

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640025

研究課題名(和文)脆弱X症候群のmGluR発症仮説におけるArf6経路の新たな役割

研究課題名(英文)Functional involvement of the Arf6 pathway in FMRP-mediated synaptic plasticity

研究代表者

阪上 洋行 (Sakagami, Hiroyuki)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90261528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脆弱X症候群の原因遺伝子産物である脆弱X精神遅滞タンパク質(FMRP)の標的mRNAとして同定されたArf6活性化制御因子BRAG2のシナプスにおける機能解明を目指し、以下の研究成果を挙げた。BRAG2cは、PSD-95と複合体を形成し興奮性シナプスのシナプス後肥厚部に局在する。BRAG2cは、endophilinとの相互作用を介して、代謝型グルタミン酸受容体刺激に伴うAMPA型グルタミン酸受容体のシナプスからのエンドサイトーシスを制御する。以上の結果より、BRAG2-Arf6経路のFMRPによるAMPA型グルタミン酸受容体制御の下流経路として機能する可能性を提示した。

研究成果の概要(英文)：FMRP is involved in mGluR-dependent long-term depression through the regulation of local translation as an RNA-binding protein. The purpose of this study is to elucidate the role of the BRAG2-Arf6 pathway in the synaptic functions, particularly in mGluR-dependent endocytosis of AMPA receptor, because of the recent identification of BRAG2 mRNA as a FMRP target mRNA. Firstly, BRAG2c was found to localize at the postsynaptic density through its interaction with PSD-95. Secondly, BRAG2c was found to regulate mGluR-dependent endocytosis of AMPA receptor through its interaction with endophilin and subsequent Arf6 activation in cultured hippocampal neurons. These findings suggest the possible involvement of the BRAG2-Arf6 pathway in the FMRP-mediated synaptic plasticity.

研究分野：神経解剖学

キーワード：シナプス可塑性 シナプス後肥厚部 グルタミン酸受容体 低分子量GTP結合蛋白質 エンドソーム 脆弱X症候群

## 1. 研究開始当初の背景

脆弱 X 症候群は、X 連鎖性精神遅滞症候群のなかで最も頻度の高い遺伝性疾患である。その発症は、X 染色体長腕 Xq27.3 領域に存在する FMR1 遺伝子がコードする脆弱 X 精神遅滞タンパク質 (FMRP) の発現が、プロモーター領域の CGG 繰り返し配列の以上な蓄積により抑制されることに起因するものと考えられている。

神経細胞において FMRP は、RNA 結合タンパク質として樹状突起に局在する種々な mRNA のタンパク質への翻訳の調節を介して、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) の活性化によるシナプスからの AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) の長期的な減少により生じるシナプス可塑性、すなわち、mGlu 依存的な長期抑圧に深く関与している (Nosyreva & Huber, 2006; Nakamoto *et al.*, 2007)。脆弱 X 症候群においては、FMRP の発現の低下により、長期抑圧に必要な FMRP の標的 mRNA の翻訳が mGluR の刺激のない状態においても恒常的に亢進し、シナプス可塑性の障害が生じ、高次神経機能障害を引き起こすという mGluR 発症仮説が提唱されている。しかしながら、FMRP は多数の mRNA との結合能を有することから、FMRP による mGlu 依存的な長期抑圧の制御に関する分子機構の詳細は未解明である。そのため、脆弱 X 症候群における高次神経機能障害の発症分子機序に基づいた分子標的治療の開発は立ち後れているのが現状である。

ADP リボシル化因子 6 (Arf6) は、細胞膜とエンドゾーム間の小胞輸送を制御する低分子量 GTP 結合蛋白質である。Arf6 の活性化は、グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) により厳密に制御されており、現在、Arf6 に対する GEF として、BRAG (Brefeldin A-resistant ArfGEF) ファミリー分子 (BRAG1-3)、EFA6 (Exchange factor for Arf6) ファミリー分子 (EFA6A-D)、cytohesin ファミリー分子 (cytohesin1-3) からなる複数の制御因子が同定されている (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006)。近年、Arf6 が、BRAG1 や BRAG2 による活性化を介して、mGluR 依存的な長期抑圧においてシナプス後膜からの AMPAR のエンドサイトーシスを制御する新たな膜輸送経路として明らかになった (Scholz *et al.*, 2010; Myers *et al.*, 2012)。

