

平成21年 4月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790223

研究課題名 (和文) ユビキチンリガーゼによるシナプス伝達制御機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of synaptic transmission regulated by a ubiquitin ligase

研究代表者

矢尾 育子 (YAO IKUKO)

株式会社三菱化学生命科学研究所・研究部門・分子加齢医学研究グループ 副主任研究員

研究者番号：60399681

研究成果の概要：(200字程度)

研究代表者は脳内の神経細胞同士のつなぎ目「シナプス」で神経伝達物質の放出を調節するタンパク質を発見した。これが別のタンパク質の分解に関わっていることから、「壊し屋」の意味で「SCRAPPER (スクラッパー)」と名付けた。このタンパク質はシナプスでの情報伝達に不可欠なタンパク質を分解し、神経伝達物質の放出量を適度に抑えている。本研究の成果により、シナプスでの伝達の異常が起きている脳神経精神疾患の新しい治療薬の開発につながる事が期待される。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,700,000 | 0 | 1,700,000 |
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 480,000 | 3,780,000 |

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：(1)神経科学 (2)蛋白質 (3)プロテオーム (4)シナプス (5)老化 (6)SCRAPPER

1. 研究開始当初の背景

1つの神経細胞は他の神経細胞とシナプス結合を介して結合し、効率的な情報伝達を支えている。成熟した神経シナプス後部には postsynaptic density (PSD) と呼ばれる構造が存在している。申請者はこれまでに PSD に局在する新規の構成因子 (SAPAP, BEGAIN, S-SCAM, synamon 及び, MAGUIN) を多数見出し (Deguchi ら, JBC 2000; Yao ら, JBC 1999; Yao ら JBC 1999; Deguchi ら, JBC 1998; Hirao ら, JBC 1998; Ide ら, BBRC 1998)、これらが神経シナプス接着分子や伝達物質受容体、シナプス可塑性に関わるシグナル分子等をシナプス部位に大変効率よく集積させている事 (Setou ら, J Neurobiol 2004; Yao ら, BBRC 2000; Hirao ら, JBC 2000; Hirao ら, Genes Cells 2000; Ide ら, BBRC 1999; Ide ら, BBRC 1998)、更にはその集積の時間的な序列を明らかにし (Yao ら, Genes Cells 2003; Yao ら, J Neurosci 2002; Iida ら, Euro J Neurosci 2002; Nishimura ら, J Neurosci 2002)、学習・記憶の時系列制御においても重要な働きをしていることを提唱して来た。また、神経シナプスは神経細胞同士の接着の場であることにも着目し、上皮細胞に見られる細胞接着機構がシナプスの構築に重要であることも見出して来た (Ohno ら, Oncogene 2003; Hirabayashi ら, MCB 2003; Tajima ら, Gene Cells 2003; Irie ら, Oncogene 1999; Ide ら, BBRC 1999)。この様に、シナプスの構築機構については多くの知見が見出されて来た。一方で研究の当初、シナプスの脱構築の分子機構についての報告も徐々に増えつつあった。シナプスの脱構築機構には、タンパク質分解系の一つであるユビキチン・プロテアソーム系が重要であることが複数の研究グループから提唱されており (Ehlar ら, Nature Neurosci 2003)、神経細胞においてユビキチン・プロテアソーム系の関与が神経シナプスの発達、シグナル伝達、神経突起伸長等に関わることが明らかになりつつあった。申請者らもシナプスにおけるユビキチン・プロテアソーム系に着目して研究を進めて来た。申請者らは、ユビキチン・プロテアソーム系の分子の中でも特に、反応の特異性を決定するユビキチンリガーゼ (E3) の解明が重要であると考え、世界に先駆けて新規ユビキチンリガーゼ (E3) の候補遺伝子の一つをヒトゲノムからパイオインフォマティクスの手法を用いて特定し「SCRAPPER」と名付け、*Scraper* 遺伝子の cDNA 全長クローンをマウス脳 cDNA ライブラリーから単離してその配列を決定している。当初までの研究結果

から、SCRAPPER は神経終末に存在し、そこで神経伝達物質放出の調節に関わる分子のユビキチン化に関わる E3 と想定されたが、その詳細については更なる検討が必要と考えられた。

