

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590311

研究課題名(和文) 新規シグナル伝達系 Rap2-MAP4K 系の神経系新規標的分子

研究課題名(英文) Novel neural targets of the Rap2-MAP4K signaling

研究代表者

苅谷 研一 (KARIYA KEN-ICHI)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40263371

研究成果の概要(和文)：私共は Rap2 による HGK、TNIK の活性化 (Rap2-MAP4K 系) を見出したが、シナプス長期抑制機構として神経でも追試された。本研究では、この系の第三の MAP4K として MINK を、そのリン酸化標的分子としてシナプス後肥厚部 (PSD) 蛋白 TANC1 を同定した。一方、LTP では受容体はリサイクリング小胞 (RE) から PSD へ動員されるが、Rap2 は RE に局在した。さらに、Rap2 のユビキチン化による Rap2-MAP4K 系の制御も見出している。

研究成果の概要(英文)：We found previously that small G protein Rap2 activates MAP4Ks (NIK and TNIK) placed upstream of JNK. This Rap2-MAP4K system was confirmed by others in neurons and used to explain LTD. In this study, we identified the third MAP4K (MINK) for this system and its phosphorylation target, a PSD protein TANC1. We have also shown that Rap2 localizes to the recycling endosome, the source of glutamate receptors mobilized during LTP. In addition, a mechanism for regulation of neural Rap2-MAP4K system by Rap2 ubiquitination has been revealed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：MAP4K、Rap2、神経系

1. 研究開始当初の背景

(1) 新規シグナル伝達系 Rap2-MAP4K 系

神経シナプスの形成や可塑性の分子機構の解明は、認知障害、精神神経疾患等の病態の解明や治療法の開発につながる。

一方、Ras サブファミリーに属する低分子量 GTP 結合蛋白質 Rap2 は、そのエフェクター結合領域のアミノ酸配列が Ras や Rap1 と異なり、その機能は不明であった。私共はこのアミノ酸配列の違いを認識して Rap2 に特

異的に結合する新規エフェクターを探索し、NIK/HGK/MAP4K4 および TNIK が Ras や Rap1 に結合せず Rap2 へのみ特異的に結合し活性化されることを明らかにした (Machida *et al.*, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 as a putative effector of Rap2 to activate the c-Jun N-terminal kinase *J Biol Chem* 279, 15711-4, 2004; Taira *et al.*, The Traf2- and Nck-interacting kinase as a putative effector

of Rap2 to regulate actin cytoskeleton, *J Biol Chem* 279, 49488-96, 2004)。

NIK/HGK/MAP4K4 や TNIK は、ストレス応答性 MAP キナーゼ c-Jun N-terminal kinase (JNK) の上流で機能する STE20 グループ MAP kinase kinase kinase kinase (MAP4K) 群に属する。Rap2 とこの MAP4K を介する新規シグナル伝達系 (Rap2-MAP4K 系) は海馬神経細胞でも追試され海馬グルタミン酸作動性シナプス活動の減弱機構とされた。さらに、この追試結果が私共の知見を強く支持する証左として、著者らは過去に Ras や Rap1 による同シナプス活動の制御が JNK とは異なる MAP キナーゼを介することを報告していた (Zhu *et al.*, Rap2-JNK removes synaptic AMPA receptors during depotentiation, *Neuron* 46, 905-16, 2005; Zhu, *et al.*, Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110, 443-55, 2002)。

これを皮切りに、神経シナプスの形態や活動の可塑性の制御において Rap2 が Ras や Rap1 と異なる固有の役割を演じるとの報告が相次いでなされたが、MAP4K の下流の具体的な分子機構は解析されていなかった (Fu *et al.*, Differential roles of Rap1 and Rap2 small GTPases in neurite retraction and synapse elimination in hippocampal spiny neurons. *J Neurochem* 100, 118-31, 2007; Richter *et al.*, The EphA4 receptor regulates neuronal morphology through SPAR-mediated inactivation of Rap GTPases. *J Neurosci* 27, 14205-15, 2007)。

(2) Rap2 と神経伝達物質受容体の局在

前述の Rap2 による海馬グルタミン酸作動性シナプス活動の減弱はシナプス後肥厚部 (PSD) に局在するグルタミン酸受容体数の減少に起因していた (上記 Zhu *et al.*, 2005)。Ras による長期増強 (いわゆる LTP) も受容体の PSD への動員に起因していた (上記 Zhu *et al.*, 2002)。しかし、受容体の PSD からの減少や増加に寄与する輸送機構は完全には理解されていなかった。

