

## 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 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390082

研究課題名（和文）神経回路形成に関与する Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質の機能と作用機構

研究課題名（英文）Function and mode of action of Rab family small G proteins in the formation of neuronal network

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）：細胞内小胞輸送を制御する Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質に注目し、神経回路形成における機能と作用機構を解析した。本研究では、Rab ファミリーのメンバーのうち、特に Rab3A と Rab13 に注目した。Rab3A については、活性制御蛋白質に結合する 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。また、Rab13 とその標的蛋白質 JRAB は、アクチン細胞骨格系の再編成を時空間制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Rab family small G proteins serve as molecular switches in the regulation of vesicular trafficking. In this study, we focus on the role and mode of action of Rab3A, Rab13, and their related proteins in the formation of neuronal network. As to Rab3A, we found using the knockout mice that 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 neurite extension in PC12 cells. Our results suggest that this system may simultaneously coordinate vesicle transport and actin cytoskeletal reorganization in the neuronal network.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：高次神経機能、神経回路、神経突起形成、Rab3、Rab13

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系では、多数の神経細胞がシナプスを形成し、さらにそのシナプスが情報伝達の場として成熟することによって複雑な神経回路が形成される。神経回路の形成

過程は、まず、神経細胞から複数の幼弱な突起が形成され、そのうちの 1 本が他より長く伸長して軸索に成長することから始まる。この軸索の伸長に関しては、先端部に局在する受容体や接着分子が細胞外からの

シグナルを受け、その下流の細胞内シグナル伝達系がアクチン細胞骨格系や微小管系を制御する機構が注目され、世界中で精力的に研究されている。しかし、軸索が伸長するには、伸展する細胞膜の膜成分の十分な補充、さらには、軸索の標的細胞への正しい誘導に関わる多数の分子、例えば、上述した受容体や細胞内シグナル伝達分子群等が先端部へ輸送されることが必要となってくるが、これらを担う細胞内小胞輸送の機構についてはあまり注目されていない。また、伸長した軸索が標的となる神経細胞と出会い、シナプスを形成する際には、対峙する細胞膜の正しい場所に接着分子が輸送されてシナプス結合が形成されるが、これも小胞輸送によって制御されている。このように、神経回路の形成において、各過程を支える種々の機能分子群の輸送を担う小胞輸送は非常に重要な役割を果たしていると考えられるが、この小胞輸送の制御機構については、現在まであまり研究されていない。

一方、これまでの研究代表者のグループを含む世界中の多くの研究グループの研究により、Rabファミリー低分子量G蛋白質は細胞内小胞輸送の代表的な制御系であること、さらには、小胞輸送の過程のうち、目的地への輸送過程を規定する分子群であることが確立しつつある。したがって、上述したような時空間的に正確に制御される小胞輸送が基盤となる神経回路形成には、Rabファミリー低分子量G蛋白質が重要な役割を果たしていることが十分に予想される。

## 2. 研究の目的

本研究は、神経回路形成に関与するRabファミリー低分子量G蛋白質の機能と作用機構を明らかにすることを目的としている。研究代表者は、これまでに、Rabファミリーのうち、Rab3Aとその関連蛋白質は神経伝達物質の放出の制御に関与することを明らかにしているが、最近、いくつかの遺伝学的解析から、Rab3A系が神経発生においても機能していることを示唆する報告がなされた。Rab3Aの活性制御蛋白質Rab3GAPに間接的に結合するシナプス小胞分子として研究代表者が同定したRabconnectin-3は、分子量30万と15万の2個のサブユニットから構成される巨大分子であることから、シナプス領域、特に、神経終末の構築に関与すると予想している。一方、研究代表者は上皮細胞の接着分子輸送の制御系としてRab13-JRAB系を見出しているが、最近、米国のグループにより、Rab13は神経再生時にその発現が増加する因子のひとつであることが報告されている。また、JRABは*Drosophila*で神経回路形成に関わるMICALに類似した一連の蛋白質のひとつ

つであり、哺乳動物においても神経回路形成に関与している可能性は十分に考えられる。そこで、本研究では、このRabconnectin-3とRab13-JRAB系の神経回路形成における役割に注目した研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) Rabconnectin-3については2個のサブユニット( $\alpha$ および $\beta$ )のノックアウト(KO)マウスを各々作製し、個体レベルの解析を目指した。

(2) Rab13-JRAB系については、神経様細胞であるPC12細胞を用いた細胞生物学的解析を行った。さらに、個体レベルの解析を行うため、Rab13およびJRABのKOマウスの作製を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 本研究期間中には、Rabconnectin-3のKOマウスのうち、まず $\alpha$ 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、神経回路形成のどこに異常が引き起こされているのかを明らかにするため、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関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の構造変化が神経回路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系が神経回路形成時に認められるアクチン細胞骨格系の再編成を時空間的に制御しているというモデルを考えている。このモデルを個体レベルで証明するため、本研究では、Rab13とJRABについて神経特異

的にそれぞれがノックアウトされたマウスを作製しており、現在、神経形態学的解析をはじめ種々の解析を行っている。

#### 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 5 件)

① Withanage, K., Nakagawa, K., Ikeda, M., Kurihara, H., Kudo, T., Yang, Z., Sakane, A., Sasaki, T., 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.* 2012, in press 査読有

DOI:10.1093/jb/mvs056

② Sakane, A., Honda, K. and Sasaki, T., Rab13 regulates neurite outgrowth in PC12 cells through its effector protein, JRAB/MICAL-L2., *Mol. Cell. Biol.*, 2010, 30(4), 1077-1087 査読有

DOI:10.1128/MCB.01067-09

③ 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*, 2010, 21(23), 4162-4173 査読有  
DOI:10.1091/mbc.E10-06-0495

④ Nishimura, N. and Sasaki, T., Rab family small G proteins in regulation of epithelial apical junctions.,

*Front. Biosci.*, 2009, 14, 2115-2129 査読無

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273188>

⑤ 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.*, 2009, 29 (46), 14534-14544 査読有

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1546-09.2009

[学会発表] (計 4 件)

①坂根亜由子、佐々木卓也、

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)

② 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)

③ 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)

④Keisuke 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