

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：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790293

研究課題名（和文）高次神経機能を支えるシナプス形成・成熟過程と小胞輸送

研究課題名（英文）Synaptic formation and maturation regulated by membrane trafficking leading to higher function of the nervous system

研究代表者

坂根 亜由子（SAKANE AYUKO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：60509777

研究成果の概要（和文）：記憶や学習をはじめとする高次神経機能を支えるシナプス形成・成熟過程における小胞輸送の役割とその制御機構を解析した。本研究では、細胞内小胞輸送を制御する Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質のメンバーのうち、特に Rab3A と Rab13 に注目した。Rab3A については、その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の異常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を明らかにした。

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 synaptic formation and maturation, leading to higher function of the nervous system. As to Rab3A, we found the mice lacking Rabconnectin, the Rab3A-related protein, exhibit neuronal dysfunction, probably because of misformation 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 synaptic formation followed by maturation.

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：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：脳・神経系形成、高次神経機能獲得、シナプス形成・成熟、小胞輸送、

Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質

1. 研究開始当初の背景

記憶や学習をはじめとする高次神経機能の成立には、まず、多数の神経細胞間での特異的かつ系統的なシナプス形成によって

脳・神経系が構築され、その後、個々のシナプスが成熟して高次に張りめぐらされた複雑な神経回路網が形成される必要がある。シナプスの形成は、1本の突起が他より長く伸

長して軸索に成長することから始まる。軸索の伸長には、伸展する細胞膜の膜成分の十分な補充、さらには、軸索の目標地点までの正しい伸長に関わる多数の分子、例えば、突起伸長促進・反発因子の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。一方、伸長した軸索が標的となる神経細胞と出会って形態的なシナプスが形成された後、さらにシナプスは情報伝達の場として成熟して機能的なシナプスになるが、この過程ではプレシナプスにアクティブゾーン、ポストシナプスにシナプス後肥厚部といった特徴的な構造が形成される。ここでも神経伝達物質を含むシナプス小胞、その放出に必要なシナプス小胞関連蛋白質やアクティブゾーンを構成する蛋白質群がプレシナプスの、シナプス後肥厚部に集積する神経伝達物質の受容体やその下流で働くシグナル伝達分子群がポストシナプスのそれぞれ正しい場所に輸送される必要がある。さらに、プレおよびポストシナプスの各々の細胞膜の対峙する正しい場所に接着分子が輸送されて安定した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、シナプス形成・成熟過程に必要な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。

一方、研究代表者は、これまでプレシナプスでのシナプス小胞輸送の過程を制御する分子として、代表的な小胞輸送の制御系である Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質 (Rab) のメンバーである Rab3A に注目した研究を進めてきており、その活性制御蛋白質 Rab3 GAP p130 のノックアウトマウスを用いた個体レベルの解析から Rab3A 系がシナプス可塑性において重要な役割を果たしていることを証明している (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006*)。また、Rab3 GAP については、そのサブユニットである p130 または p150 の遺伝子変異が精神遅滞を主症状とする遺伝性疾患の原因であることが英国のグループにより報告されているが、この疾患では、小頭症や脳梁低形成、脳回異常、小眼症等の脳・神経系の形成過程の異常による所見も認められている。さらに、最近、研究代表者は Rab3A 系の関連蛋白質であるシナプス小胞蛋白質 Rabconnectin-3 の機能についても解析しているが、これまでの解析から本蛋白質がシナプス形成の初期の段階で機能することを示唆する結果を得ている。このように Rab3A 系がシナプス成熟後の神経伝達物質放出を担うシナプス小胞輸送のみではなく、シナプス形成に関わる小胞輸送を制御することによって脳・神経系の形成に貢献している可能性がでてきている。

一方、神経系以外にも発現が認められ

る Rab のメンバーが、シナプス形成・成熟に関与する可能性もある。例えば、これまで研究代表者のグループは、神経細胞と同様に極性を有する上皮細胞の細胞間接着が Rab13 による接着分子の小胞輸送を介して制御されていることを見出しているが、そのアナロジーから Rab13 がシナプス結合の制御を介してシナプス形成・成熟に関与する可能性が考えられる。最近、米国のグループによって Rab13 は神経再生時にその発現が増加する遺伝子群のひとつであることが報告されている。さらに、研究代表者のグループは、Rab13 の標的蛋白質 JRAB を同定しているが、この JRAB は *Drosophila* で神経回路形成に関わる MICAL に類似した蛋白質群のひとつであり、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も考えられる。

2. 研究の目的

シナプス形成過程においては、突起伸長促進・反発因子の受容体とその下流の細胞内シグナル伝達分子群、細胞接着分子群、細胞骨格系蛋白質群等が、シナプス成熟過程においては、アクティブゾーンおよびシナプス後肥厚部の構成分子群等が重要な役割を果たしているが、それらは軸索あるいは樹状突起の機能部位に集積することではじめて適切に機能し得る。したがって、これらの機能分子群が細胞内小胞輸送によって正しい時に正しい場所へと輸送されることが非常に重要であると考えられる。そこで、本研究では細胞内小胞輸送のシナプス形成・成熟過程における役割とその制御機構を明らかにすることにより、脳・神経系の形成から高次神経機能の獲得までの一連の生命現象を分子レベルで理解することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、シナプス形成・成熟過程における小胞輸送の役割と制御機構を明らかにするため、大きく2つの方向からアプローチした。まず、研究代表者がこれまで解析してきた Rab3A 系に注目し、その中でまだ機能が明らかになっていないシナプス小胞上に局在する巨大分子 Rabconnectin-3 のシナプス形成における役割と作用機構を解析した。今ひとつは、Rab13 とその標的蛋白質 JRAB のシナプス形成・成熟過程における役割と作用機構を解析した。

(1) Rabconnectin-3 については2つのサブユニット (α および β) 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。また、特に JRAB についてはアクチン細胞骨格制御に対する特性を生化学的に解析した。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) 本研究では、Rabconnectin-3 の KO マウスのうち、まず α 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、脳・神経系の形成過程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) 本研究では、神経再生に関与する Rab13 とその標的蛋白質 JRAB に注目した解析を行っており、JRAB が Rab13 との結合により分子内結合が解除され、その結果、アクチン結合蛋白質に結合することを明らかにした。さらに、JRAB は、Rab13 との結合依存的つまりは自身の構造依存的にアクチン結合蛋白質群との相互作用を変化させ、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および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 系がシナプス形成・成熟過程に認められる小胞輸送とアクチン細胞骨格系の再編成の時空間的に連動した制御を行っていると考えている。さらに、本研究では、Rab13 と JRAB について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、これらのマウスを用いて、Rab13-JRAB 系の作用機構について大脳皮質形成という 3次元レベルで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 3 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

[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)

④ Keisuke 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

坂根 亜由子 (SAKANE AYUKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：60509777