

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10日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700324

研究課題名（和文）樹状突起特異的な小胞輸送に関与する Rab タンパク質の解析

研究課題名（英文）Analysis of dendrite specific Rab protein in neuron

研究代表者

森 靖典（MORI YASUNORI）

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：80443042

研究成果の概要（和文）：

神経細胞が機能するためには様々な膜（小胞）輸送過程が関与すると考えられているが、その分子基盤は未だ未解明の部分が多い。本研究では、中枢神経系において樹状突起特異的な膜輸送を司る低分子量Gタンパク質Rabファミリーに焦点を当て分子メカニズムの解明を試みた。その結果、マウス海馬神経細胞において41種類のRabタンパク質の中でただ1つ樹状突起にのみ局在するRabタンパク質であるRab17を同定することに成功した。さらに詳細な解析の結果、Rab17は神経細胞の樹状突起特異的な形態形成において必須の役割を果たしている分子であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

It has been reported that several members of the Rab family small GTPases, which are key mediators of membrane trafficking, regulate axon-specific trafficking events, but little has been elucidated regarding the molecular mechanisms that underlie dendrite-specific membrane trafficking. We showed that Rab17 regulates dendritic morphogenesis and postsynaptic development in mouse hippocampal neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学

キーワード：分子・細胞神経科学

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は成熟した細胞では1本の細長い軸索と複数の樹状突起を持っており、特異的な輸送機構が存在する。軸索には軸索特異的に機能する分子（例えば神経伝達物質を含むシナプス小胞）が選択的に輸送され、樹状突起には樹状突起特異的に機能する分子（例えば、神経伝達物質の受容体など）が選択的に輸送される機構が存在すると考えられている。軸索や樹状突起の先端部で機能する分子の多くは膜タンパク質であることから、これらの分子の極性輸送には小胞(膜)輸送が関与すると予想されるが、どのような膜輸送過程が実際に関与するのかは未だ十分に解明されていない。

神経系における小胞の輸送機構の解析は、これまで主に神経軸索特異的に局在するシナプス小胞の輸送及び放出を中心に行われてきた。そしてその輸送に関しては Rab ファミリータンパク質の中でも特に Rab3 及び Rab27 の関与が明らかになってきた。

しかし樹状突起特異的な小胞輸送機構に関しては、いかなる Rab 分子が関わっているのかについては、これまでその詳細な分子機構は全く解明されていない。

2. 研究の目的

樹状突起における膜輸送機構にも神経軸索におけるシナプス小胞輸送の場合と同様に Rab ファミリータンパク質が関与しているものと推察している。しかしながら、ほ乳類細胞における Rab ファミリータンパク質は 60 種類以上と多数のアイソフォームが存在しているため、樹状突起の小胞輸送に関わる Rab ファミリータンパク質の体系的な解析はこれまで行われておらず、未だその同定には至っていない。そこで本研究では樹状突起で働く Rab 分子の同定を行うとともに、同定した Rab の小胞(膜)の輸送機構を明らかにすることで樹状突起特異的な小胞輸送の機構の全貌を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の材料としては神経軸索と樹状突起の判別が容易に行えるマウス海馬由来の

神経細胞を用いた。まず、この細胞に GFP-tag がついた Rab ファミリータンパク質を導入し、樹状突起に局在する Rab の選別を行った。なお、樹状突起への Rab タンパク質の局在の判別は、樹状突起特異的なマーカー (MAP-2) 及び神経軸索特異的なマーカー (Neurofilament-H) との共免疫染色 (三重染色) で行った。

さらに、ここで得られた Rab タンパク質に関して RNA 干渉法によるノックダウン、および恒常的活性化型の Rab タンパク質を用いた分子生物学手法により、海馬神経細胞における役割に関して詳細な解析を行った。

4. 研究成果

本研究では、神経軸索 (すなわち前シナプス) もしくは樹状突起 (すなわち後シナプス) で機能する Rab アイソフォームを選別するため、海馬神経初代培養細胞に緑色蛍光タンパク質 (GFP) タグがつけられた Rab ファミリータンパク質 (GFP-Rab) を一過性に発現させ、その局在を分類した。その結果、41 種類の Rab タンパク質の中で樹状突起にのみ局在する Rab タンパク質として Rab17 を同定することに成功した。この Rab17 に関して詳細な解析を行ったところ、以下の点を明らかにした。

(1) Rab17 は樹状突起にのみ特異的に局在する (軸索には局在しない) 唯一の Rab ファミリータンパク質である。(図 1)

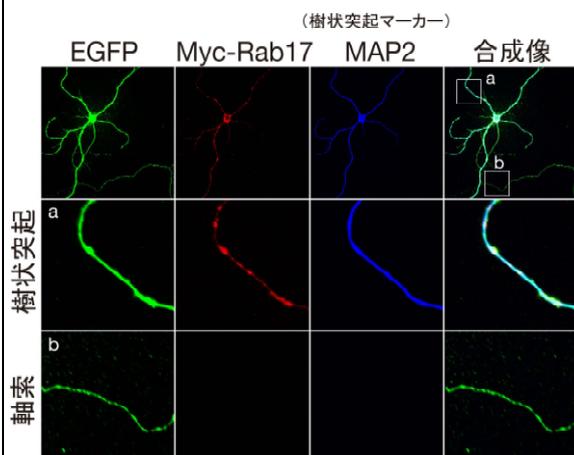


図1.Rab17は海馬の神経細胞において、樹状突起特異的に局在する

(2) Rab17は主にリサイクリングエンドソームに局在し、一部は初期エンドソームにも局在する。

(3) 海馬神経細胞の初期発生段において Rab17は細胞体のみ観察されるが、神経発生の進行とともに樹状突起へと局在移行する。特に樹状突起の先端部において多く局在している。

(4) Rab17は樹状突起の形態形成過程（本数および長さ）に関与するが、軸索の形態形成には影響を与えない（図2）。

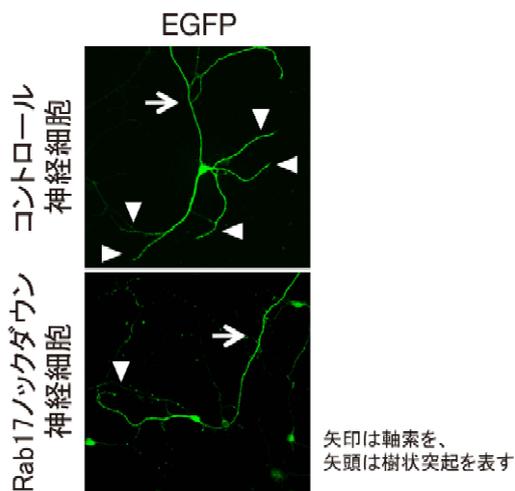


図2.Rab17は樹状突起の形態形成過程に必要である

(5) Rab17は成熟した神経細胞ではスパインに強く局在しており、かつスパインの形態形成に必要である（図3）。

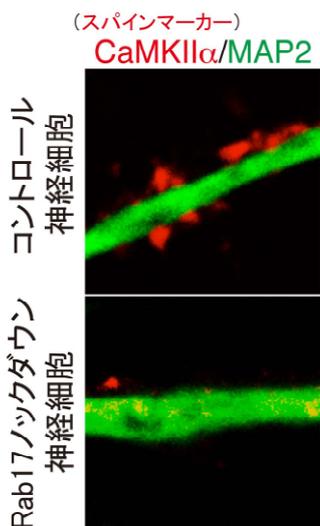


図3.Rab17はスパインの形態形成過程に必要である

(6) Rab17は発達中の神経細胞において樹状突起のフィロポディアの形態形成過程を制御することで、スパイン形成に関与する。

以上これらの結果から、Rab17は神経細胞の樹状突起特異的な形態形成において必須の役割を果たしている分子であることを明らかにした（図4）。

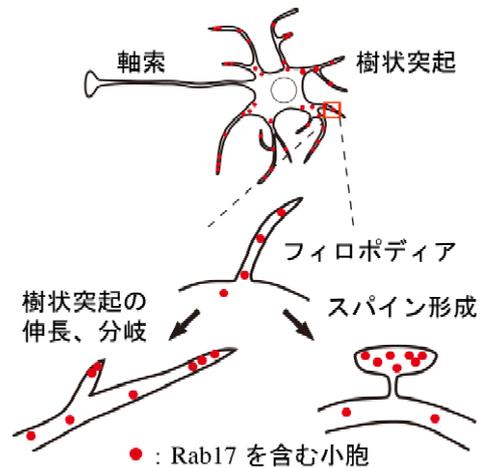


図4. Rab17による樹状突起の形態制御機構

本研究の意義

神経細胞において、樹状突起およびポストシナプスの形成過程は神経回路の形成ひいては記憶・学習に密接に関連することが知られているが、その分子メカニズムに関しては未解明の部分が多い。申請者はこれらの過程に関わる分子として Rab17 に着目し、その機能解析を通じて樹状突起特異的な小胞輸送の分子機構の全貌を明らかにすることを目指した。Rab17は当研究室で開発された独自の網羅的解析ツールを用いて申請者自身が初めて見出した分子であり、樹状突起特異的に局在する唯一の Rab ファミリータンパク質である。従って、樹状突起形成における Rab17 の機能解明に関する研究は、これまでほとんど未解明だった樹状突起特異的に働く小胞輸送機構の解明に向けた独創的な研究に発展するものと思われる。

さらに、本研究により得られる成果は、樹状突起の小胞輸送機構の解明のみならず、神経回路形成不全を伴う神経疾患の病態解明などにもつながるものと期待される。

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 3 件)

1. Mori, Y., Matsui, T., Furutani, Y., Yoshihara, Y. and Fukuda, M. (2012)
Small GTPase Rab17 regulates the dendritic morphogenesis and postsynaptic development of hippocampal neurons.
J. Biol. Chem., **287**, 8963-8973 査読有

2. Mori, Y. and Fukuda, M. (2011)
Synaptotagmin IV acts as a multi-functional regulator of Ca²⁺-dependent exocytosis.
Neurochem. Res. **36**, 1222-1227 査読有

3. Sato, M, Mori, Y., Matsui, T., Aoki, R., Ohya, M., Yanagihara, Y., Fukuda, M. and Tuboi, T. (2010)
Role of the polybasic sequence in the Doc2alpha C2B domain in dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells.
J. Neurochem. **114**, 171-181 査読有

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. Yasunori Mori, Takahide Matsui, Yutaka Furutani, Yoshihiro Yoshihara, Mitsunori Fukuda
Small GTPase Rab17 regulates the dendritic morphogenesis and postsynaptic development of hippocampal neurons.
Joint Spring Conference of BSCB / BSDB / JSDB, 17 April 2012, at the University of Warwick, Coventry, UK

2. 森靖典、松井貴英、古谷裕、吉原良浩、福田光則
Rab17, a dendrite-specific Rab protein, regulates the dendritic morphogenesis and postsynaptic development of hippocampal neurons.
第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2011 年 12 月 13 日

3. 森靖典、松井貴英、古谷裕、吉原良浩、福田光則
Rab17 regulates dendritic morphogenesis of hippocampal neurons
第 3 回新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」班会議 (鳥羽)
2011 年 6 月 2 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/fukuda_lab/home-ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者
森 靖典 (MORI YASUNORI)
東北大学・大学院生命科学研究所・助教
研究者番号：80443042

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：