2. 研究の目的

(1) Rap2-MAP4K 系によるシナプス制御に関連する新規標的分子の探索

私共は、Rap2-MAP4K 系がアクチン細胞骨格の再編成などにおいて JNK 経路とは独立した下流シグナル経路を制御することを既に報告しており (上記 Taira *et al.*, 2004)、JNK 経路以外の経路が関わりと想定することで神経シナプスにおける Rap2 の多彩な機能を説明できると考えた。そこで本研究では、神経系における Rap2-MAP4K 系の JNK 非依存的経路の解明の端緒として、同系の新規標的分子

の探索と解析を目的とした。

(2) シナプス制御における Rap2-MAP4K 系の機能的局在についての検討

Rap2 が核の近傍に集積することは従来から知られており、私共も同様の局在を報告してきたが (上記 Machida *et al.*, 2004; Taira *et al.*, 2004)、Rap2 の細胞内局在について詳細に検討されたことは無い。前述のように Rap2 が受容体の輸送調節機能を介して神経シナプスの形態や活動を制御するとすれば、Rap2 の局在を明らかにすることで輸送調節機能との関係が理解できる可能性がある。そこで、本研究では Rap2 の細胞内局在、その局在機構、さらに機能との関係を検討した。

3. 研究の方法

(1) Rap2-MAP4K 系新規結合蛋白質の探索

TNIK は N 末端と C 末端にそれぞれキナーゼドメインと制御ドメインを持ち、後者に Rap2 が結合する。両ドメインに挟まれた中間ドメインにはアダプター分子である Traf や Nck が結合するが、これらは下流分子とは考えにくい。そこで、TNIK 分子全長をカバーする複数の断片をリガンドとしてアフィニティークラムを作成し、ラット脳から結合蛋白質を精製して質量分析により同定した。同定した蛋白質については、逆にその各種断片を用いてプルダウンアッセイを行い、ラット脳 TNIK がプルダウンされることを確認した。また、同定した蛋白質の断片を大腸菌で発現・精製してウサギを免疫し、抗血清をアフィニティー精製してポリクローナル抗体を得た。結合蛋白質のリン酸化は、HEK293T 細胞で Rap2、MAP4K と共発現させた際の SDS-PAGE における mobility shift としてウエスタン法で検出し、phosphatase 処理による mobility shift の消失を確認した。

一方、Rap2 をリガンドとしたアフィニティークラムで TNIK に分子量の近い別の蛋白質バンドを見出し、質量分析により TNIK に類似したドメイン構造を持つ第三の Rap2 結合 MAP4K と同定した。Rap2 との結合特異性は酵母 Two-Hybrid 法により確認した。また、この第三の Rap2 結合 MAP4K と TNIK についてアミノ酸配列相同性の低い領域を抗原とし、上記と同様にアフィニティー精製ポリクローナル抗体を得て組織分布を比較した。

(2) Rap2 の局在と脂質修飾

Rap2A、Rap2B、Rap2C とその C 末端脂質修飾欠損変異体は CAAX モチーフに含まれるシステイン (C180) あるいは、同モチーフ上流の 2 つの連続システイン (C176/177) をアミノ酸置換して作成した。脂質修飾/非修飾 Rap2 の疎水性は Triton X-114 分画法で検討した。野生型および各種変異型 Rap2 の細胞内局在

は、共焦点レーザー顕微鏡でや各種局在マーカーとの位置関係から解析した。Rap2の局在変化による Rap2-MAP4K 系の機能的変化は、活性化 TNIK の細胞伸展阻害作用を指標に評価した。

4. 研究成果

(1) Rap2-MAP4K 系によるシナプス制御に関連する新規標的分子の探索

質量分析により、第三の Rap2 結合 MAP4K は NIK/HGK/MAP4K4 や TNIK と同じ STE20 グループに属する MINK であることが判明した(主な発表論文等: Nonaka *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 377, 573-8, 2008)。また、ウエスタン解析の結果、TNIK と同様に MINK の主要発現臓器は脳であった。また、酵母 Two-Hybrid 法解析では、MINK の制御ドメインは Rap2 とは結合するものの Rap1 や Ras とは結合しなかった。

一方、TNIK と MINK の制御ドメインと中間ドメインにまたがり極めてアミノ酸相同性の高い領域があるが、この部分を含む TNIK 断片アフィニティーカラムに結合する蛋白質が PSD 蛋白質の TANC1 であった。この TANC1 をリガンドとしたプルダウンアッセイでは、予想通り TNIK と MINK の両方がラット脳からプルダウンされることを、自作抗体を用いたウエスタン解析により確認した。

