

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890149

研究課題名（和文） シナプス形成・成熟過程を支える小胞輸送の制御機構

研究課題名（英文） Regulation of membrane trafficking in synaptic formation and maturation.

研究代表者

坂根 亜由子 (SAKANE AYUKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：60509777

研究成果の概要（和文）： 高次神経機能を支えるには、神経回路のネットワーク上にシナプスが形成され、さらにそのシナプスが情報伝達の場として成熟することが必要である。このシナプスの形成および成熟過程において、小胞輸送によって各過程に必要とされる機能分子群が正しい時に正しい場所へと輸送されることが非常に重要であると考えられるが、これまで小胞輸送を切り口とした研究はあまり行なわれていない。本研究では、このシナプス形成・成熟過程における小胞輸送の役割と制御機構を明らかにすることを目的とする。

研究成果の概要（英文）： The Rab family of small G proteins, which consists of more than 60 different members in mammalian cells, is a key regulator in membrane trafficking. Since each member recognizes distinct subsets on intracellular membranes, this family may contribute to temporal and spatial regulation of signal transduction in various cellular functions. In this project, we analyzed the functions of Rab proteins in synaptic formation and following maturation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生化学、分子生物学、細胞生物学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：高次神経機能、シナプス形成、シナプス成熟、小胞輸送、Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

記憶や学習をはじめとする高次神経機能を支えるには、まず、神経細胞間の情報伝達の間であるシナプスが形成され、さらに、そのネットワークによって高次に張りめぐらされた神経回路網が構築される必要がある。シナプスの形成過程では、まず、最初に神経細胞から複数の突起が形成され、そのうちの1本が他より長く伸長して軸索に成長する。この軸索の伸長に関しては、先端部に局在する受容体が細胞外からのシグナルを受け、その下流の細胞内シグナル伝達系がアクチン細胞骨格系や微小管系を制御する機構が注目され、世界中で精力的に研究されている。しかし、軸索が伸長するには、伸展する細胞膜の膜成分の十分な補充、さらには、軸索の目標地点までの正しい伸長に関わる多数の分子、例えば、上述した受容体や細胞内シグナル伝達分子群等が先端部へ輸送されることが必要となってくるが、これらを担う細胞内小胞輸送の機構についてはあまり注目されていない。一方、伸長した軸索が標的となる神経細胞と出会い、形態的なシナプスが形成された後、さらにシナプスは情報伝達の間として成熟して機能的なシナプスになるが、この過程では軸索側のプレシナプスにアクティブゾーン、樹状突起側のポストシナプスにシナプス後肥厚部といった特徴的な構造が形成される。ここでも神経伝達物質を含むシナプス小胞、その放出に必要なシナプス小胞関連蛋白質やアクティブゾーンを構成する蛋白質群がプレシナプスの、シナプス後肥厚部に集積する神経伝達物質の受容体やその下流で働くシグナル伝達分子群がポストシナプスのそれぞれ正しい場所に輸送される必要がある。さらに、安定したシナプス結合を形成するには、プレおよびポストシナプスの各々の細胞膜の対峙する正しい場所に接着分子が輸送される必要があるが、これも小胞輸送によって制御されている。このよう

に、高次神経機能を支える上でシナプス形成・成熟に必要とされる機能分子群の輸送を担う小胞輸送は非常に重要な役割を果たしていると考えられるが、この小胞輸送の制御機構については、これまであまり研究されていない。

一方、研究代表者は、これまでシナプス成熟後のシナプス機能を支える小胞輸送について研究してきた。すなわち、プレシナプスでのシナプス小胞輸送の過程を制御する分子として、代表的な小胞輸送の制御系として知られる Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質 (Rab) のメンバーである Rab3A に注目した研究を進めてきており、その活性制御蛋白質 Rab3 GAP p130 のノックアウトマウスを用いた個体レベルの解析から Rab3A 系がシナプス可塑性において重要な役割を果たしていることを証明している (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006*)。この Rab3 GAP p130 の遺伝子変異は精神遅滞を主症状とする Warburg Micro 症候群の原因であることがイギリスのグループにより報告されているが、本疾患では、小頭症や脳梁低形成、脳回異常、小眼症等の神経系の発生過程の異常によると考えられる所見も認められている。このように Rab3A 系がシナプス小胞輸送のみではなく、シナプス形成・成熟過程をも制御しうる可能性がでてきている。

## 2. 研究の目的

記憶や学習をはじめとする高次神経機能を支えるには、シナプスの形成やその成熟が必要であるが、本研究ではこれらの過程で必須の役割を有する分子群の機能部位への小胞輸送の役割と制御機構を明らかにすることを目的とする。特に、本研究では小胞輸送の代表的な制御系のひとつである Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質 (Rab) に注目して解析を進める。研究代表者はこれまで Rab のメンバーである Rab3A とその活性制御蛋白質

Rab3 GAP によるシナプス小胞輸送の制御機構についての研究を行い、Rab3A 系のシナプス可塑性における重要性を示しているが、本研究では、シナプス形成・成熟過程における Rab3A 系の新たな機能を解明する。さらに、本研究では、シナプス形成および成熟を制御する Rab とその関連蛋白質群を新たに同定し、その機能と作用機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では大きく 2 つの方向からアプローチする。まず、研究代表者がこれまで解析してきた Rab3A 系に注目し、その中で未だまったく機能が明らかになっていないシナプス小胞上に局在する巨大分子 Rabconnectin-3 のシナプス形成・成熟における役割と作用機構を解析する。今ひとつは、Rab ファミリーのうち、シナプス形成・成熟過程の小胞輸送に関与する Rab3A 以外のメンバーを同定し、その機能と作用機構を解析する。

(1) シナプス形成・成熟過程における Rabconnectin-3 の機能と作用機構の解析：Rabconnectin-3 は Rab3A の活性制御蛋白質 Rab3 GEP と直接結合し、Rab3 GAP と間接的に結合する蛋白質として同定されているが、分子量 16 万と 30 万の 2 個のサブユニット ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) から成り、シナプス小胞に局在することが明らかになっている。本研究では、Rabconnectin-3 のシナプス小胞への局在機構や他の Rab3A 系を中心としたシナプス関連蛋白質群との相互作用を解析する。また、海馬の初代培養神経細胞に Rabconnectin-3 の各サブユニットの変異体や siRNA を導入し、軸索および樹状突起形成やシナプス形成に与える影響を検討する。さらに、Rabconnectin-3 の 2 個のサブユニットの各々のノックアウトマウスを作製する。

(2) シナプス形成および成熟を担う機能分子群の小胞輸送に関与する Rab の

解析：本研究では、シナプス形成および成熟を担う分子群の機能部位への小胞輸送を制御する Rab3A 以外の Rab のメンバーを同定し、その機能と作用機構を明らかにする。さらに、これまで研究代表者の所属するグループが上皮細胞において接着分子の輸送制御に機能していることを見出していた Rab13 についてシナプス形成および成熟過程における役割と作用機構を明らかにする。

### 4. 研究成果

本研究では、2 年間の研究期間中に以下の成果を得た。

(1) Rabconnectin-3 は、シナプス小胞輸送を制御することが確立している Rab3A の活性制御蛋白質に結合するシナプス小胞巨大蛋白質として見出されているが、本研究では、その機能を個体レベルで明らかにするため、Rabconnectin-3 $\alpha$  および-3 $\beta$  の両サブユニットのノックアウトマウスの作製を進めた。その過程で、本蛋白質がシナプス形成・成熟の非常に初期の段階に関与することを示唆する結果を得た。

(2) これまで研究代表者の所属するグループは上皮細胞において Rab13 が接着分子の輸送を制御することを見出し、その標的蛋白質として JRAB を同定しているが、本研究では、PC12 細胞を用いた細胞生物学的解析を行って Rab13 は JRAB を介して神経突起の伸長に関与していることを示した。また、この際、Rab13 が JRAB に結合することによって JRAB の N 末端と C 末端領域の分子内結合が解除されるという分子機構が重要であることを明らかにした。分子内結合が解除された活性型の JRAB はその露出した領域で何らかの分子に結合して神経突起形成に関与すると考えられるが、今回の解析でアクチン結合

蛋白質である Actinin-4 がその候補のひとつであることが示唆された。すなわち、Rab13-JRAB 系は神経突起先端部に Actinin-4 を輸送し、そこでアクチン細胞骨格の再編成を引き起こして突起が伸長すると考えられた。

現在、Rab13 及び JRAB の conditional KO マウスを作製しており、今後は神経特異的に Rab13 あるいは JRAB がノックアウトされたマウスを用いて Rab13-JRAB 系の神経突起形成における機能とその詳細な制御機構についての個体レベルの解析も行っていきたい。

#### 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 6 件)

- ① Sakane, A., Honda K. and Sasaki, T.  
Rab13 regulates neurite outgrowth in PC12 cells through its effector protein, JRAB/MICAL-L2.  
*Mol. Cell. Biol.*, 30(4), 1077-1087 (2010)  
査読有
- ② Szodorai, A., Kuan, Y-H., Hunzelmann, S., Engel, U., Sakane, A., Sasaki, T., Takai Y., Kirsch, J., Müller, U., Beyreuther, K., Brady, S., Morfini, G. and Kins, S.  
APP anterograde transport requires Rab3A GTPase activity for assembly of the transport vesicle.  
*J. Neurosci.*, 29 (46), 14534-14544 (2009)  
査読有
- ③ 坂根亜由子, 佐々木卓也  
Rab ファミリー Small G タンパク質による小胞輸送制御と高次生命機能  
細胞工学 28 巻 12 号 : 1247 頁-1251 頁  
(2009) 査読無

- ④ Sakane, A., Miyoshi, J., Takai, Y. and Sasaki, T.  
Analysis on the emerging role of Rab3 GTPase-activating protein in Warburg Micro and Martsolf syndrome.  
*Methods Enzymol.*, 438, 131-139 (2008)  
査読無

- ⑤ Higashio, H., Nishimura, N., Ishizaki, H., Miyoshi, J., Orita, S., Sakane, A. and Sasaki, T.  
Doc2 $\alpha$  and Munc13-4 regulate Ca<sup>2+</sup>-dependent secretory lysosome exocytosis in mast cells.  
*J. Immunol.*, 180 (7), 4774-4784 (2008)  
査読有

- ⑥ 坂根亜由子, 佐々木卓也  
高次機能システムを支えるエキソサイトーシス系 Rab ファミリー低分子量 GTPase 蛋白質 核酸 酵素 53 巻 16 号 : 2130 頁-2135 頁 (2008) 査読無

[学会発表] (計 2 件)

- ① BMB2008 (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 11 日、神戸)  
Exocytotic Rab small G proteins regulate neuronal development and plasticity.  
Takuya Sasaki and Ayuko Sakane
- ② 第 60 回日本細胞生物学会大会 (2008 年 6 月 30 日、横浜)  
高次細胞機能発現におけるエキソサイトーシス系 Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質の作用機構  
佐々木卓也、西村範行、坂根亜由子

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
坂根 亜由子 (SAKANE AYUKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：60509777

