

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18700333
 研究課題名 (和文) RA175 (SynCAM) ノックアウトマウスにおける機能シナプスの解析
 研究課題名 (英文) Loss of the functional-synapse in RA175(SynCAM)-deficient mice
 研究代表者
 藤田恵理子 (FUJITA ERIKO)
 国立精神・神経センター・疾病研究第5部・流動研究員
 研究者番号：20291651

研究成果の概要：

免疫グロブリンファミリーに属す RA175(SynCAM1)は、C 末端の PDZ 結合領域を介して細胞接着・機能的シナプスの形成に関与している。申請者は RA175 の C 末端 EYFI に結合するタンパクを探索し、複合体を形成する蛋白をプルダウン・免疫沈降・免疫染色法および作成した RA175 ノックアウトマウスを用いて解析した。その結果、RA175 は Par-3 と直接結合すること、特異的な神経回路網作製のために過剰な RA175 はデンドライト上で切断されている可能性を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3500,000	330,000	3,830,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：脳・神経、シグナル伝達、SynCAM、機能シナプス

1. 研究開始当初の背景

RA175 は免疫グロブリンファミリーに属する神経系と上皮組織に特異的に局在するホモフィリックな細胞接着分子であり、神経細胞の軸索伸長、軸索経路探索、繊維束の形成に関与している(Urase et al. 2001, Fujita et al. 2003, 2005)。また Sudhof により、RA175 は SynCAM(さらに最近になって Cadm1 に名前が統一された)として機能シナプス形成に関与する接着蛋白としても報告されている(Biedar et al. 2002)が、未だ不明な点が多い。申請者らは、RA175(SynCAM)

の機能についてさらに解析すべく、RA175(SynCAM)ノックアウトマウスを作成した。予想に反して、RA175(SynCAM)欠損マウスは雄ホモマウスのみが不妊症状を示したものの、その他には神経組織、上皮組織を含め顕著な症状は観察されなかった。申請者は、シナプス形成機構は、上皮組織における cell junction 形成は基本的な機構が保存されているものと考えており、RA175(SynCAM)ノックアウトマウスの精巣異常についての解析結果は神経組織およびシナプス伝達機構における

RA175(SynCAM)の機能の解明に大いに役立つもの確信し、RA175(SynCAM)ノックアウトマウスの精巣異常についての解析を試みた。その結果、cell junction 形成不全により精子細胞への分化が異常であること (Fujita et al, 2005)、精子細胞分化にはRA175(SynCAM)C 末端の PDZ 結合領域への PAR-3 の結合と接着分子(Jam-C)との相互作用が重要であることが明らかとなった (Fujita et al. 2007)。

2. 研究の目的

本研究では、後シナプス肥厚上の PDZ 領域を持つ分子に焦点をあて、シナプスで RA175(SynCAM)と足場を形成する蛋白を探索し、それに結合するシナプス接着分子や受容体からなる複合体を解析し、これら分子のシナプス情報伝達における機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

two ハイブリット法にて得られた RA175(SynCAM)の C 末端 PDZ 結合領域に結合する未知または既知の蛋白について、プルダウン・免疫沈降・免疫染色法により RA175(SynCAM)と複合体を形成すること、さらに免疫染色法などを用いてそれらの局在を明らかにする。

(1)two ハイブリット法

Yeast Two hybrid 法による RA175 の細胞質 C 末端領域に結合するタンパク質の検索を試みた。目的タンパク質(bait タンパク質、pGBKT7vectorRA175 または Neurologin、グルタミン酸受容体などの細胞質領域に結合する蛋白)、標的タンパク質(preym タンパク質、pGADT7vector ライブラリーまたは SynGAP, PSD95 などシナプスに局在が知られている PDZ 領域を有する候補遺伝子)とした。なお、レポーター酵母株 AH109 を用いた。ポジティブコントロールには、pGBK-P53、ネガティブコントロールには、pGBK-Lim(クローンテック)を用いた。

酵母株に AH109、bait DNA 溶液(pGBK-RA175C)、prey DNA 溶液にキャリア DNA を用いて、トランスフォーメーションした。酵母体を SD(Difco yeast Nitrogen Base w/o amino acid、アミノ酸ミックス(-Leu,Trp)、2%グルコース、1% Agar)プレートに 30°C で 3 日間培養した。その後、さまざまな選択培地にて再培養した。

(2)Pull-down assay 法

脳を、1% TritonX-100 を含む PBS 10ml に対し プロテアーゼ阻害剤を含む抽出液に遠心分離後、上清を得た。この抽出液に GST 融合リコンビナントタンパク質が結合したセファロースゲルを加え、4°C で一晩、ローテーターにて混合した。洗浄後、

20mM グルタチオンにて溶出した後、SDS-PAGE を行い、サンプルを分離した。その後、ウエスタンブロッティング法により以下の抗体を用いて解析した。

(3)ウエスタン (イムノ) ブロット法

細胞は、1% TritonX-100/PBS 溶液で懸濁し、その遠心上清画分を 12%SDS-アクリルアミドゲルで泳動し、ニトロセルロースフィルターにブロッティングした。一次抗体、さらに二次抗体としてアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ラビットおよびマウスイムノグロブリンを用い、発色液で反応させた。

(4)細胞染色法

COS 細胞を 2 % パラホルムアルデヒドを含む PBS にて固定後、タグ抗体を用いた免疫染色法を行い、PBS で洗浄した後、ブロッキングし、一次抗体を用い 4°C で一昼夜反応させ、さらに二次抗体として FITC 標識抗イムノグロブリン抗体を加え反応後、グリセロールで封入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(5)組織染色法

RA175 ノックアウトマウスおよび野生型マウスを 4 % パラホルムアルデヒドを含む PBS を用いた還流固定法にて固定した。脳組織を取り出し、30% sucrose/PBS で 2~3 日置換し、包埋剤に凍結包埋した。凍結包埋した胚マウス組織をクリオスタットにより 10 μm の切片を作製した。切片を MAS コーティングされたスライドガラスに貼り付け、2 時間風乾した。抗体を用いた免疫染色法を行った。

(6)生理学的解析

RA175 ノックアウトマウスを 129SV 系統から C57BL/6J 系統に 10 代継代し、このマウスを用いて、行動解析および生理学的解析を行った。

4. 研究成果

RA175(SynCAM)の C 末端の PDZ 結合配列 EYFI に結合する蛋白をマウス胎児ライブラリーから two ハイブリッド法にて探索し、未知および既知あわせて約十種類の候補遺伝子を得て、プルダウン法、免疫沈降法、免疫染色法によりシナプス後膜にて複合体形成する蛋白を解析、同定した。

その中から、(1)RA175/SynCAM1 は Par-3 と直接結合することを明らかにし、作製した RA175/SynCAM1 ノックアウトマウスを用いて「RA175/SynCAM1 ノックアウトマウスの精巣における Par-3 の異常」について報告した (Fujita et al., Am J Pathol., 2007) (図 1)。

(2) RA175/SynCAM にはこれまで知られているエクソン 7 とエクソン 9 の間異なるアイソフォームが少なくとも 4 つの存在し、特異的な神経回路網作製のために、過剰な

RA175/SynCAM はデンドライト上で切断されることが明らかにした。またこの切断は tumor necrosis factor-alpha-プロテアーゼ阻害剤により影響をうけることから、tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM17-様プロテアーゼが作用している可能性が示唆された(Zhiling and Fujita et al., Neurosci Lett.,2008)

(3) RA175 ノックアウトマウスの行動解析および生理学的解析について RA175 ノックアウトマウスを 129SV 系統から C57BL/6J 系統に 10 代継代し、解析を進めている(投稿準備中)。

(4)自治医大医学部小児科との共同研究において、自閉症患者集団について RA175/SynCAM1 の変異を調べたところ、二種類の変異を見出した。これらの変異が疾病に関与していると示唆された(Tanabe et al., Biochem Biophys Res Commun., 2008)。

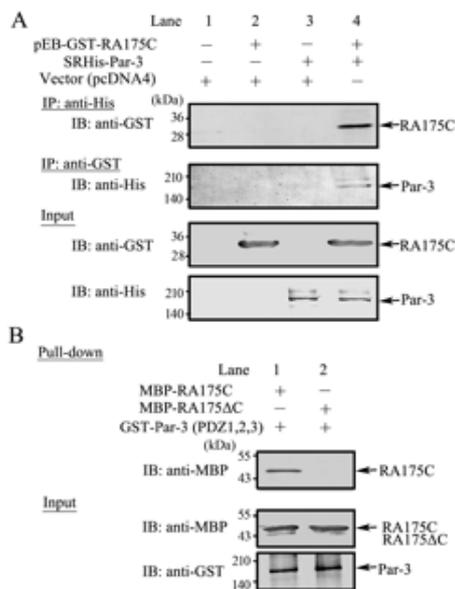


図 1. RA175 と Par-3 の結合

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) 全てにおいて査読有

- 1) Fujita E, Kouroku Y, Ozeki S, Tanabe Y, Toyama Y, Maekawa M, Kojima N, Senoo H, Toshimori K, Momoi T. Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking RA175/TSLC1/SynCAM/IGSF4A, a cell adhesion molecule in the immunoglobulin superfamily. Mol Cell Biol. 2006;26:718-726.

- 2) Fujita E, Tanabe Y, Hirose T, Aurrand-Lions M, Kasahara T, Imhof BA, Ohno S, Momoi T. Loss of partitioning-defective-3/isotype-specific interacting protein (par-3/ASIP) in the elongating spermatid of RA175 (IGSF4A/SynCAM)-deficient mice. Am J Pathol. 2007;171:1800-1810.
- 3) Tanabe Y, Kasahara T, Momoi T, Fujita E. Neuronal RA175/SynCAM1 isoforms are processed by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM17-like proteases. Neurosci Lett. 2008;444:16-21.
- 4) Zhiling Y, Fujita E, Tanabe Y, Yamagata T, Momoi T, Momoi MY. Mutations in the gene encoding CADM1 are associated with autism spectrum disorder. Biochem Biophys Res Commun. 2008;377:926-929.

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Fujita E, Tanabe Y, Senoo H, Toshimori K, Momoi T: IGSF4A/ RA175 Interacts with PAR-3 and Its Deficiency Causes Defect in the Spermatocytes Differentiation. 第 20 回国際生化学・分子生物学会議(第 79 回日本生化学会大会/第 29 回日本分子生物学会年会)、京都、6.20,2006.
- 2) Fujita E, Tanabe Y, Momoi T: IGSF4A/ RA175 Interacts with PAR-3(IGSF4A/ RA175 と結合する蛋白).第 29 回神経科学大会、京都、7.9,2006.
- 3) 田辺裕子、松崎鮎美、藤田恵理子、Giulo Piluso、大野茂男、石浦章一、Alaa Husseini、Vincenzo Nigro、桃井隆:脳における RA175/SynCAM 結合蛋白の解析、第 30 回日本神経科学大会、第 50 回日本神経化学会大会、第 17 回日本神経回路学会大会、横浜、9.12,2007.
- 4) Tanabe Y, Fujita E, Giulio P, Nigro V, Momoi MY, Ishiura S, Kasahara T, Momoi T: The RA175/SynCAM complex on the GABAergic synapse、第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会、横浜、12.12.2007.
- 5) 田辺裕子、笠原忠、桃井隆、藤田恵理子:メタロプロテアーゼによる RA175/SynCAM1 特異的アイソフォームのプロセッシング Neuroscience 2008、東京、7.10.2008.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況（計 0 件）
なし

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田恵理子 (FUJITA ERIKO)
国立精神・神経センター・疾病研究第5部・
流動研究員
研究者番号：20291651

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし