

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700416

研究課題名（和文）興奮性シナプス後部に局在する IQ-ArfGEF の機能的役割の解明

研究課題名（英文）Functional roles of IQ-ArfGEF at excitatory postsynaptic sites

研究代表者

深谷 昌弘（FUKAYA MASAHIRO）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：10360900

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、精神遅滞原因遺伝子として報告され興奮性シナプス後部に局在する IQ-ArfGEF に着目し、IQ-ArfGEF のシナプス後部における機能的役割解明を目的として IQ-ArfGEF 欠損マウスの作製を行った。さらに、作製された IQ-ArfGEF 欠損マウスを用いて IQ-ArfGEF 欠損に伴う各種神経およびグリア発現分子の解析を行い、IQ-ArfGEF 欠損に伴って変化する分子を見いだした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I focused on IQ-ArfGEF, one of the excitatory postsynaptic molecules, which causes nonsyndromic mental retardation. To reveal the functional mechanisms of IQ-ArfGEF at postsynaptic sites, IQ-ArfGEF knockout mice were generated. Using IQ-ArfGEF knockout mice, many neuronal and glial marker molecules were screened by immunoblot and immunohistochemical assays. Consequently, impairment of IQ-ArfGEF was accompanied by upregulation of some neural molecules in the brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：IQ-ArfGEF、精神遅滞、ノックアウトマウス、シナプス

1. 研究開始当初の背景

低分子量 GTP 結合タンパク質である ARF6 は、細胞膜とエンドゾーム間の膜小胞輸送（エンドサイトーシス）を制御し、細胞膜表面の cadherin 等の細胞接着分子の発現量を

調節していることが知られている (Palacios et al., Nature Cell Biol, 2002)。近年、中枢神経系においてもこの ARF6 経路が発達期の神経細胞の移動や神経突起の伸展分岐、神経伝達物質受容体の細胞表面発現調節に重要な役割を果たしていることが明らかに

なってきた。ARF6 経路の中でも、ARF6 の活性制御因子である BRAG (Brefeldin A resistant ARF-GEF)ファミリーの重要性が指摘されている。最近、興奮性シナプスにおいて AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) に BRAG2 が直接結合して膜上の AMPA 受容体発現量調節を介した長期抑圧 (LTD) に関与していることが示唆され、この ARF6 経路が記憶や学習といった高次脳機能発現の基盤となるシナプス可塑性発現調節の一端を担っていることが明らかにされた (Scholz et al., Neuron, 2010)。また、BRAG ファミリー分子である IQ-ArfGEF の IQ-like モチーフもしくは酵素活性を持つ Sec7 ドメインでのアミノ酸変異が非症候群性の知的障害を引き起こすことが最近ヒトで報告されている (Shoubridge et al., Nature Genetics, 2010)。このことは IQ-ArfGEF を介した ARF 経路も脳の発達および高次機能に密接に関与していることを示している。近年、申請者らは、分子解剖学および生化学的な解析から IQ-ArfGEF が興奮性シナプス後肥厚部に選択的に局在し、NMDA 型グルタミン酸受容体の足場タンパク質である PSD-95 と直接結合すること、さらに IQ-ArfGEF の mRNA は樹状突起まで輸送されることを報告した。これらのことから、IQ-ArfGEF は神経活動依存的に局所的に翻訳されることが考えられ、興奮性シナプスにおける神経伝達物質受容体やシナプス接着分子の細胞表面発現量を神経活動依存的に調節し得る可能性があり、シナプス形成やシナプス可塑性において重要な役割を担っていると考えられる。しかしながら実際に興奮性シナプスの後肥厚部において IQ-ArfGEF が如何なる膜タンパク質のエンドサイトーシスに関与するのか、またどのような機構で興奮性シナプスの形成や維持、さらには高次脳機能に関わっているのかは不明である。この問題を解決するために申請者は IQ-ArfGEF の遺伝子欠損マウスを作製し、多面的な解析を本研究課題で行う予定である。これまでに国内、国外において IQ-ArfGEF の遺伝子欠損マウス解析の報告は全くないが、IQ-ArfGEF -ARF6 経路はシナプス形成、シナプス可塑性および高次脳機能に重要な役割を担っていると考えられているため早急な

遺伝子欠損マウスを用いた分子機能の解明が待たれていると考えられる。

2. 研究の目的

中枢神経系において IQ-ArfGEF は興奮性シナプスの PSD に局在し、ヒトの精神遅滞への関与が強く示唆されているが、どのような機構で IQ-ArfGEF が高次脳機能に関与するのかは不明である。そこで本研究課題では、IQ-ArfGEF 遺伝子欠損マウスを様々な方法を用いて解析することで興奮性シナプス後肥厚部に局在する IQ-ArfGEF の機能的役割を明らかにすることを目的として実験を遂行した。

3. 研究の方法

まず、IQ-ArfGEF のエクソン 3 を loxP 配列で挟んだターゲティングベクターを作製し、新潟大学脳研究所崎村建司教授の協力を得て ES 細胞 RENKA 株を用いて相同組み換え体を選別する。選別された ES 細胞からキメラマウスを誕生させ、さらに交配し F1 マウスを作製しジャームライントランスミッションを確認して IQ-ArfGEF-flox マウスの作製を行う。この IQ-ArfGEF-flox マウスと脳で Cre が発現する Nestin-Cre マウスを交配させ、遺伝子欠損マウスを作製する。解析方法としては野生型および IQ-ArfGEF 遺伝子欠損マウス海馬のタンパク質を抽出し、各シナプス分子の発現量を生化学的に解析する。また、主な神経伝達物質受容体、PSD 内部分子および細胞接着分子の特異抗体を用いて免疫染色を行い、スクリーニングを行う。特にグルタミン酸受容体関連の分子群を詳しく解析する。遺伝子欠損マウスで変化している分子がある場合は、抗体を用いたウエスタンブロットおよび免疫染色、免疫電子顕微鏡法により定量的に発現量の変化を比較する。また、包埋後免疫電子顕微鏡法により PSD 内部での受容体や足場タンパクの局在変化なども定量的に観察する。さらに、発現量に変化のあった分子と IQ-ArfGEF との機能的相互結合関係

を探索するため酵母ツーハイブリッド解析や免疫沈降解析を行い、各分子の相互結合作用を明らかにする。さらに、IQ-ArfGEF 遺伝子欠損マウスにおいて興奮性シナプス形成異常がないか確認するために PSD-95 に GFP が付加されたタンパク質を発現させるプラスミドベクターと RFP のみを発現させるプラスミドベクターを子宮内電気穿孔法により胎生期 12.5 日のマウス脳室層に導入し、生後 3 週間で大脳皮質 2 / 3 層神経細胞の樹状突起の形態を RFP で、興奮性シナプス PSD を GFP で可視化するとともに樹状突起スパインと興奮性シナプスを定量的に計測し、シナプス形成異常の有無を解析する。

4. 研究成果

まず、Cre-loxPシステムを用いたIQ-ArfGEF 遺伝子欠損マウスの作製を行った。IQ-ArfGEF がloxP配列で挟まれたノックインマウスを作り、Nestin-Creマウスと交配させてIQ-ArfGEF 遺伝子が欠損するマウスを作製した。このマウスにおいて抗IQ-ArfGEF特異抗体を用いた免疫染色およびイムノブロットによって脳でのIQ-ArfGEF欠損が確認された。このIQ-ArfGEF遺伝子欠損マウスを用いて、中枢神経系におけるIQ-ArfGEF欠損に伴う各種興奮性シナプス分子の発現量の変化を免疫組織染色およびイムノブロットでスクリーニングした。さらに、発現変化が確認された分子について定量的解析を行った。また、IQ-ArfGEF の結合分子であるPSD-95の発現パターンの解析を行い、興奮性シナプスの形成異常の有無を確認した。以上より、本研究課題の研究期間内においてIQ-ArfGEF欠損マウスの作製とIQ-ArfGEF欠損に伴う各種興奮性シナプス分子のスクリーニングまで達成することができた。しかしながら、IQ-ArfGEFの機能的役割と高次脳機能への関与の分子メカニズムの解明にはさらなる研究が必要である。

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) Kang S, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, Cleveland DW, Ostrow LW, Rothenstein JD, Bergles DE (2013) Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. **Nat Neurosci** 16(5): 571-579. doi: 10.1038/nn.3357 (査読 有)

(2) Sakagami H, Katsumata O, Hara Y, Tamaki H, Watanabe M, Harvey RJ, Fukaya M (2013) Distinct synaptic localization patterns of brefeldin A-resistant guanine nucleotide exchange factors BRAG2 and BRAG3 in the mouse retina. **J Comp Neurol** 521(4): 860-876. DOI: 10.1002/cne.23206 (査読 有)

(3) Nakata Y, Yasuda T, Fukaya M, Yamamori S, Itakura M, Nihira T, Hayakawa H, Kawanami A, Kataoka M, Nagai M, Sakagami H, Takahashi M, Mizuno Y, Mochizuki H (2012) Accumulation of alpha-synuclein triggered by presynaptic dysfunction. **J Neurosci** 32(48): 17186-17196 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2220-12.2012. (査読 有)

(4) Kageyama Y, Zhang Z, Roda R, Fukaya M, Wakabayashi J, Wakabayashi N, Kelsler TW, Reddy H, Iijima M, Sesaki H (2012) Mitochondrial Division Ensures the Survival of Postmitotic Neurons by Suppressing Oxidative Damage. **J Cell Biol** 197(4): 535-551. doi:10.1083/jcb.201110034 (査読 有)

(5) Tamaki H, Sanda M, Katsumata O, Hara Y, Fukaya M, Sakagami H (2012) Pilt is a coiled-coil domain-containing protein that localizes at the trans-Golgi complex and regulates its structure. **FEBS lett** 586(19): 3064-3070. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.07.051 (査読 有)

〔学会発表〕（計1件）

深谷昌弘、阪上洋行

Splice variant-dependent subcellular
localization of the Arf6 activator BRAG2
in the adult mouse brain

第118回 日本解剖学会全国学術集会
2013.3.28-30, 高松

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深谷 昌弘 (FUKAYA MASAHIRO)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：10360900