また、近年の FMRP と結合する mRNA の網羅的探索から、BRAG2 が FMRP の標的 mRNA であることが同定された (Brown *et al.*, 2001)。さらに、BRAG1 は、FMR-1 と同様に X 連鎖性精神遅滞症候群の原因遺伝子であることが近年報告され (Shoubridge *et al.*, 2010)、従来の我々の研究により、BRAG1 の mRNA は樹状突起に豊富に分布することから、BRAG1 も FMRP の標的 mRNA である能性が考えられた。以上の結果より、FMRP と BRAG-Arf6 との機能的関連性が示

唆されたが、BRAG2 の神経細胞における細胞内局在や mGluR 依存的な AMPAR のエンドサイトーシスにおける分子機構の詳細に関して、研究開始当初、不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、脆弱 X 症候群の原因遺伝子産物である FMRP と BRAG-Arf6 経路との機能的関連の可能性を明らかにすべく、

- (1) BRAG2 の神経細胞における細胞内局在とシナプス局在機構
- (2) BRAG2-Arf6 経路による mGluR 依存的な AMPAR のエンドサイトーシスの分子制御機構の解明を研究目的として実施し、以下の研究成果を挙げた。

## 3. 研究の方法

- (1) BRAG2c に対する特異抗体の作製：他の BRAG ファミリー分子と相同性の低い BRAG2c の C 末領域をグルタチオン S トランスフェラーゼ融合発現タンパク質として大腸菌内で発現させてグルタチオン・セファロースビーズを用いて精製した。これらを抗原として、ウサギに免疫を施し、特異抗体をアフィニティー精製した。endophilin 抗体は市販の抗体を使用した。ウエスタンブロット解析法により抗体の特異性を確認した後、成熟期 C57BL6 マウスの脳を用いて免疫組織学的解析を施行した。
- (2) BRAG2c 結合蛋白質の単離：PSD に局在する BRAG2c の C 末領域を餌として、マウス脳 cDNA ライブラリーを用いて酵母ツーハイブリット法により結合蛋白質を網羅的に探索した。得られた候補分子との結合領域を pull down アッセイ法や免疫沈降法により検討した。
- (3) 初代海馬培養系を用いた BRAG2b-endophilin の相互作用の mGluR 依存 AMPAR エンドサイトーシスにおける機能解析：出生直後のマウスの海馬より初代培養細胞を作製し、BRAGc に対する shRNA ベクターと shRNA 抵抗性の野生型あるいは endophilin との結合能欠損 BRAG2b 遺伝子を共発現させた。その後、初代培養細胞をグループ I mGluR アゴニスト DHPG (3,5-dihydroxyphenylglycin) で刺激した後、AMPA サブユニット GluR1 に対する抗体を用いて細胞膜表面の AMPAR を標識して、棘突起における AMPAR の発現量を定量した。

## 4. 研究成果

- (1) BRAG2b のシナプス局在：BRAG2 には、短い C 末領域からなる BRAG2b と C 末端に PDZ ドメイン結合配列を持つ BRAG2c の少なくとも 2 種類のスプライスバリエーションが存在する。今回、BRAG2c の C 末領域を抗原に用いて BRAG2b 特異抗体を作製した。特異性は、BRAG2b と BRAG2c を発現した HeLa 細胞とマウス脳の粗抽出液を用いたウ

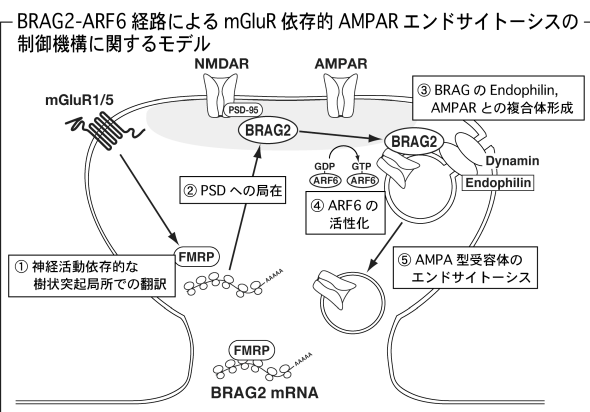
エステンブロット解析により確認した。次に免疫組織化学法を用いて、成熟期マウスの海馬における BRAG2c の発現局在を検討した。その結果、BRAG2c 陽性反応は、ペプシン処理をした切片において、海馬 CA1~CA3 領域の樹状突起の分布する上昇層、放線層、網状・分子層や歯状回の分子層に強く検出された。さらに、二重蛍光抗体法により、BRAG2c 陽性反応は AMPAR と一致した点状の分布を示すことが明らかになった。さらに CA1 領域の放線層における BRAG2c の局在を免疫電子顕微鏡解析により検討した結果、BRAG2c の免疫反応は、PSD に豊富に局在することが明らかになった。これらの結果により、BRAG2c の興奮性シナプスにおける PSD での特異的な局在を初めて解剖学的に提示した。

- (2) BRAG2c の結合蛋白質の同定:シナプスでの BRAG2c の機能解明の一助として、BRAG2c の C 末領域を餌として、酵母ツーハイブリット法により、マウス脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、PSD の足場タンパク質である PSD-95 と endophilin I, III が単離された。酵母ツーハイブリットアッセイを用いた結合部位解析により、BRAG2c は C 末端の PDZ 結合配列を介して、PSD-95 の PDZ ドメイン 1 と 2 と相互作用し、プロリンに富む配列 (PXXP) を介して、endophilin の SH3 ドメインと相互作用することが明らかとなった。さらに、マウス脳を用いた免疫沈降法により、BRAG2c と PSD-95 および endophilin が複合体を形成することを明らかにした。次に二重蛍光抗体法を用いて、BRAG2c と PSD-95 との局在を解析した結果、海馬の樹状突起の領域で点状の両者の免疫反応の多くが一致して分布することが明らかになった。以上の結果より、BRAG2c は興奮性シナプスの PSD において PSD-95 と複合体を形成して局在することが示唆された。

- (3) BRAG2c と endophilin の相互作用の機能解析: BRAG2-Arf6 経路の機能関与が mGluR 依存的な AMPAR エンドサイトーシスへの BRAG2-Arf6 経路の機能関与 (Scholz *et al.*, 2010) とともに、endophilin も mGluR 依存的な AMPAR のクラスリンを介するエンドサイトーシスに関わることが報告されている (Chowdhury *et al.*, 2006)。そこで、海馬初代培養細胞を用いて、mGluR 依存的な AMPAR エンドサイトーシスにおける BRAG2c と endophilin との相互作用の機能的役割を検討した。その結果、グループ I mGluR アゴニスト DHPG 刺激を行った場合、コントロールの海馬培養細胞では AMPAR のシナプス発現量が低下するのに対して、shRNA により BRAG2 の内因性の発現を抑制した場合、AMPA のシナプス発現の低下が抑

制され、既報の結果を確認することができた。次に、BRAG2 に対する shRNA ベクターとともに shRNA 抵抗性 BRAG2c を共発現させた場合、DHPG 刺激による AMPAR のシナプス発現の低下がコントロールと同程度に回復することから、この shRNA の効果の特異性が確認できた。さらに、プロリンに富む配列をアミノ酸置換し endophilin との結合能を欠損させた shRNA 抵抗性 BRAG2c を shRNA とともに共発現させた場合、BRAG2c の発現抑制による DHPG 依存的な AMPAR のシナプス発現量の減少の抑制効果が解除されないことより、BRAG2c と endophilin の相互作用が mGluR 依存的な AMPAR エンドサイトーシスにおいて重要であることが明らかになった。

以上の結果より、本研究により、BRAG2c が、興奮性シナプス後膜において PSD-95 との相互作用を介して PSD に局在し、endophilin との相互作用を介して、細胞膜の陥入の近辺で Arf6 を活性化させることにより mGluR 刺激に伴う AMPAR エンドサイトーシスを制御する可能性が示唆された (図)。さらに BRAG2 mRNA が FMRP の標的 mRNA のひとつであることを考え合わせると、BRAG2-Arf6 経路が mGluR 依存的な長期抑圧を制御する FMRP の下流制御経路として機能し、脆弱性 X 症候群におけるシナプス可塑性障害を説明する新たなシグナル経路



である可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Torii T, Ohno N, Miyamoto Y, Kawahara K, Saitoh Y, Nakamura K, Takashima S, Sakagami H, Tanoue A, Yamauchi Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-2 regulates myelination in nerves. *J Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 460:819-825 (2015)  
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.113.
- ② Fukaya M, Fukushima D, Hara Y, Sakagami H. EFA6A, a guanine nucleotide exchange factor for Arf6, interacts with sorting nexin-1 and regulates neurite outgrowth. *J Neurochem*. 査読有 129:21-36 (2014)  
doi: 10.1111/jnc.12524.
- ③ Yazaki Y, Hara Y, Tamaki H, Fukaya M, Sakagami H. Endosomal localization of

FIP3/Arfophilin-1 and its involvement in dendritic formation of mouse hippocampal neurons. *Brain Res.* 査読有 1557:55-65 (2014) doi: 10.1016/j.brainres.2014.02.018.

- ④ Akiyama M, Hasegawa H, Hongu T, Frohman MA, Harada A, Sakagami H, Kanaho Y. Trans-regulation of oligodendrocyte myelination by neurons through small GTPase Arf6-regulated secretion of fibroblast growth factor-2. *Nature Commun.* 査読有 5: 4744 (2014) doi: 10.1038/ncomms5744.
- ⑤ Sakagami H, Katsumata O, Hara Y, Tamaki H, Fukaya M. Preferential localization of type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase  $\gamma$  at the periaxonal zone of mouse photoreceptor ribbon synapses. *Brain Res.* 査読有 1586:23-33 (2014) doi: 10.1016/j.brainres.2014.08.051.
- ⑥ Sakagami H, Katsumata O, Hara Y, Tamaki H, Watanabe M, Harvey RJ, Fukaya M. Distinct synaptic localization patterns of brefeldin A-resistant guanine nucleotide exchange factors BRAG2 and BRAG3 in the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 査読有 521: 860-876 (2013) doi: 10.1002/cne.23206.
- ⑦ Ueda T, Hanai A, Takei T, Kubo K, Ohgi M, Sakagami H, Takahashi S, Shin HW, Nakayama K. EFA6 activates Arf6 and participates in its targeting to the Flemming body during cytokinesis. *FEBS Lett.* 査読有 583:1617-1623 (2013). doi:10.1016/j.febslet.2013.03.042.
- ⑧ Hara Y, Fukaya M, Tamaki H, Sakagami H. Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase  $\gamma$  is required for neuronal migration in the mouse developing cerebral cortex. *Eur. J. Neurosci.* 査読有 38: 2659-2671 (2013) doi: 10.1111/ejn.12286.

[学会発表] (計 17 件)

- ① 深谷昌弘、阪上洋行、BRAG2c, a long C-terminal splice variant, interacts with endophilin III to mediate AMPA receptor internalization. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2015 年 3 月 21 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- ② 原芳伸、深谷昌弘、阪上洋行、神経細胞の移動における ADP-ribosylation factor 6 (Arf6) の発現・機能解析、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2015 年 3 月 22 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- ③ 深谷昌弘、阪上洋行、海馬錐体細胞における低分子量 G タンパク質 Arf6 の細胞内局在解析、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ④ 原芳伸、深谷昌弘、阪上洋行、大脳皮質層形成における低分子量 GTP 結合タン

パク質 Arf6 の機能的役割、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

- ⑤ 深谷昌弘、阪上洋行、海馬錐体細胞の棘突起内部における低分子量 G タンパク質 Arf6 のペリシナプス性局在、第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 3 月 28 日 自治医科大学 (栃木県下野市)
- ⑥ 原芳伸、阪上洋行、脳層形成における低分子量 GTP 結合タンパク質 Arf6 の機能的役割、第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 3 月 29 日 自治医科大学 (栃木県下野市)
- ⑦ 阪上洋行、シナプス局在からみた Arf6 グアニンヌクレオチド交換因子の分子多様性の機能的意義、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑧ 阪上洋行、福島大輔、深谷昌弘、スパインにおける Arf6 活性化制御因子 EFA6A と sorting nexin-1 との相互作用、第 36 回日本神経科学大会 2013 年 6 月 21 日 国立京都国際会館 (京都府京都市)
- ⑨ 深谷昌弘、阪上洋行、Arf6 活性調節因子 BRAG2/OQSEC1 のスプライスバリエント依存的なシナプス局在、第 36 回日本神経科学大会 2013 年 6 月 21 日 国立京都国際会館 (京都府京都市)
- ⑩ 原芳伸、深谷昌弘、阪上洋行、Phosphatidylinositol 4-phosphate kinase 5 $\gamma$  は大脳皮質層形成において神経細胞の移動を制御する、第 36 回日本神経科学大会 2013 年 6 月 21 日 国立京都国際会館 (京都府京都市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

教室ホームページ:

<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/~sakagami/>

<http://web.med.kitasato-u.ac.jp/edures/kaibou-s.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阪上 洋行 (SAKAGAMI HIROYUKI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号: 90261528

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし