

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成13年度博士課程進学
氏名 西村 教子
指導教官 秋山 徹

論文題目

Studies on RICS, a Novel Rho Family GTPase-activating Protein, in the Central Nervous Systems

(新規 RhoGAP 蛋白質 RICS の脳神経系における機能解析)

ヒトの脳には約 10^{11} 個の神経細胞が存在すると考えられている。それら神経細胞同士が構築する複雑な神経回路網によって、脳は認知、思考、感情、意志などの複雑な高次精神機能を司っている。機能的な神経回路網は、いくつかの全く別個の形態形成の段階を経て形成される。新生神経細胞はそれぞれの固有の位置へと移動し、目的の領域へ適切に樹状突起や軸索を伸展し、相応しい他の神経細胞とシナプスを形成する。これらの異なる過程は全て、神経細胞の形態的発達を指揮する細胞外あるいは細胞内の刺激に応答した、細胞骨格の制御により行われている。

Rho ファミリー蛋白質 (RhoA、Rac1、Cdc42) はアクチン骨格の制御を行う重要な分子である。Rho ファミリー蛋白質は GTP 結合型の活性状態と GDP 結合型の不活性状態との両状態の相互変換が行われることで、様々な生体反応のスイッチとして機能している。Rho ファミリー蛋白質の GDP 結合型から GTP 結合型への変換は GDP-GTP exchange factor (GEF) によって触媒され、一方 GTP 結合型から GDP 結合型への変換は Rho GTPases activating protein (RhoGAP) によって促進される。また、GDP 結合型蛋白質には、GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitors) が結合し、GDP の解離を抑制することにより、不活性状態が維持さ

れている。これまでに RhoGAP は約 30 種類が報告されており、更に多くの RhoGAP が哺乳類のゲノム上で見つかっている。一方 Rho ファミリー蛋白質は約 20 種類のファミリー分子が報告されている。Rho ファミリー蛋白質に対してそれを上回る数の RhoGAP が存在することから、個々の RhoGAP は Rho ファミリー蛋白質の活性制御や、それらの特異的機能を媒介する過程で、それぞれが専門化された役割を担っていると考えられる。

当研究室で単離同定された、新規蛋白質 RICS (RhoGAP Involved in the β -Catenin-N-Cadherin and NMDA Receptor Signaling) は、腎臓、精巣、心臓そして特に脳において高く発現している蛋白質である。RICS はヒトでは 1738 アミノ酸、マウスでは 1740 アミノ酸からなり、N 末に RhoGAP ドメインを有している。その後の解析により、RICS は Cdc42 と Rac1 に特異的な GAP であることが明らかとなった (Okabe, T., et al., J. Biol. Chem., 2003)。本研究ではジーンターゲット法により *RICS* 遺伝子欠損マウスを作製し、脳における RICS の機能について、分子レベルから個体レベルに及ぶ解析を行った。

1. 神経突起伸展における RICS の機能解析

RhoGAP と Rho ファミリー蛋白質は、軸索の成長、ガイダンス、樹状突起の伸展、そしてシナプスの形成といった神経細胞の多段階な形態発達の制御に関与していることが知られている。ラット海馬の初代培養神経細胞を抗 RICS 抗体を用いて染色したところ、細胞体のみならず成長円錐にも RICS の発現が観察されたことから、神経突起伸展への RICS の関与について検討した。

PC12 細胞に野生型 RICS あるいは RICS-R58M ドミナントネガティブ変異体を遺伝子導入し、NGF 刺激により突起の伸展を誘導したところ、RICS-R58M 変異体導入細胞で著しい突起の伸展が観察された。この結果を受け、神経細胞の突起進展における RICS の機能について更に検討するため RICS ノックアウトマウスを作製した。

RICS ノックアウトマウスは正常に生まれ、成長し、繁殖力も正常であった。また組織学的解析を行った結果、RICS ノックアウトマウスの脳、腎臓、心臓、肝臓、そして大腸のいずれの組織においても構造上の異常は認められなかった。

同腹の生後 1 日目のマウスを用いて海馬神経細胞の初代培養を行い、培養 24 時間後に突起発生率について計測したところ、RICS ノックアウトマウス由来の神経細胞の方が野生型マウス由来の神経細胞に比べ、高い突起発生率を示した。

また生後 8-9 日目のマウス由来の初代培養小脳顆粒細胞においても同様の結果が得られた。

次に、Cdc42、Rac1 が神経突起の伸長を正に制御することが知られていることから、初代培養小脳顆粒細胞を用いて神経突起伸展時のこれら分子の活性化状態について検討した。培養 24 時間後の初代培養小脳顆粒細胞を用いて PBD Assay を行ったところ、野生型に比べ RICS ノックアウトマウス由来の神経細胞では活性化型 Cdc42 の量が増加していることが分かった。以上の結果から RICS は神経突起の伸展において Cdc42 の GAP として機能し、神経突起伸展を負に制御することが示唆された。

神経突起伸展を担うシグナル伝達機構には様々な経路が存在することが知られているが、その 1 つに PAK キナーゼを介する経路がある (Joneson, T., Science, 1996, Lamarche, N., Cell, 1996, Abo, A., et al., EMBO J., 1998, Dan, C., et al., Mol. Cell. Biol., 2002)。最近 PAK ファミリーの中でも特に PAK5 が、Cdc42 と協調して神経細胞の突起伸展を直接制御していることが明らかとなった (Dan, C., et al., Mol. Cell. Biol., 2002)。加えて、PAK と直接結合することにより、その局在や活性を制御する GEF が存在することから (Manser, E., et al., Mol. Cell, 1998, Feng, Q., et al., J. Biol. Chem., 2002)、RICS と PAK5 の相互作用について検討した。

Flag-RICS と 3 種類の GFP-PAK5 (野生型、S573N ドミナントアクティブ変異体、K478M ドミナントネガティブ変異体) を 293T 細胞に過発現させ、免疫沈降法を用いて複合体形成の有無を確認したところ、RICS は野生型あるいは K478M ドミナントネガティブ変異体 PAK5 と複合体を形成することが分かった。またこれら両分子の結合が直接的なものかを検討するため、*in vitro* で GST-pull down assay を行ったところ、PAK5 は RICS の 1226-1454 アミノ酸を介して、RICS は PAK5 の 223-720 アミノ酸を介して直接結合していることが確認された。このことから RICS は神経突起の伸展において PAK5 からあるいは PAK5 へのシグナルを直接伝達し得る分子であることが推察される。

2. spine の形態形成、シナプス伝達機構における RICS の機能解析

ラット海馬初代培養神経細胞の抗 RICS 抗体を用いた細胞染色により、RICS が spine にも局在することが明らかとなったことから、RICS の spine の形態形成、シナプス伝達機構への関与について検討し、これまでに以下のような知見を得

ている。

成体マウスの脳を分画すると、RICS は postsynaptic density (PSD) に局在する。さらに PSD 画分において RICS は β -カテニン、N-カドヘリン、NR2A/2B、PSD-95 と複合体を形成している。また、ラット海馬初代培養細胞における RICS の局在は、NR2B および PSD-95 と一致する。PSD 画分中の RICS は CaMKII によってリン酸化を受け、さらにリン酸化を受けた RICS の Cdc42 に対する GAP 活性は抑制される。このことから、RICS はシナプス形成および NMDA を介した細胞骨格の再編成やシグナル伝達において機能していることが推察される。

まとめ

最近、RICS と同一の分子が他の 4 つのグループから相次いで単離同定され、報告された (Nakamura, T., et al., *Mol. Cell. Biol.*, 2002, Moon, SY., et al., *J. Biol. Chem.*, 2003, Nakazawa, T., et al., *Mol. Biol. Cell*, 2003, Zhao, C., et al., *J. Biol. Chem.*, 2003)。いずれのグループも PC12 細胞、N2a 細胞そして N1E-115 細胞といった細胞株を用いて、RICS の神経突起伸展への関与を示唆している。また Nakazawa, T. らは p250RhoGAP/RICS が NR2B と直接結合することを明らかにし、p250RhoGAP/RICS が NMDAR を介したシグナル伝達に関与することを示唆している (Nakazawa, T., et al., *Mol. Biol. Cell*, 2003)。

本研究では、RICS ノックアウトマウスの解析を通じて、これまで推測の域を脱し得なかった RICS の生体内における実際の機能について、一部ではあるが明らかにすることができた。現在 RICS と PAK5 との相互作用がもたらす影響や、CaMKII を介した RICS の活性制御がもたらす細胞骨格への影響、及び NMDAR を介したシグナル伝達とそれらの関係を含むシナプス可塑性への影響について検討中である。今後このような RICS ノックアウトマウスを用いた RICS の機能解析により、複雑な神経回路の伝達機構が明らかとなることが期待される。