

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430040

研究課題名(和文) 精神遅滞原因遺伝子BRAG1による興奮性シナプス調節機構の解明

研究課題名(英文) Functional roles of BRAG1 at the excitatory postsynapse

研究代表者

深谷 昌弘 (Fukaya, Masahiro)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：10360900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの精神遅滞の原因遺伝子の1つであるBRAG1は、膜小胞輸送に重要なArf6を活性化し、高次脳機能発現に重要であることが示唆されているが、その分子機構は不明な点が多い。そこで、BRAG1遺伝子欠損マウスを作成し、生化学的、解剖学的、行動学的に解析した。その結果、BRAG1欠損マウスでは興奮性シナプスのPSDに局在するグルタミン酸受容体の発現量に変化が生じていた。また、BRAG1欠損マウスでは海馬依存的な学習異常が観察された。以上から、BRAG1がArf6シグナル経路を介してグルタミン酸受容体の表面発現量調節を担い、高次脳機能発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, I focused on BRAG1, one of the excitatory postsynaptic molecules, which causes nonsyndromic mental retardation in human. To reveal the functional mechanisms of BRAG1 at postsynapse, BRAG1 knockout mice were generated. Using BRAG1 knockout mice, many neuronal and glial marker molecules were screened by immunoblot and immunohistochemical assays. Consequently, loss of BRAG1 was accompanied by upregulation of some glutamate receptor subunits in the hippocampus, and impairment of the passive avoidance task. These results suggest that BRAG1 plays important roles in the regulation of the glutamate receptor localization at excitatory postsynapse and hippocampus-dependent memory.

研究分野：神経科学

キーワード：Arf6 BRAG1 シナプス

1. 研究開始当初の背景

低分子量 GTPase である Arf6 は、細胞膜とエンドソーム間のエンドサイトーシス等の小胞輸送を制御し、細胞膜表面の細胞接着分子の発現量を調節していることが報告されている (Palacios et al., *Nature Cell Biol*, 2002)。近年、中枢神経系においても、この Arf6 シグナル経路が発達期の神経細胞の移動や神経突起の伸長や分岐、神経伝達物質受容体の細胞表面発現量制御に重要な役割を果たしていることが報告されてきている。Arf6 シグナル経路の中でも、Arf6 の活性制御因子である BRAG (Brefeldin A resistant Arf-GEF) ファミリーの重要性が注目されている。最近、中枢神経系の興奮性シナプスにおいて BRAG ファミリーの1つである BRAG2 が AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) に直接結合してシナプス後膜上の AMPA 受容体発現量を調節し、シナプス可塑性の一つである長期抑圧の制御に、この BRAG2 が関与することが示唆された。このことから BRAG-Arf6 シグナルが記憶や学習といった高次脳機能発現の基盤となるシナプス可塑性発現調節の一端を担っていることが明らかにされた (Scholz et al., *Neuron*, 2010)。

また、BRAG1 の IQ-like ドメインもしくは酵素活性を持つ Sec7 ドメインのアミノ酸変異が非症候群性の精神遅滞を引き起こすことが最近ヒトで報告されている (Shoubridge et al., *Nature Genetics*, 2010)。このことは BRAG1 を介した Arf6 シグナル経路が脳の神経回路発達および高次脳機能に深く関与していることを示している。我々は、マウス脳における分子解剖学的および生化学的な解析から BRAG1 が興奮性シナプス後肥厚部 (PSD) に限局的に分布し、NMDA 型グルタミン酸受容体の裏打ちタンパク質である PSD-95 と直接結合すること、さらに BRAG1 の mRNA が樹状突起領域まで輸送されることを報告している (Sakagami et al., *Neurosci Res*, 2008)。

さらに、NMDA 受容体刺激依存的に活性化された BRAG1-Arf6 シグナルが JNK を介して間接的ではあるが AMPA 型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスに関与することが報告され (Myers et al., *J Neurosci*, 2012)、BRAG1 がシナプスにおける受容体量調節やシナプス可塑性において重要な役割を担っていると考えられてきている。これら既知のことから、BRAG1 が神経活動依存的に樹状突起で翻訳されることが考えられ、興奮性シナプスにおける神経伝達物質の受容体やシナプス結合分子の細胞表面の発現量を神経活動依存的に調節し得る可能性があると考えられることから本研究課題の着想に至った。

しかしながら、興奮性シナプスの PSD において BRAG1 がどのような分子機構を伴って膜タンパク質のエンドサイトーシスに関与するのか、またどのような形で興奮性シナプス

の形成や維持、さらには高次脳機能に関わっているのかは不明な点が多く、遺伝子欠損マウスを用いた解析が待たれていた。

2. 研究の目的

中枢神経系において BRAG1 は興奮性シナプスの PSD に局在し、ヒトの精神遅滞への関与が強く示唆されているが、どのような機構で BRAG1 が高次脳機能に関与するのかは不明である。そこで本研究課題では、BRAG1 遺伝子欠損マウスを作成し、分子解剖学的、生化学的、行動学的手法を用いて解析することで興奮性シナプスの PSD に局在する BRAG1 の機能的役割を明らかにすることを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

まず、BRAG1 遺伝子のエクソン 3 を loxP 配列で挟み込んだターゲティングベクターを作成し、新潟大学脳研究所の崎村建司教授の協力のもとで、ES 細胞 RENKA 株を用いて相同組み換え体を選別した。選別した ES 細胞からキメラマウスを誕生させ、さらに交配し F1 マウスを作成しジャームライントランスミッションを確認して BRAG1-flox マウスの作成を行った。この BRAG1-flox マウスと中枢神経系で Cre リコンビナーゼが発現する Nestin-Cre マウスを交配させ、BRAG1 遺伝子欠損マウスを作成した。

BRAG1 遺伝子欠損マウスの解析方法としては、野生型および BRAG1 遺伝子欠損マウス海馬のタンパク質を抽出し、各シナプス分子の発現量を生化学的に解析する。また、主な神経伝達物質受容体、PSD 内部分子および細胞接着分子の特異抗体を用いて免疫染色を行い、スクリーニングを行った。特にグルタミン酸受容体関連の分子群を解析した。BRAG1 遺伝子欠損マウスで変化している分子がある場合は、抗体を用いたウエスタンブロットおよび免疫染色、免疫電子顕微鏡法により定量的に発現量の変化を比較した。

また、通常の電子顕微鏡解析により、海馬 CA1 領域の錐体細胞の樹状突起スパインと興奮性シナプスの超微形態を観察し、シナプス密度やスパインの形や長さ、PSD の長さ等を定量的に計測し、シナプス形成異常の有無を解析した。

さらに、BRAG1 の高次脳機能への関与を明らかにするために BRAG1 遺伝子欠損マウスの各種行動学的解析を行った。特に、記憶学習能力を解析するために海馬依存的な学習行動を評価できる受動的回避テストを行った。また、オープンフィールドテストで活動量の測定を行い、明暗選択テストで不安様行動を解析した。さらに、ローターロッドテストで運動学習機能を解析した。

4. 研究成果

まず、Cre-loxP システムを用いた BRAG1 遺伝子欠損マウスの作成を行った。BRAG1 が loxP 配列で挟まれたロックインマウスを作り、Nestin-Cre マウスと交配させて BRAG1 遺伝子が欠損するマウスの作成に成功した。次に、抗 BRAG1 特異抗体を用いた免疫染色およびイムノプロット解析によって脳での BRAG1 欠損が確認された。

この BRAG1 遺伝子欠損マウスを用いて、中枢神経系における BRAG1 欠損に伴う各種興奮性シナプス関連分子の発現量の変化を免疫組織染色およびイムノプロットでスクリーニングを行った。その結果、脳内での興奮性が上昇していることを示す活性型アストロサイトの増加が観察された。さらに、興奮性シナプスの PSD に多く局在するグルタミン酸受容体の発現量もしくは局在部位に変化が生じている可能性が考えられる結果が得られた。このグルタミン酸受容体は PSD-95 と複合体を形成することから、BRAG1 も PSD95 を介してこの複合体を形成し、グルタミン酸受容体の局在や細胞表面発現量の調節に関与している可能性が考えられた。

さらに、これまでの報告から、このグルタミン酸受容体の欠損マウスでは海馬依存的な学習が障害されることから、BRAG1 欠損マウスでも受動的回避行動テスト解析をしたところ、海馬依存的な学習能力の低下が観察された。これらの結果から、BRAG1 が Arf6 シグナル経路を介してグルタミン酸受容体の興奮性シナプスでの表面発現量や局在調節を行うことで高次脳機能発現において重要な役割を担っていることが示唆された。

今後、さらに解析を進め BRAG1-Arf6 シグナル経路を介したシナプス可塑性や高次脳機能の分子機構の解明を目指すとともに、BRAG1 欠損マウスが精神遅滞のモデル動物となり得ることから、精神遅滞の克服に向けた研究を継続していきたい。

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 7 件)

(1) Fukaya M, Ohta S, Hara Y, Tamaki H, Sakagami H (2016) Distinct subcellular localization of alternative splicing variants of EFA6D, a guanine nucleotide exchange factor for Arf6, in the mouse brain. *J Comp Neurol* 524(13): 2531-2552. (査読あり)
doi: 10.1002/cne.24048

(2) Yamasaki M, Fukaya M, Yamazaki M, Azechi H, Natsume R, Abe M, Sakimura K, Watanabe M (2016) TARP γ -2 and γ -8 differentially control AMPAR density across

schaffer collateral/commissural synapses in the hippocampal CA1 area. *J Neurosci* 36(15): 4296-4312. (査読あり)
doi:10.1523/JNEUROSCI.4178-15.2016

(3) Hara Y, Fukaya M, Hayashi K, Kawauchi T, Nakajima K, Sakagami H (2016) ADP ribosylation factor 6 regulates neuronal migration in the developing cerebral cortex through FIP3/Arfophilin-1-dependent endosomal trafficking of N-cadherin. *eNeuro* 3(4): 0148-16. (査読あり)
doi: 10.1523/ENEURO.0148-16.2016

(4) Sakagami H, Hara Y, Fukaya M (2016) Interaction of serologically defined colon cancer antigen-3 with Arf6 and its predominant expression in the mouse testis. *Biochem Biophys Res Commun* 477(4): 868-873. (査読あり)
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.150

(5) Fukaya M, Fukushima D, Hara Y, Sakagami H (2014) EFA6A, a guanine nucleotide exchange factor for Arf6, interacts with sorting nexin-1 and regulates neurite outgrowth. *J Neurochem* 129(1): 21-36. (査読あり)
doi: 10.1111/jnc.12524

(6) Yazaki Y, Hara Y, Tamaki H, Fukaya M, Sakagami H (2014) Endosomal localization of FIP3/Arfophilin-1 and its involvement in dendritic formation of mouse hippocampal neurons. *Brain Res* 1557: 55-65. (査読あり)
doi: 10.1016/j.brainres.2014.02.018

(7) Sakagami H, Katsumata O, Hara Y, Tamaki H, Fukaya M (2014) Preferential localization of type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase γ at the periaxonal zone of mouse photoreceptor ribbon synapses. *Brain Res* 1586: 23-33. (査読あり)
doi: 10.1016/j.brainres.2014.08.051

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 深谷昌弘 シナプス後部における BRAG2-Arf6 シグナル経路を介した AMPA 受容体輸送調節機構. (3S25-2) 日本解剖学会 第 121 回全国学術集会 シンポジウム S25 「シナプス伝達関連分子の輸送とシナプス局在の制御機構の新知見」ビッグパレット福島 (郡山) 2016. 3. 28-30.

(2) 深谷昌弘、阪上洋行、海馬興奮性シナプスにおける BRAG2-Arf6 シグナル経路を介した AMPA 受容体輸送機構. 日本解剖学会関東支部 第 103 回学術集会. 慶応大学日吉キャンパス (川崎) 2015. 11. 7

(3)深谷昌弘、阪上洋行, BRAG2 regulates Arf6 activity and AMPAR endocytosis at postsynapses through the interaction with endophilin3. 第38回日本神経科学大会. 神戸国際会議場(神戸) 2015.7.28-31.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

深谷 昌弘 (FUKAYA, MASAHIRO)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：10360900

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()