

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22300114

研究課題名(和文)抑制性シナプスの新たな制御経路としての低分子量G蛋白質ARF6の機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of the BRAG3-Arf6 pathway in the inhibitory synapse

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円、(間接経費) 4,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞膜とエンドゾーム間の小胞輸送を制御する低分子量Gタンパク質ADP リボシル化因子6(ARF6)の抑制性シナプスにおける新規機能の解明を目的とし解析した結果、ARF6 活性化制御分子BRAG3(別名、IQSEC3、synArfGEF)が、ジストロフィンやSCAM-1などの裏打ちタンパク質との結合を介して抑制性シナプス後膜に特異的に局在することを見出した。また、網膜において、BRAG3がグリシン作動性とGABA作動性シナプスの一部に局在することを明らかにした。これらの所見により、BRAG3-ARF6経路が抑制性シナプス後膜の新たな制御経路である可能性を示す解剖学的な基盤を提示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to provide anatomical evidence for the BRAG3-Arf6 pathway as a novel regulator of membrane traffic and actin cytoskeleton in the inhibitory synapse. First, we immunohistochemically demonstrated that BRAG3 localizes preferentially at postsynaptic specializations of symmetric synapses. Using yeast two-hybrid and pull down assays, we identified that BRAG3 can interact with utrophin/dystrophin and S-SCAM/MAGI-2, scaffolding proteins that localize at inhibitory synapses. Taken together, these findings suggest that BRAG3 may regulate the membrane traffic and actin cytoskeleton at inhibitory synapses through the interaction with scaffold proteins such as dystrophin and S-SCAM.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：抑制性シナプス 低分子量GTP結合タンパク質 シナプス後肥厚部

1. 研究開始当初の背景

神経機能は、興奮性入力と抑制性入力との精巧なバランスにより成立しており、神経回路の形成やシナプス機能の障害による過剰な入力の亢進や低下が、高次神経機能障害を伴う多くの精神神経疾患の発症に関わることが知られている。興奮性シナプスは、学習や記憶の細胞レベルでのモデルとして想定されるシナプス長期増強や長期抑圧などのシナプス可塑性の場として、精力的な研究がなされてきた。特に、興奮性シナプス後肥厚部(PSD)の生化学的精製法の確立とプロテオミクス解析法の目覚ましい進展により、興奮性シナプス後膜でのグルタミン酸受容体シグナル複合体をはじめとする多数の分子構成が次々と明らかになり、興奮性シナプスにおけるシナプス可塑性の制御機構の理解が飛躍的に進んでいる。一方、抑制性シナプスの PSD の精製が技術的に困難であることや抑制性シナプスの多様性から、その分子素子の解明が大きく立ち後れており、研究開始当時、抑制性シナプス後膜を構成する分子として、GABA 受容体やグリシン受容体などの抑制性神経伝達物質受容体の他は、neuroligin-2, 4 や β -dystroglycan などの細胞接着分子や S-SCAM, dystrophin, gephyrin などの足場蛋白質、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rac, Cdc42 の活性制御因子 collybistin しか知られておらず、抑制性シナプス後膜におけるシグナル制御機構に関する知見は限られたものであった。

本研究代表者は、細胞膜とエンドゾーム間の小胞輸送とアクチン骨格制御に関与することが知られている低分子量 GTP 結合タンパク質である ADP リボシル化因子 6 (Arf6) の神経系における機能と活性制御機構を一貫して研究してきた。神経細胞において、Arf6 は、軸索や樹状突起の分岐、棘突起の形成、シナプス前膜でのシナプス小胞の取り込み、海馬シナプス長期抑圧などに関与し、そ

の活性化には EFA6 (Exchange factor for Arf6) ファミリーや BRAG (Brefeldin A-resistant Arf-GEF) などに属する多様なグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)の存在が知られている。研究代表者らの一連の発現解析により、BRAG1 や EFA6A などの Arf6-GEF 分子の多くは、興奮性シナプス PSD 分画に豊富に局在するのに対して、BRAG3 (別称として synArfGEF、IQSEC3)が抑制性シナプスのシナプス後膜に局在することを見出した。興奮性シナプスにおいて Arf6 が、小胞輸送制御を介して、AMPA 型グルタミン酸受容体や細胞接着分子 telencephalin のシナプス発現調節することから、抑制性シナプスにおいて、BRAG3-Arf6 経路が抑制性神経伝達物質受容体や細胞接着分子の小胞輸送制御を介して、抑制性シナプスの機能を調節する新たな制御経路として機能する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

このような研究背景のなか、本研究は、BRAG3-Arf6 経路の抑制性シナプスにおける機能の解明を目指して、以下の点に着目して研究を行った。

(1) BRAG3 の抑制性シナプスにおける局在解析：BRAG3 特異抗体を用いて免疫電子顕微鏡解析によりシナプス微細構造における局在を明確にする。

(2) BRAG3 の抑制性シナプスにおける分子ネットワークの解明：BRAG1 や EFA6A などの他の Arf6-GEF が興奮性シナプス PSD に局在するのに対して、BRAG3 が抑制性シナプス後膜に局在する分子機構と分子ネットワークを酵母ツーハイブリット法により明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BRAG3 の細胞内局在解析：大腸菌融合発現タンパク質他の Arf6-GEF と相同性の低い BRAG3 の領域を抗原として用いて特異抗体を作製し、成熟期 C57BL6 マウスの脳を用いて免疫組織学的解析を行った。

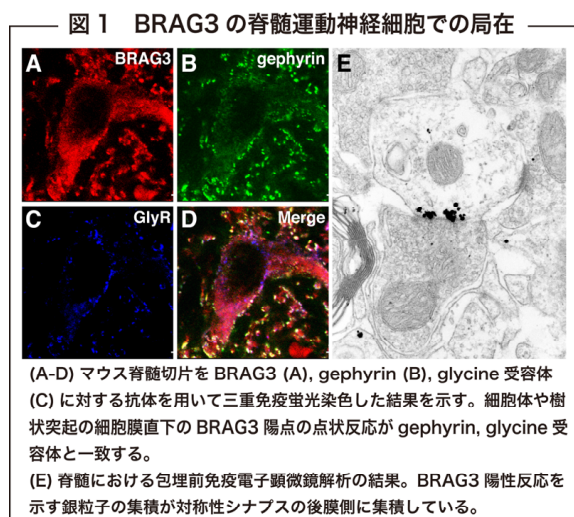
(2) 酵母ツーハイブリット法による BRAG3 の相

互結合分子の同定：BRAG3 及び恒常活性化型 Arf6 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、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。

4. 研究成果

(1) BRAG3 の抑制性シナプス後膜における局在：

他の Arf6-GEF と相同性の低い BRAG3 の N 末領域(1-293aa)を抗原として作製した特異抗体を用いて、4%パラホルムアルデヒド固定した成熟期 C57BL6 マウス脳を用いて免疫組織化学法を用いて発現解析を行った。その結果、既報の遺伝子発現様式に一致した脳領域に免疫反応が認められ、細胞体や樹状突起の細胞膜直下に点状の免疫陽性反応として検出された。多重蛍光免疫染色法により、BRAG3 の点状反応は興奮性シナプスに局在する PSD-95 や BRAG1 とは一致せず、抑制性シナプスに局在する gephyrin や GABA(A) 受容体やグリシン受容体と一致することより抑制性シナプスに局在することが明らかになった。さらに銀増感法による包埋前免疫電子顕微鏡解析法により、BRAG3 が対称性シナプスのシナプス後膜直下に局在することが明らかになった(図1)。抑制性シナプス後膜の低分子量 GTP 結合タンパク質制御分子としては、Rac/Cdc42 の GEF である collybistin 分子がこれまで報告されていたが、今回の結果は、BRAG3 が抑制性シナプス後膜に局在する低分子量 GTP 結合タンパク質制御分子の第 2 番目の分子であり、免疫電子顕微鏡レベルでの証明された初めての分子である (Fukaya et al., J. Neurochem., 2011)



(2) 網膜における BRAG3 の局在解析

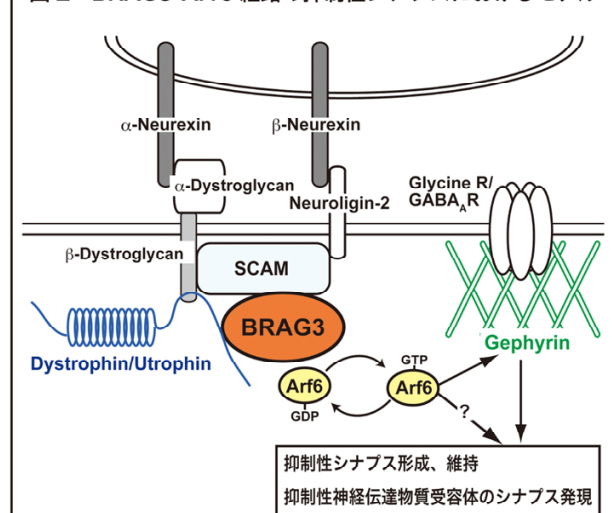
網膜における Arf6-GEF の局在に関するこれまでの解析により、BRAG1 が光感受細胞のシナプスリボンの構成分子であること、EFA6A と BRAG2 が光感受細胞のリボンシナプスの突起先端付近に局在することなど Arf6-GEF が多様なシナプス局在を示すことを明らかにしてきた。網膜は、非常に明瞭な神経回路を持ち、グリシン作動性と GABA 作動性シナプスが相互排他的に存在することより、網膜における BRAG3 の局在解析を行った。その結果、BRAG3 は、網膜の内網状層において抑制性シナプス後膜足場蛋白質 gephyrin とよく共存する点状の免疫陽性反応を示した。免疫電子顕微鏡解析により、アマクリン細胞の神経終末が形成する対称性シナプスのシナプス後膜直下に BRAG3 が局在することが明らかになった。さらに、グリシン受容体及び GABA 受容体 $\alpha 1$ サブユニットとの二重染色法により検討した結果、BRAG3 の免疫陽性点状構造物はグリシン受容体及び GABA 受容体 $\alpha 1$ サブユニット陽性反応の 61.3%及び 41.7%に一致した。以上の結果から、BRAG3 は一部のグリシン作動性と GABA 作動性シナプスのシナプス後膜に局在し、抑制性シナプスにおいて修飾的な機能に関与する可能性が示唆された。(Sakagami et al., J. Comp. Neurol., 2013)

(3) 酵母ツーハイブリット法による BRAG3 の相互結合分子の同定：

BRAG3 の抑制性シナプスへの局在機構の解明の一助として、BRAG3 の C 末端 73 アミノ酸を餌にして脳 cDNA ライブラリーを用いて酵母ツーハイブリット法により結合分子を探索した。その結果、utrophin 分子が単離された。Utrophin 分子の脳での発現量は低く、dystrophin 分子と構造上相似性が高く、dystrophin は抑制性シナプス後膜での足場タンパク質として機能していることが知られていることから、dystrophin との結合の可能性をさらに酵母ツーハイブリット法で検討した。その結果、BRAG3 は utrophin と同様に dystrophins と結合しうることが明らかになった。また、BRAG3 はプロリンリッチ領域を介して utrophin の WW 領域と結合していることを明らかにした。海馬初代培養細胞において、二重染色法により BRAG3 と dystrophin が抑制性シナプスにおいて共局在することより、BRAG3 は dystrophin と抑制性シナプスで複合体を形成する可能性が強く示唆された。さらに、BRAG3 の C 末端にはタイプ 1 PDZ 結合モチーフを持つことより、抑制性シナプス後膜の足場タンパク質として知られている PDZ タンパク質である S-SCAM 分子との結合の可能性を、GST 融合タンパク質を用いた結合実験により検討した。その結果、BRAG3 は、S-SCAM の PDZ1 領域と WW 領域を含む領域 (295-578aa) と結合することを見出した。二重免疫染色法により、BRAG3 と S-SCAM が小脳分子層において共局在することを明らかにした。以上の結果より、BRAG3 は抑制性シナプスにおいて、足場タンパク質である dystrophin や S-SCAM と複合体を形成する可能性が強く示唆された。Dystrophin 欠損マウス (mdx) において、抑制性シナプスにおける GABA(A) 受容体の集積に障害が認められることから、dystrophin 分子の抑制性シナプス形成への機能関与が報告されている。今回の結果から、BRAG3 が dystrophin とともに

抑制性シナプス形成に関与する可能性が考えられた (図 2) (Fukaya et al., *J. Neurochem.* 2011)。

図 2 BRAG3-Arf6 経路の抑制性シナプスにおけるモデル



5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕 (計 30 件)

- 1) Moriguchi S, Tagashira H, Sasaki Y, Yeh JZ, Sakagami H, Narahashi T, Fukunaga K. CaMKII activity is essential for improvement of memory-related behavior by chronic rivastigmine treatment, *J. Neurochem.* 128:927-937 (2014) 査読有 doi: 10.1111/jnc.12510.
- 2) Fukaya M, Fukushima D, Hara Y, Sakagami H. EFA6A, a guananine nucleotide exchange factor for Arf6, interacts with sorting nexin-1 and regulates neurite outgrowth, *J. Neurochem.* 129:21-36 (2014) 査読有 doi: 10.1111/jnc.12524.
- 3) Yazaki Y, Hara Y, Tamaki H, Fukaya M, Sakagami H. Endosomal localization of FIP3/Arfophilin-1 and its involvement in dendritic formation of mouse hippocampal neurons. *Brain Res.* 1557:55-65 (2014) 査読有 doi: 10.1016/j.brainres.2014.
- 4) Sakagami H, Katsumata O, Hara Y, Tamaki H, Watanabe M, Harvey RJ, Fukaya M. Distinct synaptic localization patterns of brefeldin A-resistant guanine nucleotide exchange factors BRAG2 and BRAG3 in the mouse retina. *J.*

- Comp. Neurol.* 521: 860-876 (2013) 査読有 doi: 10.1002/cne.23206.
- 5) Song N, Nakagawa S, Izumi T, Toda H, Kato A, Boku S, Inoue T, Sakagami H, Li X, Koyama T. Involvement of CaMKIV in neurogenic effect with chronic fluoxetine treatment. *Int J Neuropsychopharmacol.* 16(4):803-812 (2013) 査読有 doi:10.1017/S1461145712000570.
- 6) Ueda T, Hanai A, Takei T, Kubo K, Ohgi M, Sakagami H, Takahashi S, Shin HW, Nakayama K. EFA6 activates Arf6 and participates in its targeting to the Flemming body during cytokinesis. *FEBS Lett.* 583:1617-1623 (2013). 査読有 doi: 10.1016/j.febslet.2013.03.042.
- 7) Hara Y, Fukaya M, Tamaki H, Sakagami H. Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase γ is required for neuronal migration in the mouse developing cerebral cortex. *Eur. J. Neurosci.*, 38: 2659-2671 (2013) 査読有 doi: 10.1111/ejn.12286.
- 8) Pan YW, Zou J, Wang W, Sakagami H, Garelick MG, Abel G, Kuo CT, Storm DR, Xia Z. Inducible and Conditional Deletion of Extracellular Signal-regulated Kinase 5 Disrupts Adult Hippocampal Neurogenesis. *J Biol Chem.* 287(28):23306-23317 (2012) 査読有 doi: 10.1074/jbc.M112.344762.
- 9) Tamaki H, Sanda M, Katsumata O, Hara Y, Fukaya M, Sakagami H. Pilt is a coiled-coil domain-containing protein that localizes at the trans-Golgi complex and regulates its structure. *FEBS Lett.*, 586:3064-3070 (2012) 査読有 doi: 10.1016/j.febslet.2012.07.051.
- 10) Nakata Y, Yasuda T, Fukaya M, Yamamori S, Itakura M, Nihira T, Hayakawa H, Kawanami A, Kataoka M, Nagai M, Sakagami H, Takahashi M, Mizuno Y, Mochizuki H. Accumulation of a-synuclein triggered by presynaptic dysfunction. *J. Neurosci.* 32:17186-17196 (2012) 査読有 doi: 10.1523/JNEUROSCI.2220-12.2012.
- 11) Pokorski M, Sakagami H, Okada Y. Calcium/calmodulin-dependent protein kinases in the carotid body: an immunohistochemical study. *Springerplus.* 1:16 (2012). 査読有 doi: 10.1186/2193-1801-1-16. eCollection 2012.
- 12) Fukaya M, Kamata A, Hara Y, Tamaki H, Katsumata O, Ito N, Takeda S, Hata Y, Suzuki T, Watanabe M, Harvey RJ, Sakagami H. SynArfGEF is a guanine nucleotide exchange factor for Arf6 and localizes preferentially at post-synaptic specialization of inhibitory synapses. *J. Neurochem.* 116:1122-1137 (2011) 査読有 doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07167.x.
- 13) Yamamori S, Itakura M, Sugaya D, Katsumata O, Sakagami H, Takahashi M. Differential expression of SNAP-25 family proteins in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 519:916-932 (2011) doi: 10.1002/cne.22558.
- 14) Nishimaru H, Sakagami H, Kakizaki M, Yanagawa Y. Locomotor-related activity of GABAergic interneurons localized in the ventrolateral region in the isolated spinal cord of neonatal mice. *J Neurophysiol.* 106(4):1782-1792 (2011) 査読有 doi: 10.1152/jn.00385.2011.
- 15) 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.* 67(2):126-136 (2010) 査読有 doi: 10.1016/j.neures.2010.02.008.

- 16) 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* e9460, (2010) 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0009460.
- 17) Théard D, Labarrade F, Partisani M, Milanini J, Sakagami H, Fon EA, Wood SA, Franco M, Luton F, USP9x-mediated deubiquitination of EFA6 regulates de novo tight junction assembly. *EMBO J* 29:1499-1509, (2010) 査読有 doi: 10.1038/emboj.2010.46.
- 18) Ishikawa M, Nishijima N, Shiota J, Sakagami H, Tsuchida K, Mizukoshi M, Fukuchi M, Tsuda M, Tabuchi A., Involvement of the serum response factor coactivator megakaryoblastic leukemia (MKL) in the activin-regulated dendritic complexity of rat cortical neurons. *J Biol Chem.* 285:32734-32743, (2010) 査読有 doi: 10.1074/jbc.M110.118745.
- 19) Tokumitsu H, Hatano N, Tsuchiya M, Yurimoto S, Fujimoto T, Ohara N, Kobayashi R, Sakagami H, Identification and characterization of PRG-1 as a neuronal calmodulin-binding protein. *Biochem J.* 43:81-91, (2010) 査読有 doi: 10.1042/BJ20100637

[学会発表] (計 23 件)

- 1) 深谷昌弘、阪上洋行、海馬錐体細胞の棘突起内部における低分子量 G タンパク質 Arf6 のペリシナプス性局在、第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 3 月 28 日、自治医大
- 2) 原芳伸、深谷昌弘、阪上洋行、脳層形

成における低分子量 GTP 結合タンパク質 Arf6 の機能的役割、第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 3 月 29 日、自治医大

- 3) 阪上洋行、福島大輔、深谷昌弘、スパインにおける Arf6 活性化制御因子 EFA6A と sorting nexin-1 との相互作用、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 21 日、京都
- 4) 阪上洋行、シナプス局在からみた Arf6 グアニンヌクレオチド交換因子の分子多様性の機能的意義、第 86 回日本生化学大会 2013 年 9 月 13 日横浜
- 5) 原芳伸、阪上洋行、Expression and functional roles of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5K) γ in the developing cerebral cortex. 欧州神経科学会 2012 年 7 月 15 日バルセロナ
- 6) 阪上洋行、原芳伸、深谷昌弘、DISTINCT LOCALIZATION OF THE BRAG/IQSEC FAMILY OF GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTORS FOR ARF6 IN THE MOUSE RETINA. 欧州神経科学会議 2012 年 7 月 15 日 バルセロナ

[その他]
ホームページ等

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
玉木 英明 (TAMAKI HIDEAKI)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：30155246
- 原 芳伸 (HARA YOSHINOBU)
北里大学・医学部・助教
研究者番号：40558467