

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 2 4 年 5 月 1 1 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790182

研究課題名（和文） 低分子量 G T P 結合タンパク質 R i g による神経細胞形態形成機構の解明

研究課題名（英文） Functional analysis of Ras-like small GTPase protein Rig in neural cells.

研究代表者

星野 光伸（HOSHINO MITSUNOBU）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60431962

研究成果の概要（和文）：

本研究課題は、脳をはじめとする神経系に顕著に発現しているが、その機能は未知である Ras 類似低分子量 GTP 結合タンパク質 Rig に着目したもので、神経細胞に於いて Rig がどのような生理機能を担っているのかを探索することを目的とする。これまでの代表者の解析結果から、Rig がリサイクリング系の膜輸送に関与する分子であること、及び神経細胞の形態変化に関与する分子であることが明らかとなった。Rig が膜輸送や神経突起の形態形成、分化、そして極性決定の局面で重要な機能を担っていることが強く示唆される。更に Rig の機能を探索すべく、蛍光標識した Rig 遺伝子産物を細胞内に発現する系を構築し、リサイクリング過程の実時間解析を行った。又、マウス脳破砕液から Rig と結合するタンパク質の候補群を見出す実験も行い、細胞内で Rig と結合するタンパク質群を見出した。データベース検索の結果、これらタンパク質群のうちの一つは既知のものであった。Rig がこの結合タンパク質と協調して細胞内機能を発揮していることが示唆され、更に解析を続けている。

研究成果の概要（英文）：

The newly discovered Ras-like small GTPase protein Rig is expressed prominently in neural cells and has a C-terminal CAAX prenylation motif required for membrane association. Although Rig shares high sequence identity with Ras, its physiological functions in neural cells have remained to be clarified. We have found that overexpressed Rig protein was colocalized with transferrin and with Rab11, a marker protein of recycling endosomes. Although the recycling kinetics of transferrin seemed to be indifferent to overexpressed either GTP or GDP-bound Rig mutant protein, the prenylation-deficient Rig mutant protein induced slowing down of the recycling kinetics. When this prenylation-deficient mutant protein was overexpressed in primary-cultured mouse hippocampal neurons, dendrites had fewer arborizations than those of wild type protein-expressed cells. Furthermore, we have identified binding partner candidates of Rig protein by pull down methods to clarify the physiological roles of Rig protein, such as the regulation of recycling membrane traffics and the cellular morphogenesis of neural cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：神経細胞生物学、分子形態学、Ras、低分子量 GTP 結合タンパク質、Rig、膜輸送

1. 研究開始当初の背景

本研究では、脳をはじめとする神経系に顕著に発現している、Ras 類似低分子量 GTP 結合タンパク質 Rig をテーマとするもので、神経細胞に於ける Rig の生理機能、即ち神経細胞のメンブレントラフィック及び細胞骨格動態と Rig との関わりに付いて探索することを目的とする。Rig は発現量が少ないこともあり、機能解析がほとんど進んでいない状況にあった。開始当初に於いて国内外を含めて僅かながら知られていた知見は以下の3点に集約される。

- (1) 神経系組織と心臓に特異的な発現が認められ、Ras 同様にカルボキシル末端側に脂質の修飾を受けるといった特性を有する (*Proceedings of National Academy of Science, USA.* **99** (15) 9876 ~ 9881 (2002))。
- (2) Ras とは異なり、Raf-MAP キナーゼカスケードを活性化しない。結果として、Ras に拮抗して細胞増殖を負に制御する活性を有する (*Proceedings of National Academy of Science, USA.* **99** (15) 9876 ~ 9881 (2002))。
- (3) 培養細胞に過剰発現させると細胞内に巨大な空胞を形成する活性を有する (*Journal of Biological Chemistry* **277** (43) 41070 ~ 41078 (2002))。

これらの3点の知見は示唆的ではあるが Rig の細胞内機能の一部を解明したに過ぎず、神経系に於ける Rig の高次生理機能への関与を解明するには至っていなかった。これらの初期的な報告以降、Rig の新しい知見は現在までに一切報告されておらず、Rig の機能解析は全く進んでいない状況にあった。

研究代表者は現在までに Rig とは別の神経特異的低分子量 GTP 結合タンパク質である Rin の機能解析に従事して来た。これまで Rin による神経突起形成の分子機構と、

その神経細胞内での生理機能を解明する種々の実績を上げて来ており、国内外で一定の評価を受けている (*Biochemical and Biophysical Research Communications* **295** (3) 651 ~ 656 (2002)、*Journal of Cell Biology* **163** (5) 1067 ~ 1076 (2003)、*Journal of Biological Chemistry* **280** (24) 22868 ~ 22874 (2005))。この経験を踏まえ、Rig の細胞内機能を解明する為の予備実験を行い、Rig が細胞膜を介した物質の輸送系、いわゆるメンブレントラフィックを調節し、細胞骨格の動態や細胞運動に直接影響を与えている可能性を示唆する知見を得た。神経細胞は代謝活性の高い細胞で、細胞膜を介した物質の輸送も活発である。又、発生過程で長距離にわたる細胞移動を行い、特徴ある形態を維持する上で細胞骨格系も重要である。Rig がこれらの神経系の生理機能にどう関与しているかを解明したいと考えた。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに Rig が細胞内で粒状の局在パターンを示し、これは細胞外から取り込ませたトランスフェリンや、細胞膜を介したリサイクリング輸送系に關与するマーカー分子である Rab11 と細胞内で局在を同じくすることを見出した。即ち、Rig が膜輸送、とりわけ細胞膜を介した物質のリサイクリング輸送系に關与する因子であることを示唆すると考えられる。このことから新たにマウス海馬神経細胞初代培養系を使用し、Rig の各種変異体や蛍光標識体を用いて Rig の細胞内に於ける様子、リサイクリングの過程を実時間解析により追跡し、Rab11 をマーカーとするリサイクリングエンドソームの動態に Rig がどのように關与するのか明らかにすることを目的とする。

又、Rig は神経系に顕著な発現が見られる

ことから、Rig の各種変異体を海馬神経細胞に強制発現させると、形態形成や極性分化に異常を生じるかどうかを検討する。即ち、本研究では、Rig がリサイクリング系膜輸送を介して神経細胞の活動を反映した形態変化や分化のプログラムを調節しているという作業仮説を形態学的、分子細胞生物学的に検討することを目的とする。特に神経突起の形態に着目して研究を進める。

### 3. 研究の方法

#### (1) Rig の細胞極性に与える影響の解析

神経細胞は、軸索と樹状突起という2種類の極性を持つ突起を生ずるが、Rig が細胞極性を決定する局面で何らかの役割を担っているかどうかを検討する。具体的には、軸索と樹状突起という極性を表す局面で Rig が極性を持った分布をするかどうかを免疫染色法により検討する。更に、蛍光標識した Rig タンパク質を神経細胞に発現させ、その局在や動態を実時間で観察する。又、蛍光標識した Rig タンパク質を発現させた神経細胞に外から蛍光標識したトランスフェリン分子を与え、一旦細胞内に取り込んだトランスフェリンが再び細胞外へ放出されるまでのリサイクリングの kinetics に、正常細胞と Rig タンパク質やその各種変異体過剰発現細胞との間で差が見られるかどうか、タイムラプス解析により実時間で追跡する。なお、海馬神経細胞の培養には、研究代表者が過去に神経培養の基質として相応しい特性を持つことを見出した、新規低分子量有機化合物である adhesamine を用いる (2010 年投稿論文にて公表済)。

#### (2) Rig の脂質修飾の生理機能の解析

低分子量 GTP 結合タンパク質はそのカルボキシル末端に脂質修飾を受けることで細胞膜に局在し、その生理機能を発揮することが広く知られている。Rig もその例に漏れず、脂質修飾付加 (ファルネシル化) を受け得るアミノ酸配列 (CAAX motif) を有する。Rig の脂質修飾不能変異体を発現させた神経細胞に何らかの生理機能、即ち形態異常や極性決定の異常が見出されるかどうかを検討する。脂質修飾を受けるものと受けられないもので細胞の形態を比較し、細胞内に於ける局在や動態、及び極性の決定に違いや異常が見出されるかどうかを追跡する。

#### (3) Rig による神経突起の形態制御の分子機構の解明

Rig がいかなる分子群、カスケードを用いて神経細胞の形態形成を制御しているかを解明する目的で、Rig を含む細胞複合体の構成要素に関して解析する。具体的には、マウス脳の細胞破碎液に対して、GST タグを付加した精製 Rig タンパク質を過剰量投入し、Rig タンパク質と結合するタンパク質群を

グルタチオンビーズと共沈降させる。このタンパク質複合体を SDS 電気泳動法により分離し、有意に結合が認められるタンパク質を質量分析法により同定する。得られた結合タンパク質の Rig に対する GTP 依存性、Rig との結合の責任部位などについても生化学的に検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) Rig の細胞極性に与える影響の解析

Rig の野性型、恒常的活性型変異体、及び優性抑制変異体を培養細胞内に強制的に発現させたところ、粒状の Rig 陽性構造物が検出された。この粒状の構造物は細胞外から取り込ませたトランスフェリン分子や、リサイクリングエンドソームのマーカータンパク質である Rab11 と共局在することが観察された。又、Rig のカルボキシル末端に存在する脂質修飾配列である CAAX motif の変異体 (脂質修飾不能変異体) では、そのような粒状構造物は認められず、トランスフェリン分子との共局在も観察されなかった。

更に、Rig の蛍光標識タグを付加した野性型、及び各種変異体の発現系を新たに構築し、これらを初代神経系細胞に過剰発現させ、細胞外から取り込ませたトランスフェリン分子がリサイクリングされる過程を、タイムラプス解析により実時間で詳細に観察した。その結果、脂質修飾不能変異体では、リサイクリングの kinetics が遅くなる傾向を認めた。これらの観察結果から、Rig がその C 末端に脂質修飾を受けることでリサイクリングエンドソームに局在し、その脂質修飾がリサイクリングの過程に重要な役割を担っていることが示唆された。

#### (2) Rig の脂質修飾の生理機能の解析

前述の実験結果から、Rig が脂質修飾を受けることでリサイクリングエンドソームに局在し、リサイクリング膜輸送の過程で重要な機能を担っていることが示唆されたので、次にこの脂質修飾が神経細胞の形態や極性の決定に関与しているかどうかを検討した。マウスの海馬を用いた初代神経培養法を用い、マウス海馬神経細胞に強制的に Rig の野性型、及び脂質修飾不能変異体を発現させ、その後の神経細胞の様子を形態学的に追跡した。その結果、Rig の脂質修飾変異体を発現させたものでは、コントロール、及び Rig 野性型を発現させたものに比べて神経突起、特に樹状突起の分枝が有意に減少していることを見出した。又、通常の神経細胞は培養開始後数日で軸索が1本だけ存在する形態を示すが、脂質修飾変異体を発現させたものでは、培養9日を過ぎてもまだ複数本の神経突起が軸索様の特徴 (= tau1 マーカータン

パク質陽性)を示していた。これらの観察結果や、Rig が神経細胞で顕著に発現が見られる事実から、Rig とリサイクリング過程と神経突起形成や形態形成との間に重要な相関が見られることが示唆された。

(3) Rig による神経突起の形態制御の分子機構の解明

生後3週齢～1箇月齢のマウス脳の細胞破碎液に対して、GST タグを付加した恒常的活性型変異体の精製 Rig タンパク質を過剰量投入し、Rig タンパク質と結合するタンパク質群をグルタチオンビーズと共に沈降させた。共沈降したタンパク質群をSDS 電気泳動法により分離し、質量分析法により有意に結合が認められるタンパク質群を同定した。これらをデータベース解析した結果、その中の1つは既知のタンパク質であり、興味深い機能を持つものであることが知られているものであった。共沈降実験により、Rig とそのタンパク質とは細胞内で実際に結合していることを確認した。現在、Rig がそのタンパク質と協調していかにリサイクリング過程、及び神経突起の形成や極性の決定に関与しているのか、その分子メカニズムを追求している。

今後の展望としては Rig が結合タンパク質群とともに神経細胞の活動を反映した、未知の形態変化や分化のプログラムを調節しているという作業仮説に基づいて、形態学的に、そして神経細胞生物学的に更に深く追求して行きたいと考えている。

## 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1件)

Mitsunobu Hoshino, Tetsuhiro Tsujimoto, Sayumi Yamazoe, Motonari Uesugi, Sumio Terada.

“Adhesamine, a new synthetic molecule, accelerates differentiation and prolongs survival of primary-cultured mouse hippocampal neurons.”

*Biochemical Journal* **427** (2) 297 – 304 (2010) 査読有り。

[学会発表](計4件)

(1) 星野 光伸、寺田 純雄

「Functional analysis of Rig, a novel Ras family small GTPase protein, in primary-cultured mouse hippocampal neurons.」

第34回日本分子生物学会年会 2011年12月16日、神奈川県横浜市

(2) 星野 光伸、寺田 純雄

「新規低分子量 GTP 結合タンパク質 Rig の神経細胞における機能解析」

第34回日本神経科学大会 2011年9月15日、神奈川県横浜市

(3) 星野 光伸、寺田 純雄

「Functional analysis of Rig, a novel Ras family small GTPase protein, in primary-cultured mouse hippocampal neurons」

第88回日本生理学会・第116回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会 2011年3月30日、神奈川県横浜市

(4) 星野 光伸、寺田 純雄

「新規 Ras 類似低分子量 GTP 結合タンパク質 Rig の機能解析」

第3回東京医科歯科大学脳統合機能研究センター若手シンポジウム 2011年2月19日、東京都文京区

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 光伸 (HOSHINO MITSUNOBU)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60431962

(2) 研究協力者

寺田 純雄 (TERADA SUMIO)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00262022

川岸 将彦 (KAWAGISHI MASAHIKO)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60323606