また、TANC1 の cDNA はラット由来の断片しかクローン化されていなかったため、全長ヒト TANC1 cDNA をクローン化して HEK293T 細胞に TNIK あるいは MINK とともに共発現したところ、TANC1 は TNIK、MINK のいずれによってもリン酸化され、加えて Rap2 を共発現するとリン酸化はさらに増強された。

これらの結果は、MINK が NIK/HGK/MAP4K4 および TNIK に加えて第三の哺乳動物 Rap2 エフェクターであること、TANC1 は神経系における Rap2-MAP4K 系の新たなリン酸化標的分子であることを示している。

実際、PSD にはプロテオミクス解析により、Rap2 の活性化制御因子(RA-GEF-1/PDZ-GEF1/nRapGEP/CNras-GEF)、不活化制御因子(SPAR/E6TP1/SIPAL1)、Rap2 自体、TNIK、MINK、TANC1 の全てが PSD に存在することが報告されており、Rap2-MAP4K 系による TANC1 のリン酸化がシナプス活動依存性に調節されている可能性と矛盾しない (Collins *et al.*, Molecular characterization, comparison of the components, multiprotein complexes in the postsynaptic proteome, *J Neurochem* 97 (Suppl. 1) 16-23, 2006)。

後に TANC1 のノックアウトマウスを作成したグループは TANC1 が海馬神経シナプスの形成と活動、空間記憶の形成を正に制御することを見出し、Rap2-MAP4K 系による TANC1 のリン酸化が TANC1 の機能に対して抑制的に作用

すると議論している (Han *et al.*, Regulation of dendritic spines, spatial memory, and embryonic development by the TANC family of PSD-95-interacting proteins. *J Neurosci*, 30, 15102-12, 2010)。

(2) Rap2 の局在と脂質修飾

Rap2 には Rap2A、Rap2B、Rap2C の 3 種類があるが、これらがそれぞれどのような細胞内部位に局在するかについて言及した報告は過去に Rap2A についての 1 報しかない。ゴルジ体膜とされているが、通常の細胞ではゴルジ体が局在する核近傍には他にも複数の膜系が複雑に入り組んでおり、説得力に欠ける (Pizon *et al.*, Association of Rap1a and Rap1b proteins with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2a with the Golgi complex. *J Cell Sci* 107, 1661-70, 1994)。

一方、最近ある種の Cos-1 細胞株ではゴルジ体が環状構造をとり、その中央にリサイクリング小胞 (RE) が集積することが見出された (Misaki *et al.*, Spatial segregation of degradation- and recycling-trafficking pathways in COS-1 cells, *Biochem Biophys Res Commun* 360, 580-5, 2007)。

野生型および各種変異型 Rap2 の Cos-1 細胞内の局在を比較した結果、Rap2 が TNIK を介して細胞形態を制御するためには RE に局在して TNIK を RE にリクルートする必要があること、従って RE がシグナルを発する小胞であることが初めて明らかになった(主な発表論文等: Uechi *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 377, 573-8, 2009)。

この Rap2 の RE 局在と機能発揮に関連して、PSD におけるグルタミン酸受容体の増減が Ras および Rap2 による受容体の PSD/RE 局在比の増減の反映であることが報告されており、Rap2 による海馬グルタミン酸作動性シナプス活動の減弱との機能的関連を検討してゆきたいと考えている (Kielland *et al.*, Activity patterns govern synapse-specific AMPA receptor trafficking between deliverable and synaptic pools. *Neuron* 62, 84-101, 2009)。

(3) その他

ユビキチンリガーゼ Nedd4-1 は TNIK に結合し、それを足場として Rap2 をユビキチン化し不活化する。Nedd4-1 欠損マウスで野生型よりシナプス形成等が抑制される結果は、上述のように Rap2-MAP4K が受容体の PSD 動員やシナプス形成を負に制御する事実と矛盾しなかった。一方、TNIK を RNAi 法でノックダウンすると Nedd4-1 は足場を失って Rap2 は不活化されないとはいえ、MAP4K の TNIK なしでシナプス形成等が抑制された。この現象

は上記 MINK の Rap2 エフェクターとしての同定により初めて説明可能となった（主な発表論文等：Kawabe *et al.*, 2010）。

なお、病態との関連においては、Rap2 活性化制御分子 PDZ-GEF2/RA-GEF2/RAPGEF6 をはじめ Rap2 結合分子 RPIP8、TNIK、TNIK に結合する Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) 蛋白等の全てが統合失調症との関係を指摘されていることから、Rap2-MAP4K 系の解析により精神疾患の病態理解に資する知見が得られる可能性は高いと考えている (Xu *et al.*, Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nat Genet* 40, 880-5, 2008; *Mol Brain Res* 139, 317-32, 2005; Shi *et al.*, Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature* 460, 753-7, 2009; Chubb *et al.*, The DISC locus in psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 13, 36-64, 2008)。

最後に、Rap2-MAP4K シグナル伝達系に関与する蛋白質の遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスの作成も進めており、詳細な解析を予定している。ノックアウトマウスの個体、細胞レベルでの表現型解析により Rap2-MAP4K 系の神経系新規標的分子とその制御の解明が期待される。

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)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Kawabe, H., Neeb, A., Dimova, K., Young, S.M. Jr., Takeda, M., Katsurabayashi, S., Mitkovski, M., Malakhova, O. A., Zhang, D. E., Umikawa, M., Kariya, K., Goebbels, S., Nave, K. A., Rosenmund, C., Jahn, O., Rhee, J., Brose, N., Regulation of Rap2A by the ubiquitin ligase Nedd4-1 controls neurite development., *Neuron.*, 査読有, 65, 2010, 358-372.
- ② Yamashiro, Y., Takei, K., Umikawa, M., Asato, T., Oshiro, M., Uechi, Y., Ishikawa, T., Taira, K., Uezato, H., Kariya, K., Ectopic coexpression of keratin 8 and 18 promotes invasion of transformed keratinocytes and is induced in patients with cutaneous squamous cell carcinoma., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 399, 2010, 365-372.
- ③ Ferdousi, J., Nagai, Y., Asato, T., Hirakawa, M., Inamine, M., Kudaka, W., Kariya, K., Aoki, Y., Impact of human papillomavirus genotype on response to treatment and survival in patients

receiving radiotherapy for squamous cell carcinoma of the cervix., *Exp. Therap. Med.*, 査読有, 1, 2010, 525-530.

- ④ Hiatt, S. M., Duren, H. M., Shyu, Y. J., Ellis, R. E., Hisamoto, N., Matsumoto, K., Kariya, K., Kerppola, T. K., Hu, C. D., *Caenorhabditis elegans* FOS-1 and JUN-1 regulate plc-1 expression in the spermatheca to control ovulation., *Mol. Biol. Cell.*, 査読有, 20 2009, 3888-3895.
- ⑤ Uechi, Y., Bayarjargal, M., Umikawa, M., Oshiro, M., Takei, K., Yamashiro, Y., Asato, T., Endo, S., Misaki, R., Taguchi, T., Kariya, K., Rap2 function requires palmitoylation and recycling endosome localization., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 378, 2009, 732-737.
- ⑥ Nonaka, H., Takei, K., Umikawa, M., Oshiro, M., Kuninaka, K., Bayarjargal, M., Asato, T., Yamashiro, Y., Uechi, Y., Endo, S., Suzuki, T., Kariya, K., MINK is a Rap2 effector for phosphorylation of the postsynaptic scaffold protein TAN1., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 377, 2008, 573-578.
- ⑦ Miyara, N., Shinzato, M., Yamashiro, Y., Iwamatsu, A., Kariya, K., Sawaguchi, S., Proteomic analysis of rat retina in a steroid-induced ocular hypertension model: potential vulnerability to oxidative stress., *Jpn. J. Ophthalmol.*, 査読有, 52, 2008, 84-90.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Yoshito Yamashiro (代表発表者), Kimiko Takei, Masato Umikawa, Tsuyoshi Asato, Kiyohito Taira, Hiroshi Uezato, and Ken-ichi Kariya, The proteomic search for prognosis markers of cutaneous squamous cell carcinoma.: MBSJ2009(第 32 回日本分子生物学会年会) プログラム: 3P-0743: 418, 2009 年 12 月 11 日: パシフィコ横浜
- ② Maitsetseg Bayarjargal (代表発表者), Yukiko Uechi, Shogo Endo, Kimiko Nonaka-Takei, Minoru Oshiro, Masato Umikawa, Tsuyoshi Asato, Yoshito Yamashiro, Tomohiko Taguchi, and Ken-ichi Kariya, Localization of Rap2 in recycling endosome in a palmitoylation-dependent manner.: *Biochemistry Molecular Biology (BMB)* 2008(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) プログラム: 1P-0444: 219, 2008 年 12 月 9 日: 神戸国際展示場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

苅谷 研一 (KARIYA KEN-ICHI)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40263371

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：