

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790285

研究課題名(和文) 高次生命機能システムを支えるエキソサイトーシスのしくみ

研究課題名(英文) The role of exocytosis in biological functions

研究代表者

坂根 亜由子 (SAKANE, Ayuko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：60509777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：高次生命機能システムの獲得や発現・維持は、細胞外の環境に応じて細胞同士が情報交換し、個々の細胞機能が系全体として統括されることによって成立する。細胞内小胞輸送の主要経路であるエキソサイトーシスは、その統括機構の本体として重要な役割を担っていると考えられる。本研究は、器官形成時の細胞間接着形成および神経発生・再生時の神経突起伸長・シナプス形成に注目し、高次生命機能システムの獲得におけるエキソサイトーシスの制御機構を明らかにすることを目的とする。

研究成果の概要(英文)：Organization of individual cellular function as a whole system through receiving signals from extracellular environment and communicating with neighbors is vital for acquisition, expression, or maintenance of biological functions. Exocytosis, which is a one of main pathway of intracellular vesicular trafficking is taken as a pivotal factor to support the processes of the organization. In this study, we focus on the role of exocytosis in the formation of cell-cell contacts, neurite outgrowth, and the synapse formation leading to the organogenesis, or development and regeneration of neuronal system. We especially analyze the function of Rab family small G proteins and the related proteins and throw light on the molecular mechanisms of acquisition of biological functions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：高次生命機能システム エキソサイトーシス 細胞間接着形成 神経突起伸長・シナプス形成 Rabファミリー低分子量G蛋白質

1. 研究開始当初の背景

神経系や内分泌系、免疫系をはじめとする高次生命機能システムを発現・維持するためには、担当細胞同士が互いに連絡を取り合い、細胞外環境に応じて個々の細胞の機能発現が系全体として統括されることが必要となる。こういった細胞の外部との情報のやりとりの調節においては、機能分子の細胞膜への輸送を担うエキソサイトーシスが主要な役割を果たしている。例えば、個々の細胞が外部からの情報を受信するためには、その情報に対する受容体が細胞膜に輸送されて外部に露出されなければならない。また、外部へ情報を発信する際には、細胞内で合成された神経伝達物質やホルモン、サイトカインなどの情報伝達物質を含んだ小胞が細胞膜に輸送されて放出される必要がある。さらに、高次生命機能システムを支えるには、単にこれらの機能分子が輸送されるだけでなく、輸送される量やタイミング、場所を厳密に調節する機構が非常に重要となるが、その本体はエキソサイトーシスの制御機構と考えられる。同様に、発生・分化の過程において高次生命機能システムを獲得する際にも、エキソサイトーシスが重要となる。例えば、組織や器官が形成される際には、まず、ある特定の細胞が別の細胞から放出されたケモカインや細胞増殖因子などに誘導されて目的地へと移動していく。その後、集まってきた細胞同士が互いを認識して接着し、複雑な機能を果たす高次構造を造り出していく。神経組織の場合は、多数の神経細胞のひとつひとつが突起を伸長させて離れた場所にある別の定められた神経細胞と出会うシナプスを形成し、高次に張り巡らされた神経回路網を構築していく。これらの過程では、受容体や細胞基質間あるいは細胞間接着分子等の膜貫通蛋白質が正しいタイミングで細胞膜の限局された場所へとエキソサイトーシスされなければならない。さらに、この時、外部からの情報の多くは膜貫通蛋白

質を介して細胞内の多数の情報伝達分子群や細胞骨格系分子群に伝えられ、その結果、外部環境に応じた細胞内環境が造りだされるが、これもエキソサイトーシスによりこれらの分子群が関連する膜貫通蛋白質とともに機能部位の膜直下に輸送されて濃縮することによって考えられる。一方、エキソサイトーシスをはじめとする細胞内小胞輸送の代表的な制御系としてRabファミリー低分子量G蛋白質 (Rab) が知られている。Rabはヒトでは60以上のメンバーから構成され、それぞれが小胞輸送の様々な経路を特異的に制御していることが明らかになりつつある。研究代表者は、これまでにエキソサイトーシス経路を制御するRab3とRab13およびそれらの関連蛋白質群に注目した研究を行ってきており、これらの研究成果に基づいて上皮細胞間接着形成および神経細胞の突起伸長やシナプス形成におけるエキソサイトーシスの役割と制御機構を明らかにすることで高次生命機能システムの獲得過程の理解に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、高次生命機能システムの獲得のうち、特に、器官形成時に上皮細胞が互いに接着する過程および神経発生・再生時に神経細胞が突起を伸長させてシナプスを形成する過程に注目し、そこでのエキソサイトーシスの制御機構についての研究を展開する。研究代表者の所属する研究グループは、これまでに Rab13 の標的蛋白質である JRAB/MICAL-L2 を見出し、Rab13-JRAB 系が上皮細胞において細胞間接着分子の細胞膜への輸送を介して細胞間接着を制御していることを明らかにしている。また、研究代表者は、Rab13-JRAB 系が神経様細胞株である PC12 細胞において神経突起の伸長に関与していることを示している (*Mol. Cell. Biol.*, 2010)。一方、研究代表者は、これまでに Rab3 の活性制御蛋白質 Rab3 GAP のノックアウトマウス (KO) を用いた個体レベルの解析から

Rab3 GAP が神経伝達物質の放出を介して高次神経機能に関与することを明らかにしているが (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006)、最近、Rab3 系の神経発生やシナプス形成への関与が報告されている。このような上皮細胞における接着分子の輸送や神経細胞における突起伸長・シナプス形成といった過程を経て個々の細胞機能はさらに高次の階層へと統合されていくが、いずれの細胞においても細胞外からの情報を受信する受容体や接着分子のエキソサイトーシスとそれに伴う下流の細胞内情報伝達分子群や細胞骨格系分子群等の多くの機能分子の膜直下への輸送が非常に重要であると考えられる。また、上皮細胞間接着やシナプス形成の異常は、がんの転移や種々の精神・神経疾患等につながるが、これらはエキソサイトーシスの制御機構の異常が原因となっている可能性が充分にある。そこで、本研究では、上皮細胞における細胞間接着および神経細胞における神経突起伸長・シナプス形成を支えるエキソサイトーシスの制御機構について、Rab13-JRAB 系や Rab3 系を中心に解析するとともに、その制御機構の破綻に起因する種々の疾患の病態の解明を目指す。

3 . 研究の方法

本研究では、高次生命機能システムの獲得過程のうち、特に、器官形成時の細胞間接着形成および神経発生・再生時の神経突起伸長・シナプス形成において重要な役割を果たすエキソサイトーシスの制御機構を解析する。その際、研究代表者が、これまでに本制御機構の鍵を握る制御系であることを明らかにしつつある Rab13-JRAB 系と Rab3 系に注目し、前者については、1) 神経突起伸長・シナプス形成時に輸送する cargo の同定と機能解析、2) 細胞外環境に応じた Rab13-JRAB 系の機能修飾、3) 機能分子のエキソサイトーシスと細胞骨格制御とのクロストーク機構、4) 細胞運動・接着との関連、について解析を行う。

後者については、5) 特に研究代表者の所属するグループが新たに作製した Rab3 系の関連分子である Rabconnectin-3 の KO マウスを用いたシナプス形成における機能解析を行う。

4 . 研究成果

(1) Rabconnectin-3 は、シナプス小胞輸送を制御することが確立している Rab3A の活性制御蛋白質に結合するシナプス小胞巨大蛋白質である。本研究では、Rabconnectin-3 および-3 の両サブユニットの KO マウスの解析を進めた。その過程で、本蛋白質が胚発生の非常に初期の段階に関与することを示唆する結果が得られた。

(2) 本研究では、細胞間接着形成に先立つ、または伴うダイナミックなアクチン細胞骨格の再編成と細胞間接着が構築された後の安定的なアクチン細胞骨格の制御が、Rab13 との結合に依存した JRAB の構造変化 (open form と closed form) によって精巧に調節されていることを示した。これまでに JRAB の open form に特異的に結合する分子としてアクチン結合蛋白質である actinin-1 や actinin-4 を見出していたが、本研究では、別のアクチン結合蛋白質である filamin を同定することに成功した。さらに、NIH3T3 細胞において JRAB-filamin の機能解析を進め、JRAB がその構造依存的に filamin との相互作用を変化させながら NIH3T3 線維芽細胞におけるアクチン細胞骨格の再編成を制御して細胞の形態変化 (cell spreading) を引き起こすことを明らかにした。本研究の成果から、現段階では、接着分子を運んできた Rab13 との結合に依存した JRAB の構造変化、および、それに伴った actinin や filamin をはじめとするアクチン細胞骨格に関連する分子群との多彩な相互作用が細胞間接着形成過程に認められるエキソサイトーシスとアクチン細胞骨格の再編成のクロストークを可能にすると予想している。さらに、本研究では Rab13 と JRAB の各 KO マウスを作製しており、

現在、これらのマウスを用いて、特に、神経発生・再生時の神経突起伸長・シナプス形成における Rab13-JRAB 系の役割について組織学および行動学解析を行っている。

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4件)

Sakane, A. and Sasaki, T. (2014)
Roles of Rab family small G proteins in formation of the apical junctional complex in epithelial cells
Cell Polarity: Biological Role and Basic Mechanisms, in press

Sakane, A., Abdallah, A.A.M., Nakano, K., Honda, K., Kitamura, T., Imoto, I., Matsushita, N. and Sasaki, T. (2013)
Junctional Rab13-binding protein (JRAB) regulates cell spreading via filamins
Genes Cells, 18(9), 810-822
doi: 10.1111/gtc.12078.

Sakane, A., Abdallah, A.A.M., Nakano, K., Honda, K., Ikeda, W., Nishikawa, Y., Matsumoto, M., Matsushita, N., Kitamura, T. and Sasaki, T. (2012)
Rab13 small G protein and junctional Rab13-binding protein (JRAB) orchestrate actin cytoskeletal organization during epithelial junctional development.
J. Biol. Chem., 287(51), 42455-42468
doi: 10.1074/jbc.M112.383653.

Withanage, K., Nakagawa, K., Ikeda, M., Kurihara, H., Kudo, T., Yang, Z., Sakane, A., Sasaki, T. and Hata, Y. (2012)
Expression of RASSF6 in kidney and the implication of RASSF6 and the Hippo pathway in the sorbitol-induced apoptosis in renal proximal tubular epithelial cells.
J. Biochem., 152(1), 111-119
doi: 10.1093/jb/mvs056.

[学会発表](計1件)

坂根亜由子、佐々木卓也

動く細胞

VIEW2012 ビジョン技術の実利用ワークショップ

2012年12月6日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[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

坂根 亜由子 (SAKANE, Ayuko)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号: 60509777

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: