

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：16101

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20113004

研究課題名（和文）高次神経機能を支えるロジスティクス機構の解明

研究課題名（英文）Logistics for the regulation of higher neuronal function

研究代表者

佐々木 卓也（SASAKI TAKUYA）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：40241278

研究成果の概要（和文）：本研究では、高次神経機能を支える細胞内物流システムとしてシナプス小胞輸送とシナプス形成に関わる分子輸送の制御機構を解析した。前者については、シナプス小胞輸送を制御するRab3Aの関連蛋白質Rabconnectin-3のノックアウトマウスが神経機能障害を示すことを見出した。後者については、Rab13とその標的蛋白質JRABが、小胞輸送とともにアクチン細胞骨格の再編成を時空間制御することでシナプス形成に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Rab family small G proteins serve as molecular switches in the regulation of vesicle transport. In this study, we focus on the role and mode of action of Rab3A, Rab13, and their related proteins in higher neuronal functions. As to Rab3A, we found using the knockout mice for Rabconnectin, the Rab3A-related protein, is involved in neuronal function, probably through formation of synaptic organization. We also found that the Rab13-JRAB system regulates the reorganization of actin cytoskeleton during neuronal extension. Our results suggest that this system may simultaneously coordinate vesicle transport and actin cytoskeletal reorganization in neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	35,100,000	10,530,000	45,630,000
平成21年度	25,000,000	7,500,000	32,500,000
平成22年度	24,600,000	7,380,000	31,980,000
平成23年度	25,000,000	7,500,000	32,500,000
平成24年度	24,600,000	7,380,000	31,980,000
総計	134,300,000	40,290,000	174,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般（細胞内ロジスティクス:病態の理解に向けた細胞内物流システムの融合研究）

キーワード：高次神経機能、シナプス小胞、シナプス形成、神経突起形成、Rab13、JRAB、アクチン細胞骨格、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

高次神経機能においては、個々のシナプスでの情報伝達の微調整が重要な役割を果たしている。一般に情報伝達は量や質の修飾によ

って微調整されるが、シナプスでの情報伝達の量の修飾機構として、神経伝達物質を含んだシナプス小胞のプレシナプス膜への輸送の制御を介して神経伝達物質の放出の量及び効

率を変化させる機構がある。研究代表者は、このシナプス小胞輸送の過程を制御する分子として、代表的な小胞輸送の制御系として知られるRabファミリー低分子量G蛋白質のメンバーであるRab3Aに注目した研究を進めており、これまでにRab3A 関連蛋白質群を世界に先駆けて同定し、このRab3A 系がシナプス小胞輸送の中心的な制御系であることを証明するとともに、それらのノックアウトマウスを用いた個体レベルの解析からRab3A系が高次神経機能の細胞レベルの表現型であるシナプス可塑性において重要な役割を果たしていることを証明している。一方、シナプスでの情報伝達の質の修飾機構としては、対峙するプレとポストシナプス膜上に小胞に載って輸送された接着分子が互いに結合し、プレシナプス側ではシナプス小胞が集積するアクティブゾーンを形成するとともに、ポストシナプス側では受容体やシグナル分子を集積させ、効率の良いシナプス伝達の場合を形成する機構が存在する。これまでにシナプス結合に関与する接着分子は多数見出されており、それらの変異体、ノックアウトマウスを用いた研究成果や遺伝子異常による神経疾患の発見等から、接着分子が高次神経機能の成立に重要であることは確立しているが、どのような機構で接着分子が細胞膜の特定の場所に正しく運ばれるかについては未だよくわかっていない。研究代表者は、これまでに神経細胞と同様に極性を有した上皮細胞を用いて、接着分子の輸送に関わるRab のメンバーやその関連蛋白質を同定することに成功しているが、最近では、その輸送の制御分子群がシナプス結合の形成にも機能していることを明らかにしつつあり、神経細胞でも接着分子の輸送に関与している可能性が高くなってきている。このように、研究代表者は高次神経機能を支えるシナプスでの情報伝達の微調整において、シナプス小胞輸送や接着分子輸送などの物流システムの制御の重要性を早くから提唱し、証明しつつある。実際、研究代表者が見出した分子の遺伝子異常が原因となって高次神経機能の破綻を引き起こす疾患が世界的に複数例報告されており、本物流システムの制御の重要性は疾患レベルでも証明されている。

2. 研究の目的

上述したように、これまで研究代表者はシナプス小胞輸送の制御分子であるRab3A系の関連分子群を次々と同定し、その高次神経機能における重要性をノックアウトマウスを用いた個体レベルの解析により明らかにしている。シナプス小胞輸送には、Rab3A系以外にも小胞が分泌可能な状態に成熟する過程に働くMunc13や主に小胞がプレシナプス膜に融合する過程に働くMunc18 やSNARE系が関与しており、これらの蛋白質間相互作用が統合されて連続的に移行していく機構がシナプス小胞輸送の調節機構の本体であると予想されている。これまでの研究代表者を含む複数のグループの知見から、Rab3A系はこれらの分子群の最上流に位置して蛋白質間相互作用の移行を時空間的に制御していると考えられるが、その作用機構の詳細は未だ不明である。そこで、本研究では、Rab3A系によるシナプス小胞輸送制御分子群の制御機構を明らかにし、高次神経機能の基盤となるシナプス小胞輸送の微調整機構を解明することを第一の目的とする。さらに、研究代表者は、上皮細胞を用いて同定した接着分子の輸送に関わるRabのメンバーやその関連蛋白質が、上述したように神経細胞においても同様の機能を有することを示唆する結果を得ている。そこで、本研究では、神経細胞においてRab系が制御する接着分子や関連分子の輸送機構を明らかにするとともに、その輸送制御の高次神経機能における意義と役割を解明することを第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) シナプス小胞輸送の制御機構の解析：Rab3Aの活性制御蛋白質Rab3 GEPに直接結合し、Rab3 GAPに間接的に結合するシナプス小胞蛋白質Rabconnectin-3のシナプス小胞輸送における役割についてノックアウトマウスを用いた個体レベルの解析を中心に明らかにすることを旨とした。

(2) シナプス形成に関わる接着分子やその関連分子の輸送制御機構の解析：上皮細胞で接着分子の輸送を制御するRab13-JRAB系が

神経細胞で輸送する分子を同定し、その輸送制御とシナプス形成との関係を解析した。また、Rab13およびJRABのノックアウトマウスを作製し、シナプス形成における役割を個体レベルで解析することを目指した。

4. 研究成果

(1) Rabconnectin-3は α と β の2個のサブユニットから成るが、本研究期間中には、Rabconnectin-3のKOマウスのうち、まず α サブユニットの解析を行い、本KOマウスが神経機能障害を示すことを見出した。このマウスでは、シナプス小胞輸送だけでなく、シナプス形成のどこかに異常が引き起こされている可能性が高く、現在さらに詳細な解析を行っている。

(2) 神経様細胞であるPC12細胞においてRab13-JRAB系の機能を検討したところ、神経成長因子NGFによる神経突起の伸長に参与していることが明らかとなった。また、これまでにJRABはアクチニン-4というアクチン結合蛋白質と結合することを見出しているが、PC12細胞の神経突起伸長の際には、アクチニン-4との結合を介してアクチン細胞骨格の再編成の制御にも関与していることを明らかにした。

(3) JRABはRab13の標的蛋白質であることから、活性型Rab13が結合する。本研究では、活性型Rab13の結合によりJRABの構造変化が引き起こされることを生化学的に明らかにした。さらに、このRab13の結合依存的なJRABの構造変化がシナプス形成において重要な役割を果たしていることを示唆する結果を得た。すなわち、JRABは、Rab13依存的な構造変化によりアクチニン-4等のJRAB結合蛋白質群との相互作用を変化させること、さらにはアクチン細胞骨格の再編成に対して異なった作用を示すことを生化学的あるいは細胞生物学的に明らかにすることができた。現段階では、その機構によりRab13-JRAB系がシナプス形成時に認められる神経細胞のダイナミックな形態変化につながるアクチン細胞骨格の再編成のチューニングを行っていると考えている。

さらに、Rab13-JRAB系が輸送制御する機能分子の候補となる膜蛋白質を新たに見出しており、現在、シナプス形成時において、この機能分子とアクチン細胞骨格再編成の時空間制御との接点を明らかにしたいと考え、解析を続けている。

(4) 本研究では、Rab13とJRABの各ノックアウトマウスを作製して解析しており、これまでに神経機能の異常を示唆する結果を得ている。現在、神経機能異常の基盤となる細胞生物学的な確証を得るため、それぞれのマウスから調整した初代神経培養細胞を用いた解析を行っている。

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12件)

① Sakane, A., Abdallah, A.A.M., Nakano, K., Honda, K., Ikeda, W., Nishikawa, Y., Matsumoto, M., Matsushita, N., Kitamura, T., and Sasaki, T. Rab13 small G protein and Junctional Rab13-binding protein (JRAB) orchestrate actin cytoskeletal organization during epithelial Junctional development. *J. Biol. Chem.* 査読有, 287(51), 2012, 42455-42468 DOI:10.1074/jbc.M112.383653.

② Withanage, K., Nakagawa, K., Ikeda, M., Kurihara, H., Kudo, T., Yang, Z., Sakane, A., Sasaki, T. and Hata, Y. 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.* 査読有, 152(1), 2012, 111-119 DOI:10.1093/jb/mvs056

③ Sakane, A., Honda, K. and Sasaki, T. Rab13 regulates neurite outgrowth in PC12 cells through its effector protein, JRAB/MICAL-L2. *Mol. Cell. Biol.*, 査読有, 30(4), 2010, 1077-1087 DOI:10.1128/MCB.01067-09

④ Tabata, K., Matsunaga, K., Sakane, A., Sasaki, T., Noda, T. and Yoshimori, T. Rubicon and PLEKHM1 negatively regulate the endocytic/autophagic pathway via a novel Rab7-binding domain. *Mol. Biol. Cell.* 査読有, 21(23), 2010, 4162-4173 DOI:10.1091/mbc.E10-06-0495

⑤ Nishimura, N. and Sasaki, T.
Rab family small G proteins in regulation of epithelial apical junctions.
Front. Biosci., 査読無, 14, 2009, 2115-2129
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273188>

⑥ Szodorai, A., Kuan, Y.-H., Hunzelmann, S., Engel, U., Sakane, A., Sasaki, T., Takai Y., Kirsch, J., Müller, U., Beyreuther, K., Brady, S., Morfini, G. and Kins, S.
APP anterograde transport requires Rab3A GTPase activity for assembly of the transport vesicle.
J. Neurosci., 査読有, 29 (46), 2009, 14534-14544
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1546-09.2009

⑦ Higashio, H., Nishimura, N., Ishizaki, H., Miyoshi, J., Orita, S., Sakane, A. and Sasaki, T.
Doc2 α and Munc13-4 regulate Ca²⁺-dependent secretory lysosome exocytosis in mast cells.
J. Immunol., 査読有, 180 (7), 2008, 4774-4784
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18354201>

⑧ Nakatsuji, H., Nishimura, N., Yamamura, R., Kanayama, H. and Sasaki, T.
Involvement of actinin-4 in the recruitment of JRAB/MICAL-L2 to cell-cell junctions and the formation of functional tight junctions.
Mol. Cell. Biol., 査読有, 28 (10), 2008, 3324-3335 DOI:10.1128/MCB.00144-08

⑨ Nishimura, N., Araki, K., Shinahara, W., Nakano, Y., Nishimura, K., Higashio, H. and Sasaki, T.
Interaction of Rab3B with microtubule-binding protein Gas8 in NIH 3T3 cells.
Arch. Biochem. Biophys., 査読有, 474(1), 2008, 136-142 DOI:10.1016/j.abb.2008.03.032

⑩ Nishimura, N. and Sasaki, T.
Cell-surface biotinylation to study endocytosis and recycling of occludin.
Methods Mol. Biol., 査読無, 440, 2008, 89-96 DOI:10.1007/978-1-59745-178-9_7.

⑪ Sakane, A., Miyoshi, J., Takai, Y. and Sasaki, T.
Analysis on the emerging role of Rab3 GTPase-activating protein in Warburg Micro and Martsolf syndrome.
Methods Enzymol., 査読無, 438, 2008, 131-139 DOI:10.1016/S0076-6879(07)38009-9

⑫ Nishimura, N. and Sasaki, T.
Identification and characterization of JRAB/MICAL-L2, a junctional Rab 13-binding protein.
Methods Enzymol., 査読無, 438, 2008, 141-153 DOI:10.1016/S0076-6879(07)38010-5

[学会発表] (計 8 件)

① 佐々木卓也, 坂根亜由子,
動く細胞, ViEW2012 ビジョン技術の実利用ワークショップ 2012.12.6, パシフィコ横浜(横浜市)

② 佐々木卓也, 坂根亜由子,
細胞接着・運動において Rab13-JRAB 系が制御する小胞輸送とアクチン細胞骨格再編成,
第 70 回日本癌学会学術総会, 2011.10.3,
名古屋国際会議場(名古屋市)

③ Ayuko Sakane and Takuya Sasaki,
A role of JRAB in epithelial junctional development: The cross-talk between vesicular trafficking and actin cytoskeleton in the submembrane plaque.
細胞間接着形成過程において JRAB が制御する細胞内小胞輸送とアクチン細胞骨格系の細胞膜直下でのクロストーク機構,
第 63 回日本細胞生物学会大会ミニシンポジウム, 2011.6.28, 北海道大学(札幌市)

④ Takuya Sasaki and Ayuko Sakane, Functions of Rab family small G proteins in neurite outgrowth.
神経突起形成における Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質の機能,
第 62 回日本細胞生物学会大会シンポジウム, 2010. 5. 20, 大阪国際会議場(大阪市)

⑤ Keisuke Tabata, Kohichi Matsunaga, Ayuko Sakane, Takuya Sasaki, Takeshi Noda and Tamotsu Yoshimori,
The Rubicon family negatively regulates the endocytic pathway through the interactions with Rab7.
Rubicon ファミリーは Rab7 との結合を介してエンドサイトーシス経路を負に制御する,
第 62 回日本細胞生物学会大会, 2010.5.19, 大阪国際会議場(大阪市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 卓也 (SASAKI TAKUYA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究
部・教授

研究者番号:40241278

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: