

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700289
 研究課題名（和文） 大脳皮質形成における Rac1 および Rac3 のシグナル伝達経路とその機能分担の解析
 研究課題名（英文） Functional analysis of small G protein Rac1 and Rac3 signalings during corticogenesis
 研究代表者
 葛西 秀俊 (KASSAI HIDETOSHI)
 東京大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：40403232

研究成果の概要（和文）：

アミノ酸配列の相同性が極めて高い Rac1 と Rac3 を区別して解析するために、エピトープタグを Rac3 に付加したノックインマウスの作製を行った。このマウスを用いて、発達期の脳における Rac1 および Rac3 の発現パターンを解析し、Rac3 が発達期の脳において一過的な発現パターンを示すことを明らかにすることができた。また、Rac3 の相互作用因子をプロテオミクス手法を用いて網羅的に解析した。その結果、活性化型 Rac3 特異的に結合し、精神遅滞の原因として知られているタンパク質を同定することができた。

研究成果の概要（英文）：

Rac1 and Rac3 are highly homologous proteins, and it has been quite difficult to analyze their functions separately. Here I generated the knock-in mice, in which express epitope-tagged Rac3 so that Rac1 and Rac3 are easily distinguished at the protein level. By using these knock-in mice, expression patterns of Rac1 and Rac3 are traced in the developing brains. Also, proteomic analysis of Rac3 complex was performed to clarify Rac3 signaling in the brain. I identified several proteins which specifically associate with activated Rac3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学

1. 研究開始当初の背景

Racは低分子量Gタンパク質Rhoファミリーに属し、細胞内シグナリングの分子スイッチとして機能する。Racシグナリングは、アクチン細胞骨格の制御系の中心に位置することから、中枢神経系においてRacは神経細胞の移動・軸索ガイダンス・スパイン形成といった神経系の形態・回路形成やシナプス可塑性に関わっていると考えられる。実際、申請者の所属する研究室において、大脳皮質・海馬においてRac1を欠損したマウスが作出されており、このマウスは大脳皮質および海馬の細胞構築が著しく乱れると同時に、大脳皮質の左右を連絡する交連線維が完全に欠損していた。しかし、Racを介したシグナル伝達経路は上流分子・下流分子ともに複雑多岐に渡る上に、他の情報伝達経路とのクロストークが数多く存在することが知られている。このため、Rac1の欠損による細胞構築の乱れや交連線維の欠損が、どのようなRacシグナリングによって引き起こされたのかを明らかにすることは容易ではない。

さらに、中枢神経系においては、非常に相同性の高い2種類のRacサブタイプ(Rac1・Rac3)が発現していることが知られており、神経発生において互いに異なる役割を担っていることが推測される。この推測は、Rac3が進化の過程における選択圧によって淘汰されておらず、さらに、Rac1とRac3のmRNAの発現パターンが魚類から哺乳類にいたるまで進化的によく保存されていることから支持される。

以上のことから、Rac1およびRac3のシグナル伝達経路を明らかにすることは、中枢神経系の発生過程の分子基盤の解明に繋がると期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、脳形成をモデルとして、Rac1とRac3の生理機能およびシグナル伝達経路の解析を、遺伝子改変マウスとプロテオミクスを融合した手法を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1)エピトープタグを融合したRac1およびRac3ノックインマウスの作製

本研究分野の最大のボトルネックは、Rac1とRac3のアミノ酸配列が酷似しているため(アミノ酸一致度94%)、タンパク質レベルでの研究を行うことが困難である点である。そこで、エピトープタグを融合したRac1およびRac3を発現するノックインマウスを作出する。これらのマウスを用いることによって、Rac1とRac3をタンパク質レベルで区別した機能解析を遂行することができる。

(2)脳形成におけるRacタンパク質の機能時期および機能部位の解析

発達期の脳におけるRac1およびRac3の局在を、エピトープタグに対する抗体を用いた免疫染色およびウエスタンブロット解析によって経時的に調べる。この解析によって、Rac1およびRac3が発現する部位と時期を明確にすることができる。

(3)プロテオミクスによる脳におけるRacシグナル伝達経路の解析

エピトープタグを利用したアフィニティー精製によって、Rac1およびRac3シグナル伝達複合体をマウス脳の懸濁液より精製し、質量分析によって構成分子を網羅的に同定する。これにより、脳形成におけるRacシグナル経路を包括的に調べることができるばかりでなく、Rac1とRac3との間の相互作用因子の違いについても明らかにすること

ができる。

4. 研究成果

(1) エピトープタグを融合した Rac1 および

Rac3 ノックインマウスの作製

Rac1 および Rac3 の C 末端は脂質修飾によりプロセッシングを受けるため、N 末端に Myc-FLAG タグを融合した Rac を発現するノックインマウスの作製を試みた (tag-Rac1、tag-Rac3、図 1)。tag-Rac1 マウスについては、定法に従って相同組換え体 ES 細胞をスクリーニングし、キメラマウスの作製を試みたが、ES 細胞の寄与率が高いキメラを得ることができなかった。しかしながら、tag-Rac3 マウスについては、ノックインマウスの作製に成功し、繁殖により解析に使用する十分なホモ接合型マウスを得ることができた。

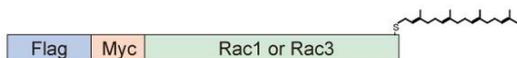


図 1 エピトープ付加 Rac1・Rac3

(2) 脳形成における Rac タンパク質の機能時期および機能部位の解析

tag-Rac3 マウスを利用し、Rac1 と Rac3 をタンパク質レベルで区別して検出することを試みた。tag-Rac3 マウスにおいては、Rac3 の分子量がエピトープタグの分子量 (約 3.5 kDa) だけ大きくなる。このため、pan-Rac 抗体によるウエスタンブロット解析によって、Rac1 と Rac3 の発現量を同時に比較することができる。0 日齢から成体マウスの脳懸濁液を用いてウエスタンブロット解析を行った結果、Rac1 の発現量は発生を通して一定していたのに対して、Rac3 の発現量は生後 8 日でピークを迎え、その後減弱していくことが明らかとなった (図 2)。また、全ての時期を通じて、Rac3 の発現量は Rac1 よりが格段に少なかった。

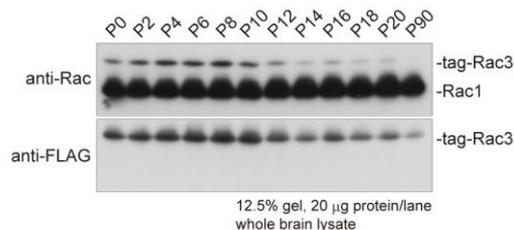


図 2 発達期脳における Rac1 および Rac3 の発現解析

また、FLAG タグに対する抗体を用いた免疫染色を行なった結果、Rac3 の発現ピークである生後 8 日齢において Rac3 は脳全体に発現していた。これらの結果より、Rac3 は発生の途中に一過的に発現し、脳の発生に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。

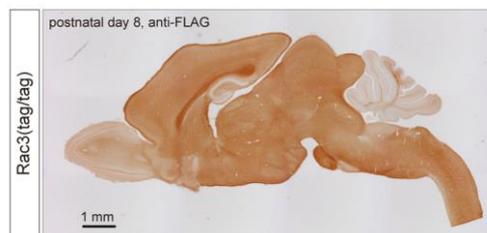


図 3 生後 8 日齢のマウス脳における tag-Rac3 の発現部位

(3) プロテオミクスによる脳における Rac シグナル伝達経路の解析

Rac3 の発現量が最も高い生後 8 日の tag-Rac3 マウスの脳を用いて、Rac3 複合体のアフィニティー精製を行った。ところが、精製複合体には非特異的な夾雑タンパク質が多く、質量分析による相互作用分子の同定には至らなかった。そこで次に、GST-Rac3 タンパク質を調製し、これを bait として Rac3 結合タンパク質の精製を行った。生後 8 日目の野生型マウスの脳懸濁液に GTP-gamma-S あるいは GTP-beta-S を加え、その後に Rac3 複合体を精製することによって、活性化または不活性化 Rac3 特異的に結合する因子の同定を試み

た。精製した複合体は iTRAQ ラベルし、nano-LC タンデム質量分析計を用いて分析することによって、活性型複合体因子と不活性型複合体因子の網羅的同定と同時に相対定量を行った。その結果、活性化型 Rac3 特異的な結合タンパク質として PAK3, betaPIX, GIT1, GIT2 を同定することができた。PAK3 および beta-PIX は、Rho ファミリーG タンパク質のエフェクターおよび活性制御因子であり、ヒトにおいては精神遅滞の原因遺伝子として知られている非常に重要なタンパク質である。今後、これらのタンパク質について個体レベルにおいて機能解析をすることによって、神経高次機能における Rac シグナリングの重要性について明らかにしていく。

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 1 件)

- ① Hidetoshi Kassai, Toshio Terashima, Masahiro Fukaya, Kazuki Nakao, Mizuho Sakahara, Masahiko Watanabe, Atsu Aiba. “Rac1 in cortical projection neurons is selectively required for midline crossing of commissural axonal formation.” *Eur. J. Neurosci.*, 28(2), 257-67 (2008)
査読有り

[学会発表] (計 4 件)

- ① 葛西秀俊
「プロテオミクス手法を用いた遺伝子改変マウスの脳機能解析」
第 32 回 日本分子生物学会年会、横浜市・パシフィコ横浜 (2009 年 12 月 11 日)
- ② 葛西秀俊・渡久川兼誉・橋本浩一・岡村

千絵子・中尾和貴・狩野方伸・饗場篤
「小脳プルキンエ細胞における mGluR1-Homer 複合体の生理機能解析」
第 32 回 日本分子生物学会年会、横浜市・パシフィコ横浜 (2009 年 12 月 10 日)

- ③ Hidetoshi Kassai, Toshio Terashima, Masahiro Fukaya, Kazuki Nakao, Mizuho Sakahara, Masahiko Watanabe, Atsu Aiba
“Small G protein Rac1 is selectively required for the formation of commissural axons in the cerebral cortex”
37th annual meeting of the Society for Neuroscience、アメリカ合衆国・ワシントン D.C. (2008 年 11 月 16 日)

- ④ 葛西秀俊・寺島俊雄・深谷昌弘・中尾和貴・坂原瑞穂・渡辺雅彦・饗場篤
「大脳皮質の交連線維形成における Rac1 の役割」
第 31 回 日本神経科学大会、東京・東京国際フォーラム (2008 年 7 月 9 日)

[その他]

ホームページ等

<http://lar.cdbim.m.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

葛西 秀俊 (KASSAI HIDETOSHI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40403232

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし