **277** (43) 41070 ~ 41078 (2002))。

これらの3点の知見は示唆的ではあるが Rig の細胞内機能の一部を解明したに過ぎず、神経系に於ける Rig の高次生理機能への関与を解明するには至っていなかった。これらの初期的な報告以降、Rig の新しい知見は現在までに一切報告されておらず、Rig の機能解析は全く進んでいない状況にあった。

研究代表者は現在までに Rig とは別の神経特異的低分子量 GTP 結合タンパク質である Rin の機能解析に従事して来た。これまで Rin による神経突起形成の分子機構と、その神経細胞内での生理機能を解明する種々の実績を上げて来ており、国内外で一定の評価を受けている (*Biochemical and Biophysical Research Communications* **295** (3) 651 ~ 656 (2002)、*Journal of Cell Biology* **163** (5) 1067 ~ 1076 (2003)、*Journal of Biological Chemistry* **280** (24) 22868 ~ 22874 (2005))。この経験を踏まえ、Rig の細胞内機能を解明する為の予備実験を行い、Rig が細胞膜を介した物質の輸送系、いわゆるメンブレントラフィックを調節し、細胞骨格の動態や細胞運動に直接影響を与えている可能性を示唆する知見を得た。神経細胞は代謝活性の高い細胞で、細胞膜を介した物質の輸送も活発である。又、発生過程で長距離にわたる細胞移動を行い、特徴ある形態を維持する上で細胞骨格系も重要である。Rig がこれらの神経系の生理機能にどう関与しているかを解明したいと考えた。

2. 研究の目的

研究代表者は本研究開始までに、Rig を培養細胞内に過剰発現させると粒状の Rig 陽性構造物を形成することを予備実験により見出していた。その局在のパターンから、Rig が何らかの膜輸送に関与する因子の候補ではないかと推論するに至った。

本研究では2年間の期間中に、Rig がどういった膜輸送系に関与している因子なのかをまず突き止めることにした。次いで、Rig の膜輸送に与える影響を解析し、Rig による細胞膜を介した物質輸送の分子機構を分子生物学的、生化学的、及び形態学的に解明することを主な目的とした。又、Rig が膜輸送の局面で細胞骨格系と局在を一にするか、もし共局在するとすれば、細胞骨格系を介した

細胞運動の場面、及び細胞極性を決定する場面で Rig がどう関与しているかについても解析を行うことを目的とした。

上述の Rig を切り口にした本研究を推進することで、神経細胞内での物質輸送という大きな問題の解明に端緒を与えるのみならず、膜輸送の生体内での重要性を開拓する可能性をも秘めており、その意義と重要性はきわめて大きいと考えられた。

神経細胞は顕著な細胞極性と活発な代謝活性、発生過程に於けるダイナミックな細胞移動など、本研究で対象とする膜輸送、物質輸送の機能が遺憾なく発揮される細胞である。本研究を推進することで、得られた知見がより高次の神経機能や現象の解明に繋がり、脳神経科学の進展に資する展望も開けるものと考えられた。

3. 研究の方法

(1) Rig の細胞内での局在の免疫細胞化学的検討

培養細胞に Rig 遺伝子を過剰発現させると、核近傍に粒状に局在が観察された。Rig は膜性の細胞内小器官と局在を一にしている可能性を示唆されたので、この小器官の実態を各種免疫化学的手法を使って突き止める。又、小器官に特異的な分子マーカー、具体的には Rab ファミリー分子に対する抗体を用いた免疫染色の手法を用いても明らかにする。Rig がこの Rab ファミリー分子と結合し得るものなのか、結合するとすればそれは直接的に結合するものなのか間接的なものなのか、更にその結合は GTP 依存的なものであるのかに付いても生化学的、細胞生物学的に検討を加える。

(2) Rig の細胞内小器官に於ける機能相関の検討

次に、Rig を細胞内に過剰発現した時に、その局在を一にする細胞内小器官の司る細胞膜輸送に影響が現れるかどうかについて経時的に検討する。Rig の野性型タンパク質を過剰発現した時のみでなく、その優性抑制変異体や恒常的活性型変異体を過剰発現した場合ではどうかについても検討する。

(3) Rig と細胞骨格系との機能相関の検討

膜輸送系と細胞移動や細胞運動との関係を伺わせる知見も知られている。又、細胞運動には細胞骨格系の再編成が必要であることも広く受け入れられている。神経細胞に於けるこれらの重要性は自明なので、Rig が細胞骨格系と局在を一にするかどうかについても細胞生物学的に検討を加えたい。

(4) Rig と細胞極性との相関の検討

Rig が極性を持つ膜系輸送を介して細胞極性の決定に影響を与えるかどうかについて検討を加える。神経細胞は顕著な細胞極性を有する細胞であるので、マウス海馬初代培

養神経細胞系を材料に、神経細胞内で Rig を過剰発現した時にその極性決定がどのような影響を受けるものかを細胞生物学的に検討する。

4. 研究成果

(1) Rig の細胞内での局在の免疫細胞化学的検討

Rig を培養細胞内に過剰発現させると粒状の Rig 陽性構造物が検出されたが、この構造物は細胞内に取り込ませたトランスフェリン分子と局在を一にした。これは、Rig が細胞膜を介した輸送系、中でも物質のリサイクリングに関与する何らかの機能を有した因子であることを示唆するものであった。リサイクリング系の膜輸送のマーカー分子としては、低分子量 GTP 結合タンパク質である Rab11 が広く知られている。免疫染色の手法を用いて解析したところ、Rig は Rab11 と良く局在が一致した。又、生化学的手法による解析の結果、両者が *in vitro* で結合することも示された。更に、Rig や Rab11 の優性抑制変異体や恒常的活性型変異体を用いた解析により、両者の局在の一致、及び両者の結合には GTP 依存性は見出されなかった。更に、膜に局在しない Rig のカルボキシル末端の変異体を培養細胞に発現させたところ、リサイクリング輸送を反映する粒状の構造物は見出されなかった。以上の実験事実から、Rig は GTP 結合型の時も GDP 結合型の時も、どちらも恒常的にリサイクリングエンドソームに局在していて、その局在は Rig のカルボキシル末端側の脂質修飾配列に依存することが明らかになった。

(2) Rig の細胞内小器官に於ける機能関連の検討

Rig の野性型、及び優性抑制変異体やカルボキシル末端の変異体を培養細胞に過剰発現させ、リサイクリングの過程に異常が生じるかどうかについて検討した。その結果、野性型を発現させた場合でも、各種変異体が発現させた場合でもトランスフェリンの細胞内への取り込みに異常は見られなかった。又、一旦取り込んだトランスフェリンが細胞外へと輸送される過程への影響を観察したところ、優性抑制変異体で細胞外への輸送が早まる傾向を認めた。以上の実験事実から、Rig はリサイクリングエンドソーム上でリサイクリングの過程を制御する因子であることが明らかになった。

(3) Rig と細胞骨格系との機能関連の検討

Rig がリサイクリングエンドソーム上で細胞骨格系と局在を一にするかどうかを検討すべく、Rig の野性型を過剰発現した培養細胞をローダミン・ファロイジン染色したところ、リサイクリングエンドソーム上で Rig とアクチン系細胞骨格は極めて近傍に位置

することを見出した。

(4) Rig と細胞極性との関連の検討

Rig が細胞の極性決定に関与しているかどうかを検討する目的で、極性の顕著なマウス海馬由来初代培養神経細胞に Rig 遺伝子を強制発現させた。その結果、Rig の変異体を過剰発現させることで神経細胞の突起の分枝が対照群に比べて有意に減少することを見出した。特にこの形態変化は樹状突起の形状に於いて明らかであった。Rig が神経細胞で発現が顕著であることを考慮すれば、この実験結果は Rig が神経細胞の形態形成に重要な役割を担っている可能性が推論される。

又、Rig 遺伝子の変異体を神経細胞に強制発現させると、極性分化に異常を生じることを見出した。Rig 遺伝子産物の変異体が過剰に存在することにより、神経細胞で当然見られるべき正常な極性分化の制御機構が阻害されたものと考えられ、Rig が神経細胞の分化や極性決定に深く関与していることを強く示唆するデータであると考えられる。

以上、(1)~(4) を総合すると、Rig が神経細胞に於いてリサイクリング系膜輸送、神経突起の形態形成、そして分化、極性決定の局面に於いて重要な役割を果たしている可能性が極めて高いと考えられる。これは世界に先駆けて見出された知見であり、Rig が神経細胞の活動を反映した、未知の形態変化や分化のプログラムを調節している可能性を今後検討して行くことは、神経細胞生物学的にも大変興味深い課題であると考えられ、今後追求して行きたいと考えている。

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)

[学会発表] (計 3 件)

① 星野光伸、山添紗有美、上杉志成、寺田純雄

「マウス海馬神経細胞の初代培養用基質としての適性を備えた新規有機化合物 adhesamine」

2009年3月30日、岡山県岡山市

② Mitsunobu Hoshino, Sayumi Yamazoe, Motonari Uesugi, Sumio Terada

“Adhesamine, a newly synthesized chemical compound, is a very useful substrate for culturing mouse primary-cultured hippocampal neurons.”

第 48 回米国細胞生物学会年会

2008年12月14日、米国カリフォルニア州サンフランシスコ

③星野光伸、山添紗有美、上杉志成、寺田純雄

「新規有機化合物 adhesamine はマウス海馬神経細胞の初代培養用基質として有用である」

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12日、兵庫県神戸市

6. 研究組織

(1)研究代表者

星野 光伸 (HOSHINO MITSUNOBU)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60431962

(2)研究協力者

寺田 純雄 (TERADA SUMIO)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00262022

川岸 将彦 (KAWAGISHI MASAHIKO)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60323606