2. 研究の目的

研究代表者はシナプスのタンパク質分解系に着目し、パイオインフォマティクスの手法を用いてヒトゲノムデータベースよりシナプスの活動性を調節する分解系の因子の探索を行い、新規のユビキチンリガーゼ SCRAPPER の同定に成功した。本課題では、この SCRAPPER 分子がユビキチンリガーゼとして機能することを標的分子の同定とユビキチン化の検出により実証するとともに、SCRAPPER 分子の神経シナプスにおける生理学的な機能を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ユビキチンリガーゼ SCRAPPER の標的分子の候補分子について、SCRAPPER が標的分子をユビキチン化することに関与しているか、*in vitro* における再構成を行い、検討する。SCRAPPER を含むユビキチンリガーゼ (SCRAPPER-Skp1-Cullin 1-Roc1 の複合体) と標的分子を、ユビキチン存在下、ATP、E1、E2 を加えて、インキュベートし、標的分子のユビキチン化を観察する。ユビキチン化の検出方法としては、分子量の変化をターゲット分子やユビキチンに対する抗体を用いたウェスタンブロットティング法により検出する。なお、この系に加える SCRAPPER、Skp1、Cullin 1、Roc1、ターゲットタンパク質、E1、E2 は遺伝子組み換えなどによって調製したタンパク質を用いる。遺伝子組み換えとしては、それぞれの遺伝子を大腸菌や昆虫細胞、哺乳動物細胞などの宿主細胞内で発現可能なベクターに組み込んで、宿主細胞に導入し、発現したタンパク質を精製することによって得る。発現、精製が難航する場合は、直ちに宿主-ベクター系を変えることで対応する。

(2) 絞り込んだ標的分子のどの領域に結合するかを決定する。標的分子の各種領域を組み込んだ大腸菌発現ベクターを作成し、GST あるいは His タグを付したタンパク質を調製する。セファロース上に抽出した目的タンパク質を固定し、SCRAPPER タンパク質とインキュベーションすることにより pull-down 実験を行う。供沈された SCRAPPER タンパ

ク質を抗 SCRAPPER 抗体あるいは細胞に強制発現させた場合はそのタグに対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出し、結合領域を確定する。

(3) ユビキチン化が起こるときの条件について検討する。SCRAPPER はロイシンリッチな領域 (LRR ドメイン) を持つタイプの F-box タンパク質である。このタイプのユビキチンリガーゼの中には、LRR ドメインを介してリン酸化された標的分子を認識し、ユビキチン化反応を起こすことが報告されている物もあり、SCRAPPER についても同様の反応様式を示す可能性が示唆される。従って、得られた標的分子の候補分子の中で、リン酸化依存的な結合とそれに引き続くユビキチン化について解析する。リン酸化に関係なくユビキチン化が進行する場合は、その程度を比較する。

(4) 電気生理学的手法を用いて、SCRAPPER の過剰発現あるいは RNAi が神経伝達に与える影響をしらべることにより、Scrapper 依存的な神経伝達物質放出の調節機構を明らかにする。SCRAPPER による神経伝達物質の放出調節機構を調べるために、海馬初代培養神経細胞より記録される興奮性微小シナプス電流 (mEPSC) を神経終末からの伝達物質放出能の指標として、SCRAPPER 及びその類似体を過剰発現させ、阻害剤の有無、及び過剰発現の有無間で mEPSC の発生頻度、振幅、その時間経過を比較することによりユビキチン・プロテアソーム系による神経伝達物質放出の調節機構を検討する。以上の手順により、その生理学の実態の解析を行う。

4. 研究成果

(1) SCRAPPER による標的分子 RIM1 のユビキチン化を、SCRAPPER 抗体を用いた免疫沈降物によるユビキチン化実験を行い、分子量の変化をターゲット分子に対する抗体を用いたウェスタンブロッティング法により 検出することができた (図 1)。

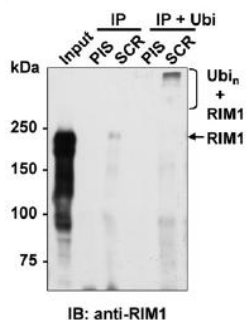


図 1
SCRAPPER 依
存的な RIM1 の
ユビキチン化

(2) 標的分子との結合領域を決定することに成功した (図 2)。

GST 融合タンパクを用いた pull-down 実験により、標的分子 RIM1 が SCRAPPER と結合する領域が C 末端の E2B ドメインであることを決定した。

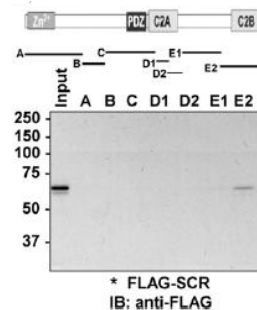


図 2
RIM1 の
SCRAPPER
結合領域

(3) 標的分子のリン酸化とユビキチン化の関係については、SCRAPPER の標的分子 RIM1 は SAD-1 キナーゼによりリン酸化されることから (Inoue et al., Neuron, 2006)、RIM1 と SAD-1 を細胞内で共発現させた時の SCRAPPER によるユビキチン化の程度を検討した。RIM1 のユビキチン化の検出が困難であったため、RIM1 の量を比較することで分解の程度を調べることを試みたが、有意な変化は見られなかった。リン酸化依存的な標的分子との結合とそれに引き続くユビキチン化についてはさらに検討の余地がある。

(4) SCRAPPER がない状態では、mEPSC の頻度が増大することが明らかとなった。また、この減少はさらに RIM1 をノックダウンすることでレスキューされた (図 4)。従って、mEPSC の増加は SCRAPPER による RIM1 の分解が欠如したことが原因であり、SCRAPPER は RIM1 の分解を介して、神経伝達物質の放出量を適切にコントロールしていると考えられる。

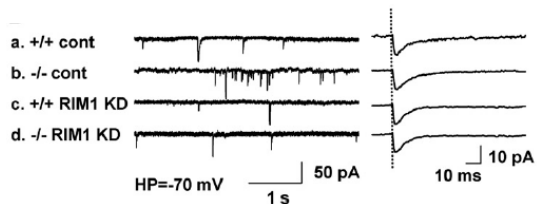


図 4
野性型あるいは SCRAPPER 欠損マウスの海馬初代培養細胞より記録される興奮性微小シナプス電流 (mEPSC)

本研究を含む成果により、SCRAPPER はプレシナプスの可塑性調節因子 RIM1 に結合し、ユビキチン化を行うこと、SCRAPPER 欠損マウスの神経細胞では RIM1 の半減期は長く、ユビキチン化は減少し、mEPSC の頻度が増加すること、さらに、RIM1 の増加や mEPSC に与えるプロテアソーム阻害剤の効果は、SCRAPPER の欠損により阻害され、従って、SCRAPPER は RIM1 のプロテアソーム依存的な分解を介したシナプスの活性の調節に重要であることが明らかとなった。

本研究で計画していた当初の目的は達成され、研究を始めた当初に得られていた結果と合わせて、SCRAPPER 分子の神経シナプスにおける機能について考察を行い、論文として報告することができた (Yao et al., Cell, 2007)。図 5 に今回の成果から明らかとなった反応の模式図を示す。

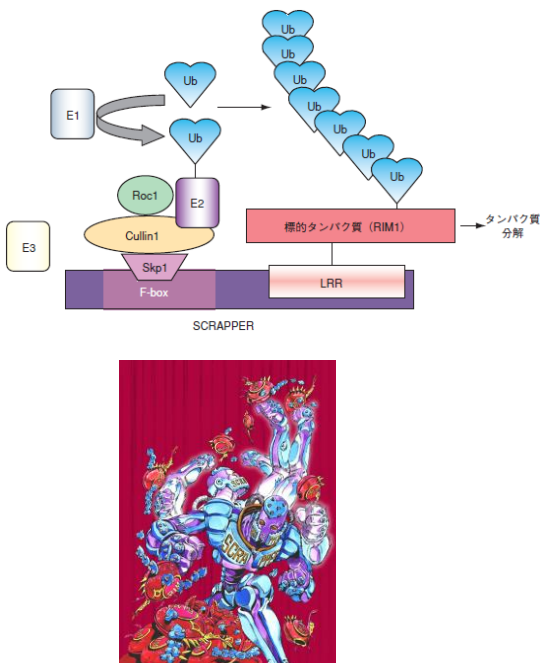


図 5. SCRAPPER 依存的なユビキチンプロテアソーム系を介した RIM1 分解のモデル図 E1,E2 の働きの後、SCRAPPER を含む SCF 複合体 E3 ユビキチンリガーゼの働きにより RIM1 はポリユビキチン化され、プロテアソームで分解される。

下の絵は、JoJo の奇妙な冒険で有名な漫画家・荒木飛呂彦氏による Cell 誌カバーデザインで、人型のものを SCRAPPER、円盤形のを RIM1、小さいハート型のをユビキチンとして表し、SCRAPPER が RIM1 にユビキチンを付加していく様子を擬人化して表現している。Yao I, et al: Cell (2007) より転載

©LUCKY LAND COMMUNICATIONS/集英社

発表した論文については各方面から大きな反響を得、関連する内容について、論文紹介および総説記事を発表した (矢尾、瀬藤、蛋白核酸酵素、細胞工学、実験医学)。日本分子生物学会年会・日本生化学会大会、神経科学学会大会をはじめとして学会発表を行い、北米神経科学大会 Neuroscience2007 学会参加に当たっては、日本神経科学学会よりトラベルアワードを受賞した。

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 7 件)

- ① Yao, I., Sugiura, Y., Matsumoto, M., Setou, M.
In situ proteomics with imaging mass spectrometry and principal component analyses in the *Scrapper*-knockout mouse brain.
Proteomics. 2008 Sep;8(18):3692-701. 査読有
- ② Yang, H., Takagi, H., Konishi, Y., Ageta, H., Ikegami K, Yao, I., Sato, S., Hatanaka, K., Inokuchi K., Seog, DH., Setou, M.
Transmembrane and ubiquitin-like domain-containing protein 1 (Tmub1/HOPS) facilitates surface expression of GluR2-containing AMPA receptors.
PLoS ONE. 2008 Jul 30;3(7):e2809. 査読有
- ③ 瀬藤光利, 矢尾育子.
ユビキチンプロテアソームシステムによるシナプス可塑性の制御. 羊土社「実験医学」, 2008 年増刊号, 26 (2), 1158-1159. 査読無
- ④ 瀬藤光利, 矢尾育子.
F ボックスタンパク質 SCRAPPER に依存的な神経伝達物質放出の制御. 秀潤社「タンパク質核酸酵素」2008 年, 53(1), 36-43. 査読無
- ⑤ 矢尾育子, 瀬藤光利.
SCRAPPER 依存的な Active Zone タンパク質 RIM1 のユビキチン化はシナプス小胞の放出を制御している.
秀潤社「細胞工学」2007 年, 10 月号, 1158-1159. 査読無

⑥ Yao, I., Takagi, H., Ageta, H., Kahyo, T., Sato, S., Hatanaka, K., Fukuda, Y., Chiba, T., Morone, N., Yuasa, S., Inokuchi, K., Ohtsuka, T., Macgregor, GR., Tanaka, K., Setou, M.
SCRAPPER-dependent ubiquitination of active zone protein RIM1 regulates synaptic vesicle release. *Cell*. 2007 Sep 7;130(5):943-57. 査読有

⑦ 瀬藤光利, 松本峰男, 矢尾育子.
医学の現状とナノメディスン.
ケミカルエンジニアリング, 2007年,
7月号, 1-7. 査読無

[学会発表] (計12件)

① 矢尾育子
シナプス構築と脱構築を介した神経伝達制御
生理研セミナー, 2009.2.20, 岡崎

② Yao I, Setou M.
Imaging proteomics with mass spectrometry
Asian Biophysics Association 6th Symposium (6th ABA Symposium)/Hong Kong Society of Neuroscience 27th Annual Meeting, 2009.1.12, Hong Kong

③ 矢尾育子
ユビキチンリガーゼ SCRAPPER による神経伝達制御
関西医科大学大学院講座第600講
2009.1.9, 大阪

④ 矢尾育子
ユビキチンリガーゼ SCRAPPER を介した神経伝達の制御第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008.12.13, 神戸

⑤ 矢尾育子
神経伝達を制御する F-box タンパク質 SCRAPPER の解析
第91回 RICEセミナー, 2008.12.8, 大阪

⑥ 矢尾育子
SCRAPPER と脳の老化認知症の臨床応用に向けて長寿研セミナー, 2008.11, 名古屋, 2008.11.13, 愛知

⑦ Yao I, Sugiura Y, Setou M.
In situ proteomics with imaging MS and PCA in the *Scrapper*-knockout mouse brain

the 38th annual meeting of the Society for Neuroscience, 2008.11.17, Washington DC,

⑧ 矢尾育子, 杉浦悠毅, 瀬藤光利
ノックアウトマウスの質量分析イメージング
第40回日本臨床分子形態学会,
2008.10.4, 福岡

⑨ Yao I, Setou M.
SCRAPPER 依存的な RIM1 の分解はシナプス小胞放出を制御している
第31回神経科学学会 Neuroscience 2008,
2008.7.10, 東京

⑩ 矢尾育子, 杉浦悠毅, 瀬藤光利
イメージング MS と多変量解析による *Scrapper* ノックアウトマウスの解析
第60回日本細胞生物学会大会
2008.6.29, 横浜

⑪ 矢尾育子
シナプス可塑性の分子的基盤 SCRAPPER 依存的なユビキチン・プロテアソームシステムによるシナプス可塑性の制御
平成20年度生理学研究所シナプス研究会, 2008.6.5, 岡崎

⑫ Yao I, Takagi H, Ageta H, Kahyo T, Sato S, and Setou M.
SCRAPPER-dependent ubiquitination of active zone protein RIM1 regulates synaptic vesicle release.
37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2007.11.5, San Diego

[図書] (計1件)

瀬藤光利編
シュプリンガー・ジャパン
「質量顕微鏡法—イメージング・マススペクトロメトリー実践プロトコール集—」2008年190ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: Scrapper タンパク質を利用した
医薬候補物質のスクリーニング方法
発明者: 瀬藤光利・矢尾育子
権利者: 三菱化学株式会社
種類: 整理番号 J12852
番号: 特願 2005-204955
出願年月日: 平成17年12月14日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢尾 育子 (YAO IKUKO)

株式会社三菱化学生命科学研究所・研究部門・分子加齢医学研究グループ 副主任研究員

研究者番号：60399681

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし