

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790367

研究課題名(和文)

NURR1 が関与するパーキンソン病発症機序における SGSM ファミリーの役割の解明

研究課題名(英文)

Function analysis of SGSM family in NURR1 related pathogenesis of Parkinson's disease

研究代表者

楊 浩 (YANG HAO)

慶應義塾大学・先端研究センター・助教

研究者番号：10464992

研究成果の概要(和文): SGSM (Small G protein Signaling Modulator) ファミリータンパクはパーキンソン病の疾患原因遺伝子産物である NURR1 (Nuclear Receptor related 1) と相互作用し、細胞内小胞輸送に関与する。申請者は分子生物学的手法を用いて、SGSM ファミリータンパクの性状および機能を解析したところ、SGSM2 がトランスゴルジ網に局在し、クラスリン被覆小胞に基づいた細胞内小胞輸送に関与することが分かった。また、Mammalian 2 hybrid 法を用いて、SGSM2 と低分子量 G タンパク RAB ファミリータンパクとの相互作用を調べたところ、SGSM2 は異なる RAB ファミリーメンバーに対し、ある程度の特異性を示した。

研究成果の概要(英文): SGSM family proteins interact with NURR1, encoded by the pathogenic gene of Parkinson's disease, and associate with intracellular vesicular transportation. The function of SGSM family proteins was analyzed by molecular biological approaches and the results indicated that SGSM2 was localized at *trans*-Golgi network and involved in the clathrin dependent vesicular transportation. The association between SGSM2 and small G protein RAB family proteins was investigated by mammalian 2 hybrid system and the results suggested that SGSM2 show certain specificity for different RAB family proteins.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：脳・神経、パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系のドーパミンニューロンはヒトの運動・記憶などを制御する。転写因子である NURR1 (Nuclear Receptor related 1)

はパーキンソン病の疾患原因遺伝子の産物の一つであり、中枢神経系のドーパミンニューロンで強く発現し、胎児期の神経前駆細胞からドーパミンニューロンへの発達および

成熟したドーパミンニューロンの機能維持に重要な役割を果たしている。

申請者は RUN と TBC モチーフを併せ持つ SGSM1/2/3 (Small G protein Signaling Modulator) を発見し、これらの 3 遺伝子を SGSM ファミリーと命名した。ノーザンプロットおよび *in situ* hybridization の結果、SGSM ファミリーは中枢神経系のニューロンにおいて強く発現していた。さらに、SGSM タンパクが RAB (RAS -related in Brain) ファミリーおよび RAP (RAS -related Protein) ファミリータンパクと相互作用することを明らかにした (Yang, H., *et al.*, *Genomics*, 90:249-260, 2007)。これらの解析結果から、SGSM タンパクはシグナル伝達のメディエーターとして、ニューロンの RAP シグナル伝達経路からのシグナルにより RAB 小胞輸送経路を制御していることが予想される。米国のグループにより、ドーパミンニューロンにおいて SGSM タンパクが NURR1 と相互作用することが報告された (Yu, L., *et al.*, *J. Neurosci.*, 31 (20) :9277-9286, 2008)。そこで、SGSM タンパクが介在して NURR1、RAP シグナル伝達経路および RAB 小胞輸送経路との相互作用により、パーキンソン病の発症機序に関与することが予想された。

2 . 研究の目的

ドーパミンおよび他の神経伝達物質の産生および放出はシグナル伝達経路と小胞輸送経路との相互作用が必要であるが、今まで、RAP シグナル伝達経路と RAB 小胞輸送経路との関連は報告されていない。申請者が発見した SGSM ファミリータンパクは、RUN モチーフおよび TBC モチーフを併せ持つ、RAB ファミリーおよび RAP ファミリータンパクと相互作用し、シグナル伝達および小胞輸送に関与すると考えた。本研究は、分子生物学的手法を用いて、SGSM ファミリータンパクが細胞内小胞輸送経路に対する制御機序を解析する。

低分子量 G タンパクである RAB ファミリータンパクは細胞内輸送小胞のターゲティングを制御する。60 種類以上の RAB ファミリー

メンバーはそれぞれ異なる小胞輸送過程に関与する。SGSM タンパクは TBC モチーフを介して、RAB タンパクと相互作用するが、具体的な対応関係はまだ不明である。本研究では、mammalian 2 hybrid 法を用いて、SGSM タンパクと RAB タンパクとの相互作用を解析する。

3 . 研究の方法

(1) ヒトの SGSM2 タンパクの推定アミノ酸配列を解析し、強い抗原性かつマウス *Sgsm2* タンパクの推定アミノ酸配列との高い相同性 (> 80%) を示した部分に基づいて、ペプチドを合成し、ウサギを免疫して、血清から抗 SGSM2 抗体を精製した。ウサギ抗 SGSM2 抗体および様々な抗細胞内小器官マーカータンパク抗体を用いて、COS7 細胞において、共免疫染色を行い、SGSM2 の細胞内局在を同定した。また、SGSM2 タンパクに FLAG タグを付加し、強制発現させてから、抗 FLAG 抗体および様々な抗細胞内輸送小胞のマーカータンパク抗体を用いて、細胞免疫染色を行った。また、FLAG タグを付加した SGSM2 の欠失変異体を作製し、強制発現させてから、様々な抗細胞内小器官および輸送小胞のマーカータンパク抗体を用いて、細胞免疫染色を行った。

(2) 従来の方法と比べて、mammalian 2 hybrid 法はある程度の定量性があるため、mammalian 2 hybrid 法を用いて、SGSM タンパクと RAB タンパクとの相互作用を解析した。文献情報に基づいて、最も SGSM タンパクに関連しそうな数種類の RAB メンバーを選び、これらの RAB メンバーおよび SGSM2 の ORF (Open Reading Frame) を PCR で増幅してから、RAB の ORF を pBIND ベクターに、SGSM2 の ORF を pACT ベクターに挿入した。COS7 細胞に上記の発現ベクターを導入し、SGSM タンパクおよび RAB タンパクを一過性に共発現させ、両タンパク間の相互作用の結果として発現したルシフェラーゼの活性を測定した。測定結果を比較することにより、SGSM2 タンパクと各 RAB タンパクとの相互作用の強弱を評価した。

4. 研究成果

抗 SGSM2 抗体および様々な抗細胞内小器官マーカータンパク抗体を用いて、細胞免疫染色を行ったところ、内在性の SGSM2 タンパクが *cis*-Golgi のマーカータンパクである GM130 (*cis*-Golgi matrix protein 130kD) タンパクの外側(図1) *trans*-Golgi network のマーカータンパクである TGOLN2 (*trans*-Golgi network integral membrane protein 2) と同様な場所に局在することが分かった(図2)。以上の結果により、SGSM2 タンパクが細胞内のトランスゴルジ網に局在することが示唆された。

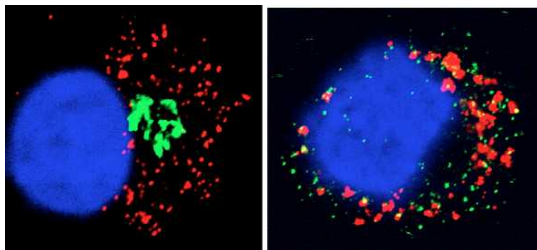


図 1

Red: SGSM2
Green: GM130
Blue: DAPI

図 2

Red: SGSM2
Green: TGOLN2
Blue: DAPI

SGSM ファミリータンパクは TBC モチーフを介して、RAB ファミリータンパクと相互作用し、細胞内小胞輸送に関与すると考えられている。SGSM タンパクが制御する輸送小胞を確認するために、SGSM2 タンパクに FLAG タグを付加し、強制発現させてから、様々な抗細胞内輸送小胞のマーカータンパク抗体を用いて、細胞免疫染色を行った。その結果、SGSM2 タンパクを強制発現させると、内在性クラスリン被覆小胞の局在が変わることが明らかとなった(図3)。

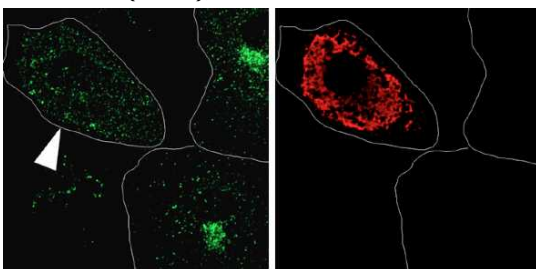


図 3 Green: クラスリン被覆小胞

Red: 強制発現させた SGSM2 タンパク

以上の結果から、SGSM2 タンパクが細胞内のクラスリン被覆小胞に基づいて小胞輸送に関与することが示唆された。

SGSM ファミリータンパクが RUN モチーフおよび TBC モチーフを併せ持つことから、二つのモチーフの内のどちらがクラスリン被覆小胞輸送に関与するかを確認するために、FLAG タグを付加した 2 種類の SGSM2 タンパクの欠失変異体を作製し、強制発現させてから、内在性のクラスリン被覆小胞の局在を調べた。その結果、SGSM2 タンパクの RUN モチーフを欠失し TBC モチーフのみを含む欠失変異体(351 番目から 1006 番目のアミノ酸残基からなる)を強制発現させた細胞でも、内在性のクラスリン被覆小胞の局在が影響されることから、SGSM2 タンパクの TBC モチーフがクラスリン被覆小胞に関与することが示唆された。

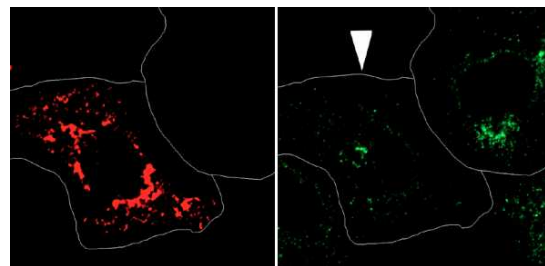


図 4 Red: 強制発現させた SGSM2 タンパク欠失変異体(351~1006 番目のアミノ酸残基からなる)

Green: クラスリン被覆小胞

また、Mammalian 2 hybrid 法を用いて、SGSM2 と数種類の低分子量 G タンパク RAB ファミリータンパクとの相互作用について調べた。その結果、SGSM2 がそれぞれの RAB ファミリーメンバーに対し異なる結合能を示したことから、RAB ファミリータンパクに対し、ある程度の特異性を持つことが分かった(図5)。

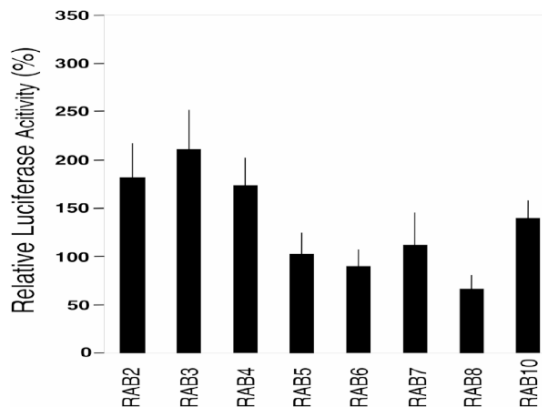


図 5 Mammalian 2 hybrid 法を用いた SGSM2 タンパクと RAB タンパクとの相互作用解析。縦棒：両タンパク間の相互作用により発現したルシフェラーゼの活性。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

楊 浩、SGSM2 タンパクは RAB11 と協調してクラスリンコート小胞による逆行性輸送を制御する、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会)、2010 年 12 月 7 日 ~ 10 日、神戸

楊 浩、過剰に発現させた SGSM2 タンパクはクラスリンコート小胞を介する輸送システムを阻害する、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日 ~ 12 日、横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

楊 浩 (YANG HAO)

慶應義塾大学・先導研究センター・助教

研究者番号 : 10464992

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし