

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19300119
 研究課題名（和文）低分子量 G 蛋白質 ARF6 による樹状突起の形成制御機構と
 高次神経機能の解明
 研究課題名（英文）Mechanisms for the dendritic formation by ADP ribosylation factor 6
 and its functional significance in higher brain functions
 研究代表者
 阪上 洋行（SAKAGAMI HIROYUKI）
 北里大学・医学部・教授
 研究者番号：90261528

研究成果の概要（和文）：

本研究は ARF6 の樹状突起形成制御機構の解明を目指し企画した。研究成果として、BRAG ファミリーに属する IQ-ArfGEF/BRAG1 が ARF6 に対する活性化制御因子として、PSD-95 や IRSp53 との結合を介してグルタミン酸受容体とシナプス後肥厚部で複合体を形成することを明らかにした。また、酵母ツーハイブリット法により Vezatin が GTP 型 ARF6 と特異的に結合し、さらに RNA 干渉法により Vezatin が海馬神経細胞の樹状突起の形成に関与することを明らかにした。これらの結果から、Vezatin が ARF6 を介する樹状突起形成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to dissect the molecular mechanism by which ADP ribosylation factor 6 (ARF6) regulates dendritic formation. First, we found that IQ-ArfGEF/BRAG1 functions as a guanine nucleotide exchange factor for ARF6 at the postsynaptic density of excitatory synapses by interacting with the PSD-95 family and IRSp53. Second, we isolated vezatin as a novel ARF6-interacting protein by yeast two hybrid screening. Furthermore, we provided the strong evidence for the functional involvement of vezatin in the dendritic formation of cultured hippocampal neurons using the RNA interference approach. These findings suggest that vezatin regulates dendritic formation downstream of ARF6.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経可塑性、樹状突起、棘突起、細胞骨格、シナプス

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の樹状突起は神経入力を受け取り、その情報を処理変換する。発達過程で樹状突起はダイナミックに伸展分岐し、その空間的な広がりには個々の神経細胞の情報処理能力を規定している。また、成熟期においてもその形態を変化させ、特に樹状突起上沿って存在する棘突起は、興奮性シナプスの場を提供し、神経活動依存的にその数と形状を変化させることより、学習・記憶などの高次神経機能の細胞レベルでの基盤であるシナプス可塑性の構造的な場を提供している。また、樹状突起の形成の破綻は、精神遅滞を伴う精神神経疾患を引き起こすことが明らかになり注目されている。その形成分子機構の解明は、軸索のそれに比べて立ち後れており、研究開始当初、低分子量 G タンパク質 Rho ファミリー分子などの細胞骨格制御経路の関与が明らかになっているのみであった。しかしながら、樹状突起の形態を変化させるためには、その駆動力としてのアクチンをはじめとする細胞骨格の機能関与とともに、変化する細胞表面積に対応して膜脂質や膜タンパク質成分を細胞膜に供給する細胞内小胞輸送機構が深く関与すると考えられるが、そのような観点から樹状突起の形成機構に着目した研究は皆無であった。

Ras スーパーファミリーに属する低分子量 G タンパク質である ADP リボシル化因子 6 (ARF6) は、上皮系、間葉系培養細胞において細胞骨格制御とともにトランスフェリン受容体などの膜タンパク質のリサイクリングに関与することが知られていた。2002 年に Hernandez-Deviz らが神経細胞の樹状突起形成に関与することを初めて報告し、さらに Miyazaki ら (2005 年) と Choi ら (2006 年) により、ARF6 が棘突起の形成・維持に関与することが報告されて、樹状突起の形成の新たな制御

分子としての ARF6 が脚光を浴びつつあった。申請者は ARF6 を活性化するグアニンヌクレオチド交換因子 (ARF6-GEF) ファミリーのうち EFA6 サブファミリーの神経機能発現解析を施行した結果、EFA6A、EFA6C、EFA6D の 3 分子が神経系において多様な遺伝子発現様式を示し、EFA6A と EFA6C が神経樹状突起に局在すること、また、GEF 不活性型 EFA6A の遺伝子導入により、海馬初代神経培養細胞の樹状突起が ARF6 不活性型遺伝子と同様の影響を受けることより、ARF6 の上流制御因子の一つとして機能する可能性を提示してきた。しかしながら、(1) ARF6 の多様な分子種からなる ARF6-GEF 分子による活性制御機構 (2) ARF6 を介する樹状突起形成の分子機構 (3) ARF6 による樹状突起の形成制御と高次神経機能との機能連関についてなどの重要な問題に関しては手つかずの状況であった。

2. 研究の目的

このような研究背景のなか、本研究は、本研究は、ARF6 経路の樹状突起・棘突起の形成の分子機構と神経高次機能への機能的な連関の解明を目指して、以下の点を解明標的として企画立案した。

(1) ARF6 の活性化制御機構の解明: ARF6 活性化制御因子 ARF6-GEF の分子多様性の生理的意義を明らかにするために ARF6-GEF 分子種の細胞内局在を明確にする。

(2) 樹状突起、棘突起の形成における ARF6 の分子機序の解明: 酵母ツーハイブリット法を用いて活性型 GTP 結合型 ARF6 と結合する分子を網羅的に単離同定し、ARF6 の樹状突起、棘突起の制御に関与する分子機構

を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ARF6-GEFの細胞内局在解析：ARF6-GEF分子の大腸菌融合蛋白質を発現精製し、抗原としてウサギやモルモットに免疫し、特異抗体を精製する。イムノブロット解析により特異性を確認した後、固定脳や初代培養細胞での細胞内局在を免疫組織学的に検討する。

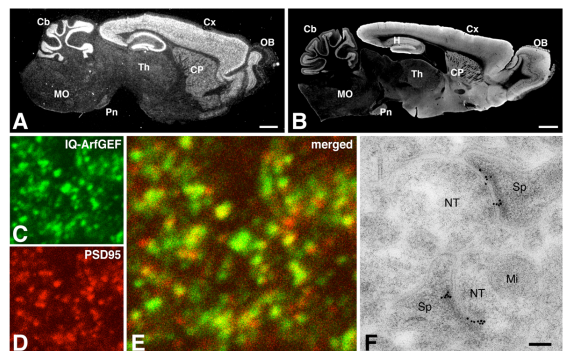
(2) 酵母ツーハイブリット法によるARF6経路の分子ネットワークの同定：ARF6及びARF6-GEFを餌にした酵母ツーハイブリット法によりマウス脳cDNAライブラリーをスクリーニングし、新規結合分子を探索する。得られた候補分子との結合をpull downアッセイ法や免疫沈降法により確認する。

(3) 樹状突起への関与に関する機能解析：海馬初代神経培養細胞にRNA干渉法や機能阻害変異遺伝子を導入し、樹状突起の形成への影響を分岐、伸展長などを計測して検討する。

4. 研究成果

(1) NMDA型グルタミン酸受容体と複合体を形成する新規ARF6-GEFとしてのIQ-ArfGEF/BRAG1：ARF-GEFスーパーファミリーのうち、神経系における機能は全く不明であったBRAG(brefeldin A resistant ARF-GEF)ファミリーに着目して解析を行った。synArfGEFのSec7領域に対して相同性の高い遺伝子をDNAデータベースで探索した結果、KIAA0522が見出された。さらにKIAA0522を用いて、マウス脳cDNAライブラリーをスクリーニングして完全全長の遺伝子配列を決定し、IQ-ArfGEF/BRAGと命名した。IQ-ArfGEF/BRAG1はアミノ酸1479残基、推定分子量162kDaよりなり、アミノ末領域にはコイルド・コイルモチーフ、IQモチーフ、中央部にはSec7領域、プレクストリン相同領域、プロリンの豊富な配列、そしてC末端にはタイプI型の

PDZ結合モチーフを持つ特徴的な構造を示した。さらに、GGA1(Golgi-localizing, γ -adaptin ear homology domain, Arf-binding protein 1)を用いた*in vivo*でのARFの活性化能を検討するpull downアッセイ法により、IQ-ArfGEF/BRAG1がARF6に対するGEF活性を示すことを明らかにした。さらに*in situ*ハイブリダイゼーション法により神経系における遺伝子発現解析を行った結果、IQ-ArfGEF/BRAG1が嗅球、線条体、海馬、大脳皮質などの前脳領域と小脳顆粒細胞に豊富に発現することを明らかにした(図1A)。さらに、非放射性*in situ*ハイブリダイゼーション法を駆使して、IQ-ArfGEF/BRAG1 mRNAが海馬神経細胞の細胞体のみならず樹状突起にも局在することを示した。この所見は、IQ-ArfGEF/BRAG1が樹状突起の局所で活動依存的に翻訳されることを示し、シナプス可塑性への機能関与を強く示唆した。さらに特異抗体による免疫組織化学的解析の結果、IQ-ArfGEF/BRAG1は、神経細胞の樹状突起の領域に顆粒状に分布し、共焦点レーザー顕微鏡解析により、興奮性シナプスマーカーのPSD-95と共存することを見出した(図1B-E)。さらに包埋後免疫電子顕微鏡法によりIQ-ArfGEF/BRAG1が非対称性シナプスのシナプス後肥厚部(PSD)に局在することを明確にした(図1F)(Sakagami et al.,



IQ-ArfGEFの発現局在

(A) *in situ*ハイブリダイゼーション法

(B) 免疫組織化学

(C-E) 海馬CA1領域でのIQ-ArfGEF (C) PSD-95 (D) との共存

(F) 海馬CA1領域でのIQ-ArfGEFの非対称性シナプスへの局在
Mi, mitochondria; NT, nerve terminal; Sp, spine

2008)。

次に、IQ-ArfGEF/BRAG1 のシナプス後肥厚部への局在決定機構を解明するために、免疫沈降法を施行した結果、IQ-ArfGEF/BRAG1 は PSD-95 ファミリー分子、NMDA 型グルタミン酸受容体、カルモデュリンキナーゼ II α と複合体を形成することを明らかにした。さらに酵母ツーハイブリット法により結合分子の同定を試みた結果、IQ-ArfGEF/BRAG1 の C 末領域に存在するプロリンの豊富な配列を介して PSD に豊富に局在する IRSp53 (insulin receptor tyrosine kinase substrate of 53kDa) の SH3 領域と結合することを見出した。さらに免疫沈降法、共焦点レーザー顕微鏡解析、免疫電顕法により IQ-ArfGEF/BRAG1 と IRSP53 とのシナプスで相互作用の可能性を確認した (Sanda et al., 2009)。以上の研究により、IQ-ArfGEF/BRAG1 が、NMDA 型グルタミン酸受容体と複合体を形成し ARF6 の活性化を制御する PSD における新たな ARF6-GEF であることを明確にした。

(2) ARF6 の新規下流分子としての Vezatin の機能解析

ARF6 を介する樹状突起の形成制御経路の解明のために、GTPase 活性を欠落した恒常的 GTP 結合型 ARF6 変異体を餌にして酵母ツーハイブリット法を用いて下流効果分子の探索を施行した。その結果、ミオシン VIIA 及びカドヘリン-カテニンと複合体を形成することが知られていた膜蛋白質である Vezatin の単離に成功した (Sanda et al., 2010)。生化学的な解析により、Vezatin は、ARF ファミリー分子のうち GTP 結合型 ARF6 に特異的に結合すること、さらに ARF6 の N 末端のヘリックス領域とスイッチ I と II を繋ぐ interswitch 領域が結合に重要であることを明らかにした。遺伝子発現解析の結果、Vezatin 遺伝子は胎児期より神経系に豊富に発現し、成熟期脳では海馬に最も強く検出された。さらに初代海馬神経培養細胞に Vezatin を過剰

発現すると樹状突起の伸長が促進され、一方、RNA 干渉法により内因性 Vezatin の発現を抑制すると樹状突起の分岐と伸長が阻害された。以上の結果より、Vezatin が ARF6 の下流として樹状突起の形成に関与する可能性を世界に先駆けて報告した (Sanda et al., 2010)。また、現在、Vezatin 以外にも単離に成功した ARF6 結合蛋白質についても解析を遂行している。

以上、本研究により、ARF6 の樹状突起の形成における分子機構の一端を明らかにすることに成功した。これらの研究成果をもとに、上流・下流の ARF6 制御分子のネットワークを紐解いていく予定である。なお、本研究計画では個体レベルでの ARF6 経路の高次神経機能における解明も目指していたが、これに関しては現在、ARF6-GEF 分子に対するターゲティングコンストラクトの作成し遺伝子欠損マウス作成を目指し継続中である。

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 27 件)

- 1) Sanda M, Ohara N, Kamata A, Hara Y, Tamaki H, Sukegawa J, Yanagisawa T, Fukunaga K, Kondo H, Sakagami H., Vezatin, a potential target for ADP-ribosylation factor 6, regulates the dendritic formation of hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* 印刷中 (2010) 査読有
- 2) Takaso M, Nakazawa T, Imura T, Okada T, Fukushima K, Ueno M, Takahira N, Takahashi K, Yamazaki M, Ohtori S, Okamoto H, Okutomi T, Okamoto M, Masaki T, Uchinuma E, Sakagami H. Surgical management of severe scoliosis with high risk pulmonary dysfunction in Duchene muscular dystrophy: patient function, quality of life and satisfaction. *International Orthopaedics* 印刷中 (2010) 査読有
- 3) Takaso M, Nakazawa T, Imura T, Fukushima K, Ueno M, Saito W, Shintani R, Sakagami H. 他 4 名, Less invasive and less technically demanding decompressive procedure for

- lumbar spinal stenosis – appropriate for general orthopaedic surgeons? *International Orthopaedics* 印刷中 (2010) 査読有
- 4) Théard D, Labarrade F, Partisani M, Milanini J, Sakagami H, 他 3 名 USP9x-mediated deubiquitination of EFA6 regulates de novo tight junction assembly. *EMBO J* 29:1499-1509 (2010) 査読有
 - 5) Takao K, Tanda K, Nakamura K, Kasahara J, Nakao K, Katsuki M, Nakanishi K, Yamasaki N, Toyama K, Adachi M, Umeda M, Araki T, Fukunaga K, Kondo H, Sakagami H, Miyakawa T., Comprehensive behavioral analysis of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV knockout mice. *PLoS ONE* (2010) e9460 査読有
 - 6) Katoh H, Hosono K, Ito Y, Suzuki T, Ogawa Y, Kubo H, Kamata H, Mishima T, Tamaki H, Sakagami H, 他 4 名. COX-2 and Prostaglandin EP3/EP4 Signaling Regulate the Tumor Stromal Proangiogenic Microenvironment via CXCL12-CXCR4 Chemokine Systems. *Am J Pathol.* 176:1469-1483 (2010) 査読有
 - 7) Kato S, Amano H, Ito Y, Eshima K, Aoyama N, Tamaki H, Sakagami H, 他 3 名 Effect of erythropoietin on angiogenesis with the increased adhesion of platelets to the microvessels in the hind-limb ischemia model in mice. *J Pharmacol Sci.* 112(2):167-175 (2010) 査読有
 - 8) Kubo H, Hosono K, Suzuki T, Ogawa Y, Kato H, Kamata H, Ito Y, Amano H, Kato T, Sakagami H, 他 5 名. Host prostaglandin EP3 receptor signaling relevant to tumor-associated lymphangiogenesis. *Biomed Pharmacother.* 64:101-106 (2010) 査読有
 - 9) Suzuki R, Saino-Saito S, Sakagami H, Toshimori K, Kondo H. Localization of EFA6A, a guanine nucleotide exchange factor for ARF6, in spermatogenic cells of testes of adult mice. *J Mol Histol.* 40:77-80 (2009) 査読有
 - 10) Sanda M, Kamata A, Katsumata O, Fukunaga K, Watanabe M, Kondo H, Sakagami H: The postsynaptic density protein, IQ-ArfGEF/BRAG1, can interact with IRSp53 through its proline-rich sequence. *Brain Res.* 1251:7-15 (2009) 査読有
 - 11) Yamagata Y, Kobayashi S, Umeda T, Inoue A, Sakagami H, 他 1 0 名 Kinase-dead knock-in mouse reveals an essential role of kinase activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha in dendritic spine enlargement, long-term potentiation, and learning. *J Neurosci.* 29(23): 7607-7618 (2009) 査読有
 - 12) Katsumata O, Ohara N, Tamaki H, Niimura T, Naganuma H, Watanabe M, Sakagami H. IQ-ArfGEF/BRAG1 is associated with synaptic ribbons in the mouse retina. *Eur. J. Neurosci.*, 30:1509-1516 (2009) 査読有
 - 13) Wang Y, Kakizaki T, Sakagami H, 他 7 名 Fluorescent labeling of both GABAergic and glycinergic neurons in VGAT-Venus transgenic mouse. *Neuroscience*, 164: 1031-1043 (2009) 査読有
 - 14) Nakamura K, Ichise H, Nakao K, Hatta T, Otani H, Sakagami H, 他 2 名: Partial functional overlap of the three ras genes in mouse embryonic development. *Oncogene.* 27: 2961-2968, 2008 査読有
 - 15) Sakagami H, Sanda M, Fukaya M, Miyazaki T, Sukegawa J, Yanagasawa T, Suzuki T, Fukunaga K, Watanabe M, Kondo H.: IQ-ArfGEF/BRAG1 is a guanine nucleotide exchange factor for Arf6 that interacts with PSD-95 at postsynaptic density of excitatory synapses. *Neurosci Res.* 60:199-212 (2008) 査読有
 - 16) Sakagami H: The EFA6 family: guanine nucleotide exchange factors for ADP ribosylation factor 6 at neuronal synapses. *Tohoku J. Exp. Med.* 214:191-198 (2008) 査読有
 - 17) Maeda K, Haraguchi M, Kuramasu A, Sato T, Ariake K, Sakagami H, 他 5 名: CLIC4 interacts with histamine H3 receptor and enhances the receptor cell surface expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 369: 603-608 (2008) 査読有
 - 18) Yamamoto N, Kaneko I, Motohashi K, Sakagami H, 他 9 名: Fatty acid-binding protein regulates LPS-induced TNF-alpha production in mast cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 79:21-6 (2008) 査読有
 - 19) Katsumata O, Honma T, Sanda M, Kamata A, Takeda S, Kondo H, Sakagami H. Predominant localization of EFA6A, a guanine nucleotide exchange factor for ARF6, at the perisynaptic photoreceptor processes. *Brain Res.* 1234:44-49 (2008) 査読有
 - 20) Moon IS, Sakagami H, Nakayama J, Suzuki T. Differential distribution of synGAPalpha1 and synGAPbeta isoforms in rat neurons. *Brain Res.* 1241: 62-75 (2008) 査読有
 - 21) Kamata A, Sakagami H, 他 4 名: Spatiotemporal expression of four isoforms of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I in brain and its possible roles in hippocampal dendritic growth. *Neurosci Res* 57: 86-97 (2007) 査読有
 - 22) Sakagami H, 他 5 名: Somatodendritic localization of EFA6A, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6, and its possible interaction with a-actinin in dendritic spines. *Eur. J. Neurosci* 25: 618-628 (2007) 査読有
 - 23) Ochiai N, Masumoto S, Sakagami H, Yoshimura Y, and Yamauchi T.: Rat leucine-rich protein binds and activates the promoter of the β isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II

- gene. *Neurosci. Res.*, 58:67-76 (2007) 査読有
- 24) Abdelwahab SA, Owada Y, Kitanaka N, Adida A, Sakagami H, Ono M, Watanabe M, Spener F, and Kondo H: Enhanced expression of adipocyte-type fatty acid binding protein in murine lymphocytes in response to dexamethasone treatment. *Mol Cell Biochem.* 299: 99-107 (2007) 査読有
- 25) Kakizawa S, Kishimoto Y, Hashimoto K, Miyazaki T, Furutani K, Shimizu H, Fukaya M, Nishi M, Sakagami H, 他 6 名: Junctophilin-mediated channel crosstalk essential for cerebellar synaptic plasticity. *EMBO J.* 26: 1924-1933 (2007) 査読有
- 26) Kamata A, Sakagami H, Tokumitsu H, Sanda M, Owada Y, Fukunaga K, and Kondo H: Distinct developmental expression of two isoforms of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases and their involvement in hippocampal dendritic formation. *Neurosci Lett.* 423:143-148 (2007) 査読有
- 27) Suyama S, Hikima T, Sakagami H, Ishizuka T and Yawo H: Synaptic vesicle dynamics in the mossy fiber-CA3 presynaptic terminals of mouse hippocampus. *Neurosci. Res.* 59; 481-490 (2007) 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- 1) 阪上洋行、低分子量 G タンパク質 Arf の活性化制御因子 synArfGEF の抑制性シナプス局在の分子機構 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2010 年 3 月 29 日 岩手
- 2) 阪上洋行、三田将、ARF6 の新たな相互結合タンパク質としての Vezatin の神経樹状突起における役割 第 32 回日本神経科学学会、2009 年 9 月 17 日 名古屋
- 3) 山肩葉子、小林静香、梅田達也、井上明宏、阪上洋行、他 10 名、Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ IIα 活性は海馬シナプス可塑性の構造的・機能的・行動学的発現に不可欠、第 32 回日本神経科学大会 2009 年 9 月 17 日 名古屋
- 4) 阪上洋行 ARF6 グアニンヌクレオチド交換因子 IQ-ArfGEF/BRAG1 は IRSp53 とシナプス後肥厚部で複合体を形成する 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008 年 3 月 27~29 日 大分
- 5) 勝又修、三田将、鈴木龍雄、阪上洋行 マウス網膜における ARF グアニンヌクレオチド交換因子 IQ-ArfGEF と synArfGEF の発現局在 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008 年 3 月 27~29 日 大分
- 6) 阪上洋行、三田将、福永浩司、IQ-ArfGEF/BRAG1 はシナプス後肥厚部で IRSp53 と複合体を形成する 第 30 回日本神経科学学会、2008 年 7 月 9~11 日、東京
- 7) 石川充、西嶋直紀、阪上洋行、他 2 名、アクチン結合性 MKL2 の突起形態と遺伝子発現における機能解析 第 30 回日本神経科学学会、2008 年 7

- 月 9~11 日、東京
- 8) 王英、柿崎利和、斉藤憲史、海老原利枝、阪上洋行、他 3 名、抑制性ニューロンに Venus 蛍光タンパク質を発現させたトランスジェニックマウス 第 30 回日本神経科学学会、2008 年 7 月 9~11 日、東京
- 9) 阪上洋行、鎌田暁史、三田将、IQ-ArfGEF/BRAG1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf1 and Arf6, forms a protein complex with PSD-95 and IRSp53 at postsynaptic density of excitatory synapses. 北米神経科学学会 2008 年 11 月 15~19 日 ワシントン D.C.
- 10) 三田将、福永浩司、阪上洋行、Vezatin is a possible downstream effector of ADP-ribosylation factor 6 that regulates dendritic formation. 北米神経科学学会 2008 年 11 月 15~19 日 ワシントン D.C.
- 11) 鎌田暁史、三田将、福永浩司、阪上洋行、Developmental expression of the CaMK cascade in hippocampus and its roles in the dendritic development of hippocampal neurons. 北米神経科学学会 2008 年 11 月 15~19 日 ワシントン D.C.
- 12) 歌大介、阪上洋行、他 4 名、Roles of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV on nociceptive transmission in substantia gelatinosa of the adult mouse spinal cord. 北米神経科学学会 2008 年 11 月 15~19 日 ワシントン D.C.
- 13) 三田将、福永浩司、近藤尚武、阪上洋行 ADP-リボシル化因子 6 の新規相互結合蛋白質 Pilt の発現解析 日本解剖学会関東支部会、2007 年 11 月 10 日 埼玉

[その他]

ホームページ:

<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/~sakagami/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪上 洋行 (SAKAGAMI HIROYUKI)
北里大学・医学部・教授
研究者番号: 90261528

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし