

平成 22 年 3 月 26 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19500306
 研究課題名（和文）
 シプナス形成におけるRPM-1シグナル伝達系で働く新規ユビキチン化関連因子の機能
 研究課題名（英文） A Novel Ubiquitin E2 Variant Protein Acts in Axon Termination and Synaptogenesis in *C. elegans*
 研究代表者
 中田 勝紀 (Nakata Katsunori)
 独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・研究員
 研究者番号：30311351

研究成果の概要（和文）：

線虫 *C. elegans rpm-1* 変異は前シナプスの構造異常を引き起こす。RPM-1はグアニンヌクレオチド交換因子ドメインおよびリングフィンガー・ユビキチンリガーゼドメインを持っている。RPM-1は前シナプスのペリアクティブゾーンに局在し機能している。本研究ではシナプス形成におけるRPM-1シグナル伝達についての研究を行った結果、ユビキチン結合酵素（E2 or UBC）に似た構造をもったUEV-3（UBC variant）がPMK-3と結合してシナプス形成において機能していることが分かった。このことから、UEV-3はPMK-3と転写因子やタンパク質リン酸化酵素などの下流因子と結合することによって、足場タンパク質（Scaffolding）として働いていることが推測された。

研究成果の概要（英文）：

In *C. elegans*, loss of function of the PHR protein RPM-1 (Regulator of Presynaptic Morphology) results in fewer synapses to form, disorganization in presynaptic terminal architecture and axon overextension in some neurons. Such defects are suppressed by inactivation of the DLK-1 pathway, which activates a p38 MAP kinase to regulate mRNA stability of a bZip domain protein. By characterizing additional genetic suppressors of *rpm-1*, we present here a new member of this DLK-1 pathway, *uev-3*, which is a E2 ubiquitin conjugating enzyme variant. *uev-3* acts cell autonomously in neurons, despite its ubiquitous expression. Our genetic epistasis analysis shows that *uev-3* acts downstream of MKK-4, the MAPKK, but upstream of the MAPKAPK MAK-2. We found UEV-3 physically interacts with MAPK PMK-3. The UEV domain is necessary for the function of UEV-3. We postulate that UEV-3 may limit the substrates accessible to PMK-3 to provide additional specificity in the DLK-1 pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経解剖学 ・ 神経病理学

キーワード：

シナプス形成、線虫、rpm-1, ユビキチン、軸索ガイダンス

1. 研究開始当初の背景

神経細胞同士はシナプスという特殊化された連絡構造をもっている。このシナプスは3つの構造から成る。それらは神経伝達物質を放出する前シナプス、神経伝達物質を受け取る後シナプス、前シナプスと後シナプスとを密接に保持するシナプス間隙である。前シナプスは高度に構成された細胞骨格系を含んでいる。これまでに軸索をその標的細胞にガイドするシグナル伝達に関しては多くの知見が得られたが、これらのシグナルがどのように細胞内に伝わってシナプスの形態や細胞骨格系の構成を変化させるのかは未だ未解明の部分が多い。

さらに、脳において神経細胞間の接続の空間的パターンは、経験に対応して新しいシナプスが構築され既存のシナプスが排除されることにより、変化している。神経系はこのようにして、長期的な情報をシナプスの構造と化学的性質の変化という形で保存している。このような、シナプスと神経網のいわゆる『可塑性』は、脳の学習と記憶の原理であると考えられている。

線虫 *C. elegans* は1個体が959個の細胞より成り、このうち302個が神経細胞である。これらの細胞は、すべて生きてそのまま顕微鏡下で観察、同定できる。また、電子顕微鏡を用いた再構築により神経回路が完全に明らかにされているという他に類を見ない特徴を持つ。さらに、遺伝学、逆遺伝学が容易に行えることに加え、全ゲノムの塩基配列が公表されている多細胞生物であるなど、進

化的に保存されているメカニズムを同定するためのモデル動物として理想的な研究材料である。

rpm-1 (regulator of presynaptic morphology) 遺伝子変異は線虫を用いた異常なシナプス形成をおこす変異体の遺伝学的スクリーニングによって単離された。*rpm-1* 遺伝子はグアニンスクレオチド交換因子ドメインおよびタンパク質分解に関与すると思われるリングフィンガー・ユビキチンリガーゼ (E3) ドメインを持っているタンパク質をコードしている。*rpm-1* の相同遺伝子は哺乳動物、ショウジョウバエにも存在し、これらの動物種でも神経シナプス形成に重要な働きをしていることが報告されている。しかしながら RPM-1 がどのようにしてシナプス形成に機能しているのか分かっていなかった。

そこで申請者は *rpm-1* のシグナル伝達を解析した結果、線虫の神経シナプス形成において RPM-1 の下流で DLK-1-MKK-4-PMK-3 という新規の p38 MAP キナーゼ・カスケードが働いていること、またこのカスケードが DLK-1 の RPM-1 によるユビキチン化依存性分解によって負に制御されていることを解明した (Nakata et al., 2005)。*dlk-1* はヒト MAP キナーゼ・キナーゼ・キナーゼ *DLK* の相同遺伝子、*mkk-4* はヒト MAP キナーゼ・キナーゼ *MKK4* の相同遺伝子、*pmk-3* はヒト p38 MAP キナーゼの相同遺伝子である。

さらに申請者による予備的な研究によりユビキチン結合酵素 (E2 or UBC) に似た構造をもった UEV-3 (UBC variant) が MKK-4 の下流で働いていることが分かった。このことは RPM-1 シグナル伝達において RPM-1 が DLK-1 をユビキチン化依存性分

解することとは別のユビキチン化を介したシグナル伝達に関係していることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究ではこの新知見をもとに線虫のシナプス形成における RPM-1-DLK-1-MKK-4-PMK-3 および UEV-3 のシグナル伝達をユビキチン化という観点からさらに解析するとともに、新規のユビキチン化を介したシナプス形成に関与する因子を探索し、機能解明すること、さらにこれらの知見をもとに、脊椎動物のシナプス形成のメカニズム解明に発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) シナプス形成におけるUEV-3機能解析

申請者は、RPM-1シグナル伝達に関係していると思われる新規のrpm-1変異の抑制変異 *ju587* の解析を行い、原因遺伝子をクローニングした。この原因遺伝子はuev-3であり、スプライスジャンクション変異による機能欠損変異であった。UEV-3はユビキチン結合酵素 (E2) に特異的なUBCモチーフを持っているが、活性化に必要な活性化サイトのシステインを欠いているために酵素活性をもたないと思われた。予備的な研究によりUEV-3がRPM-1シグナル伝達系においてMKK-4 MAPキナーゼ・キナーゼの下流で働いていることがわかった。

(2) UEV-3の発現および機能解析

uev-3が真にrpm-1の抑制変異 *ju587* の原因遺伝子かをuev-3遺伝子を含むコスミド、もしくはmini geneによってレスキュー実験を行う。UEV-3の発現部位をGFP融合遺伝子を用いて、特定する。また、UEV-3がMKK-4の下流で働いているので、MKK-4およびPMK-3の発現と比較し機能を推測する。UEV-3が神経（前シナプス）あるいは筋肉（後シナプス）のどちらで働いているかを神経特異的あるいは筋肉特

異的プロモーターを用いて組織特異的にUEV-3を発現させて、表現型をレスキューできるかどうかで調べる。

(3) UEV-3の機能の分子メカニズム解析

UEV-3とPMK-3, MKK-4とが物理的に結合しうるかをYeast Two-Hybrid法で確認する。

(4) UEV-3の軸索伸長における機能解析

RPM-1は神経軸索の伸長に関係していることが分かっている。従って、UEV-3が神経軸索の伸長に関係しているかを機械受容神経にGFPを発現させた、マーカーを用いて、観察する。

4. 研究成果

本研究ではシナプス形成における RPM-1 シグナル伝達についての研究を行った結果、ユビキチン結合酵素 (E2 or UBC) に似た構造をもった UEV-3 (UBC variant) が PMK-3 と結合してシナプス形成において機能していることが分かった。このことから、UEV-3 は PMK-3 と転写因子やタンパク質リン酸化酵素などの下流因子と結合することによって、足場タンパク質 (Scaffolding) として働いていることが推測された。

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 1 件)
Nakata, K., Maruyama, I., and Jin, Y. (2007) UEV-3, a ubiquitin conjugating enzyme E2 variant, functions in the p38 MAP kinase pathway for synaptogenesis. *Neurosci. Res.* 58, S39. 査読無

[学会発表] (計 3 件)

(1) Gallegos, G, Nakata, K., Yan, D., Maruyama, I., and Jin, Y. Understanding the Role of a Novel Ubiquitin E2 Variant Protein in Axon Termination and Synaptogenesis. 2008 *C. elegans* Neuronal Development, Synaptic Function, and Behavior Topic Meeting, Madison, USA, June 29 – July 2, 2008.

(2) **Nakata, K.**, Maruyama, I., and Jin, Y. UEV-3, a ubiquitin conjugating enzyme E2 variant, functions downstream of the RPM-1-DLK-1-p38 MAP kinase pathway in synapse formation、第 30 回日本分子生物学会年会、他合同学会、横浜、12 月 (2007)

(3) **Nakata, K.**, Maruyama, I., and Jin, Y. UEV-3, a ubiquitin conjugating enzyme E2 variant, functions downstream of the RPM-1-DLK-1-p38 MAP kinase pathway in synapse formation、Neuro2007 (第 30 回日本神経科学大会、他合同学会)、横浜、9 月 (2007)

(4) **Nakata, K.**, Maruyama, I., and Jin, Y. UEV-3, a ubiquitin conjugating enzyme E2 variant, functions downstream of the RPM-1-DLK-1-p38 MAP kinase pathway in synapse formation. 16th biennial International *C. elegans* conference, Los Angeles, USA, June 27-July 1, 2007.

[その他]

ホームページ

http://www.irp.oist.jp/hi-sai/index_j.php

<http://mikoshiba-lab.brain.riken.jp/indexj.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 勝紀 (Nakata Katsunori)

独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・研究員

研究者番号：30311351