

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03256

研究課題名(和文) ガイダンスシグナルのハブ分子としての低分子量G蛋白質R-Rasの機能解析

研究課題名(英文) Elucidation of R-Ras function as a signaling hub

研究代表者

生沼 泉 (Oinuma, Izumi)

兵庫県立大学・理学研究科・教授

研究者番号：40452297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：R-Ras, TC21(R-Ras2), M-Ras(R-Ras3) は「R-Rasサブファミリー」に属する低分子量Gタンパク質である。R-Rasサブファミリーは細胞形態制御などに関与することが知られているが、その仕組みや生理的役割は詳しく調べられていない。本研究では、R-Rasサブファミリーが神経回路構築に於いて果たす役割を調べる目的で、脳神経組織における発現パターンを詳細に調べた。さらに、海馬神経細胞や網膜の発生・発達過程におけるR-Rasサブファミリーの生理的役割の解明を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、R-Rasサブファミリーのメンバーの1つであるTC21が、海馬神経細胞のシナプス形成や、発生期の網膜細胞の分化に関与することが明らかになった。一方で、別のメンバーであるR-Rasは神経細胞の軸索伸長に関与している。このことから、R-Rasサブファミリーのメンバーは互いにアミノ酸配列の相同性が高く、生化学的性質が類似しているものの、それぞれが神経回路構築において独自の生理的役割を担うと考えられた。これらの知見は、R-Rasサブファミリー低分子量Gタンパク質を介したシグナル伝達の新規の概念を提唱するものである。

研究成果の概要(英文)：The R-Ras subfamily small GTPases includes R-Ras, TC21 (R-Ras2), and M-Ras (R-Ras3). Although previous studies showed that they regulate cell morphology, the underlying mechanisms and their physiological functions have not been well studied. To study the roles of the R-Ras subfamily small GTPases in neural circuit formation, we examined their detailed expression patterns in neural tissues. Moreover, we tried to analyze their physiological functions in the primary hippocampal neurons and the developing retina.

研究分野：細胞生物学

キーワード：低分子量Gタンパク質 R-Ras TC21 M-Ras 神経細胞 網膜 発生 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は周辺の誘引性・反発性の複数因子を同時に感知し、それらの情報を統合することで、最終的に神経突起の伸長度合いや方向の判断を下すが、その情報統合の分子メカニズムは不明である。我々はこれまで低分子量 G タンパク質 R-Ras に着目し、反発性ガイダンス因子 Sema4D の受容体である Plexin-B1 の細胞内領域が、R-Ras に対する直接の不活性化因子 GAP (GTPase-activating protein) をコードしており、R-Ras の働きにブレーキをかけることを報告してきた (Oinuma *et al.*, *Science* **305**, 862 (2004))。逆に、誘引性ガイダンス因子は神経細胞内で R-Ras 活性上昇を引き起こすことも明らかにしている。つまり、R-Ras は誘引性・反発性の様々なガイダンス因子シグナルを統合する「シグナルハブ分子」として機能し、神経細胞の形態制御において重要な役割を果たす分子と言える。しかしながら、R-Ras を介したシグナル伝達の実態には未だ不明な点が多い。

また R-Ras は、TC21 (R-Ras2)、M-Ras (R-Ras3) と「R-Ras サブファミリー」を構成する。これら 3 種類の低分子量 G タンパク質はアミノ酸配列の相同性が高く、互いに機能が重複していると考えられているが、いずれの場合もその生理的役割や、上流・下流のシグナル伝達経路はあまり解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、R-Ras サブファミリー低分子量 G タンパク質を介した細胞形態制御の分子メカニズムを解明し、さらに、神経組織における R-Ras サブファミリー活性制御の *in vivo* での生理的役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 初代培養神経細胞における R-Ras サブファミリーの発現パターンの解析

R-Ras サブファミリーの発現パターンを調べるために、まず市販の特異的抗体を用いた免疫染色を試みたが、使用した市販抗体の感度ならびに特異性が十分ではなく、信頼出来るデータが得られなかった。そこで、TC21 に対するペプチド抗体を独自に作製した。

(2) マウス臓器における R-Ras サブファミリーの発現パターンの解析

内在性の R-Ras、TC21、M-Ras タンパク質それぞれにエピトープタグを付加し、タグを認識する特異的抗体で検出する系を新規に構築した。具体的には、HA タグ配列を *R-Ras*、*TC21*、*M-Ras* それぞれの遺伝子座の開始 ATG の直後に挿入した「エピトープタグノックインマウス」を、CRISPR/Cas9 システムを用いたマウス受精卵のゲノム編集によって樹立した。

(3) 海馬神経細胞の発生・発達過程における TC21 の役割の解析 (*in vitro*)

R-Ras サブファミリーに属する低分子量 G タンパク質のうち、海馬および大脳皮質に強い発現が見られた TC21 について解析を進めた。実験にはラット脳より調製した初代培養海馬神経細胞を用い、活性化型 *TC21* 変異体遺伝子の強制発現ベクターや、*TC21* shRNA ノックダウンベクターを細胞に導入し、機能獲得実験・機能喪失実験を行った。

(4) 網膜細胞の発生・発達過程における TC21 の役割の解析 (*in vivo*)

活性化型 *TC21* 変異体遺伝子の強制発現ベクターや、*TC21* shRNA ノックダウンベクターを生体内エレクトロポレーション法を用いてマウス新生仔の網膜細胞に導入し、発生・発達過程の網膜内での機能獲得・機能喪失実験を行った。

4. 研究成果

(1) 初代培養神経細胞における R-Ras サブファミリーの発現パターンの解析

R-Ras サブファミリー低分子量 G タンパク質のうち、R-Ras は主に軸索伸長期に高い発現が見られ、活性が高く維持されていた。M-Ras は樹状突起伸長期に高い発現が見られ、活性が高く維持されていた。これに対比して、TC21 は樹状突起が分岐シナプス形成をする時期に高い発現

が見られた。初代培養海馬神経細胞を対象にさらに TC21 の発現パターンを詳細に解析すると、樹状突起フィロポディアの萌出時期に最も発現が高く維持されていた。

(2) マウス臓器における R-Ras サブファミリーの発現パターンの解析

樹立した HA タグノックインマウスの臓器を Western blot 法により解析したところ、抗 HA 抗体によって特異的なバンドが検出された。また、ノックインマウスの臓器切片を抗 HA 抗体を用いた免疫組織化学法によって解析したところ、特異的かつ高感度でシグナルを検出することが出来た。この手法を用いてマウスの脳や眼球の組織切片における R-Ras サブファミリー3分子の発現パターンを調べたところ、それぞれの発現パターンは同一ではないが、比較的類似していることが判った。大脳の中では TC21 は海馬で強く発現していた。網膜内では TC21 はミューラーグリア細胞に強く発現していた。

(3) 海馬神経細胞の発生・発達過程における TC21 の役割の解析 (*in vitro*)

初代培養海馬神経細胞のシナプス形成における TC21 の役割を解析した。shRNA を用いた TC21 のノックダウンにより、神経細胞内在性の TC21 の欠失でフィロポディア形成およびその後の PSD95-positive なスパイン形成が阻害された。さらに、ラット成体脳からシナプス画分を抽出し、Western blot 法により解析したところ、Triton 可溶性の画分に TC21 が濃縮されていた。

(4) 網膜細胞の発生・発達過程における TC21 の役割の解析 (*in vivo*)

TC21 がマウスの網膜発生 (*in vivo*) において果たす役割を調べるために、生体内エレクトロポレーション法を用いて活性化型 TC21 変異体遺伝子をマウス新生仔の網膜で強制発現させたところ、GFP のみを発現させたコントロールの網膜細胞と比較してミューラーグリア細胞の割合が顕著に増加していた。一方、shRNA を用いて TC21 の発現をノックダウンすると、未分化網膜前駆細胞から視細胞への分化が抑制された。

(5) 遺伝子発現 ON/OFF 制御システムの開発

神経細胞の初代培養 (*in vitro*) や、生体マウスの脳神経組織内 (*in vivo*) で R-Ras サブファミリーの遺伝子機能をより詳細に解析するために、細胞に一過性に導入した外来遺伝子の発現の ON/OFF 制御システムを開発した。具体的には、既存の薬剤依存性遺伝子発現 ON/OFF 制御システムを改良し、精密・迅速・可逆的な遺伝子発現 ON/OFF 制御を可能にしたシステムを確立した。さらに、このシステムが神経細胞の初代培養 (*in vitro*) ならびに生体マウスの脳神経組織 (*in vivo*) に適用可能であることを示した。

(6) 今後の展望

本研究により、R-Ras サブファミリー低分子量 G タンパク質のメンバーである TC21 が、海馬神経細胞のシナプス形成や、網膜発生に重要であることが明らかになった。今後、同様の手法で他の R-Ras サブファミリーメンバーの機能解析も行き、各メンバーの生理的役割や、R-Ras サブファミリーを介するシグナル伝達の全体像を解明する計画である。

また、R-Ras サブファミリーの発現解析により、各メンバーの臓器内での発現パターンが互いに類似していることも明らかになってきた。生体内では各メンバー間での機能的相補が起きていると考えられており、メンバーの遺伝子 1 種類をノックアウト (KO) しただけでは表現系が観察されない可能性がある。今後、R-Ras サブファミリーの各メンバーの遺伝子をダブル、トリプルで KO する実験も重要になると予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田孝彦、生沼泉
2. 発表標題 エピトープタグノックインマウスを用いたR-Rasサブファミリー低分子量Gタンパク質の発現解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田孝彦、生沼泉
2. 発表標題 精密・迅速・可逆的な遺伝子発現ON/OFF制御システムの開発と神経発生研究への適用
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田孝彦、生沼泉
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いたマウス中枢神経系における内在性蛋白質の蛍光標識と発現動態の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究代表者のresearchmapのサイト
https://researchmap.jp/izumi_oinuma

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------