

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 16 年度博士課程 進学
氏 名 林 寛敦
指導教員 秋山 徹

論文題目

新規 RhoGAP 蛋白質 RICS の機能解析

神経のネットワークが正しく構築されるためには、個々の神経細胞が正しい方向に軸索を伸長させ、投射先を正しく認識して接着し、成長円錐からシナプス結合を形成・維持する必要がある。これらの各ステップの制御には極めて多くの分子群が関与するが、なかでもカドヘリン・カテニン複合体を介した細胞接着の重要性は以前から指摘されてきた。また、シナプスのつなぎ換えによる局所的な神経回路の再編成やシナプス伝達効率の増強といったシナプスの可塑的变化にも、カドヘリン・カテニン複合体が関与していることが強く示唆されている。このシナプスの可塑性には、プレシナプス側のグルタミン酸の放出量の変化や、ポストシナプス側のグルタミン酸受容体の反応性・表面発現の変化だけでなく、アクチン細胞骨格系の再編によるスパイン自体の構造的変化が重要であることが知られている。その過程で重要な働きをしているのが Rho ファミリー (RhoA, Rac1, Cdc42) 分子である。Rho ファミリーは GTP 結合状態で活性化型、GDP 結合状態では不活性化型となるが、この活性変換を制御するのが GEF (GDP-GTP exchange factor) および GAP (Rho GTPases activation protein) である。GEF は GDP 結合型から GTP 結合型への移行を促すことで Rho ファミリー分子の活性化を引き起こし、GAP は GTP から GDP へのリン酸の加水分解を促進することで活性化型から不活性化型への速やかな変化を仲介する。Rho ファミリーに対する GEF, GAP は多数同定さ

れているが、Tiam1 など RhoGEF がスパイン形態やスパインでのシグナル伝達に積極的に関与することを示す報告が多数存在するのに対し、スパインにおける RhoGAP の役割に関する研究報告は未だ少なく、多数ある RhoGAP の使い分けやその制御機構などを含め未知な部分は多い。

これまでに私たちは、 β -カテニンと相互作用する新規 RhoGAP タンパク質 RICS を同定した (岡部ら, 2003)。本研究では、RICS のスプライシングバリエント PX-RICS を新たに同定し、その機能解析を行った。また、当研究室で作成した RICS KO マウス (西村-那須ら, 2006) を用いて、Rho ファミリーを介した神経の突起伸長やスパインの形成における RICS および PX-RICS の役割について解析した。さらに、RICS および PX-RICS が NMDA シグナルの下流で機能していることを確認した。

1. 新規 RICS スプライシングバリエント PX-RICS の単離・同定

RICS は β -カテニン結合タンパク質として当研究室でクローニングされ、N 末部分に GAP ドメインをもつ新規 RhoGAP タンパク質である。RICS の C 末端を認識する抗体を使用したイムブロッティングを行うと、RICS に相当する約 210kDa バンドに加えて、約 250kDa のバンドも検出され、バリエントの存在が示唆されていた。そこで、RICS の N 末端の塩基配列を用いた Blast サーチの結果、RICS の翻訳開始コドンよりも 5'側の塩基配列が異なりさらに上流に ORF が延長する EST クローンを得た。この塩基配列をもとにさらに 5'側に伸びる EST クローンを同定していき、最終的には大腸がん cDNA ライブラリーから PCR 法により RICS バリエント cDNA の単離に成功した。その塩基配列の解析の結果、RICS のファーストメチオニンからさらに N 末側に 349 アミノ酸伸長し、その領域に PX ドメインおよび SH3 ドメイン持つことがわかり、PX-RICS と名づけた。

次に、PX-RICS の N 末端側を認識する抗体 (PX-RICS を認識するが RICS は認識できない抗体) を作製し、その抗体によって認識されるバンドが RICS 抗体で検出された 250kDa のバンドと一致することが確認できた。PX-RICS の組織ごとの発現を観察したところ、脳でもっとも発現が高く、肺や腎臓においてもわずかに発現が観察された。さらに、様々な組織に由来する培養細胞で PX-RICS と RICS の発現を見たところ PX-RICS がほとんどの培養細胞で発現しているのに対し、RICS が発現している細胞は調べた限りでは DLD-1 細胞と MCF7 細胞のみであった。上記のことから、PX-RICS が RICS のスプライシングバリエントであり、RICS と比べてユビキタスな発現を呈することから主要なアイソフォームである可能性が高いことが示唆された。

培養細胞およびマウス初代神経細胞における PX-RICS の局在を免疫蛍光染色によって確認

したところ、PX-RICS は核周辺の細胞質にドット状に染色された。このドットは、GM130 (ゴルジマーカー) や calnexin (ER マーカー), Rab5 (初期エンドソームマーカー) と部分的に共局在した。また、神経細胞では、DIV-3 における成長円錐で β -カテニン、N-カドヘリンとの共局在が観察された。

PX ドメインはリン脂質結合ドメインである。そこで標的リン脂質を特定するために、Protein-Lipid Overlay Assay, Liposome Binding Assay を行った。その結果、PI(4)P と PI(5)P との親和性が顕著で、PI(3)P との結合も確認された。Cos7 細胞に GFP タグ付きの PX ドメインを発現させると核内とゴルジ体部分に強く集積する傾向が見られた。PI(4)P はゴルジ体に PI(5)P は核内に多く存在していることが知られている。しかし、PX-RICS の全長を発現させても特定の器官に集積することはなかった。

PX-RICS の GAP 活性を確認するために、免疫沈降した PX-RICS を使用して *in vitro* GAP Assay を行った。その結果、全長の PX-RICS、RICS 共に Rac1、Cdc42 のみに対して GAP 活性を示し、RhoA に対しては全く GAP 活性を示さなかった。次に、*in vivo* での GAP 活性を調べるために、RBD、PBD Assay を行った。*in vitro* での結果と同じように PX-RICS 及び RICS の野生型は Rac1、Cdc42 に対して GAP 活性を示したが、PX-RICS 野生型の GAP 活性は RICS の野生型と比べて弱かった。興味深いことに、リン脂質と結合できない変異体 PX-RICS Y173A は RICS 野生型と同程度の強い GAP 活性を有した。PX ドメインとリン脂質との結合が、PX-RICS の GAP 活性を何らかの形で制御している可能性が考えられた。

神経突起伸長における PX-RICS の作用を調べるために、Neuro-2a 細胞に PX-RICS およびその変異体を過剰発現させた後、無血清にすることにより神経突起を誘導し、神経突起の長さを計測した。その結果、PX-RICS でも RICS と同程度に神経突起の伸長を阻害した。この系では、PX-RICS Y173A も野生型と同程度に突起伸長を阻害した。同様の結果は、PC12 細胞における NGF 誘導性の神経突起進展でも得られた。PX-RICS と RICS の両者が突起伸長に関与していることが示唆された。

2. 神経突起伸長、スパイン形成における RICS ファミリーの生理機能の解析

当研究室で作製した RICS KO マウスを用いて、RICS ファミリーが神経突起伸長、スパイン形成に及ぼす影響を調べた。まず、胚性 16.5 日目の大脳皮質、海馬の神経初代培養細胞を用いてウェスタンブロットによる蛋白質レベルでの発現分布を検討したところ、大脳皮質、海馬の双方において、PX-RICS の発現が播種直後から確認されるのに対し、RICS の発現は培養 14 日前後から見られることがわかった。また、マウス脳の発生段階における蛋白質レベルでの発現でも PX-RICS が胚性 15 日目より発現が観察されたのに対し、RICS は生後 14 日目

から発現していた。このことから、PX-RICS は主に神経突起の発達や走行に主に関与し、RICS はスパインの成熟やシナプス伝達において働く可能性が考えられた。

胚性 16.5 日目の野生型マウス及び RICS KO マウスの海馬初代神経細胞を行い、DIV-3 および DIV-6 で神経突起長を計測したところ、KO マウスでは野生型マウスと比べ有為な突起の伸展が確認された。さらに、RICS KO マウスでは Cdc42 の活性が、神経の発生段階において常に野生型マウスと比べて高いレベルを維持していることがわかった。Cdc42 や Rac1 の下流で働く JNK の活性化型であるリン酸化型 JNK の発現亢進も確認された。Erk や p38 といったその他の MAPK 系の分子の活性には変化がなかった。したがって、RICS ファミリーは主に、Cdc42-JNK シグナルに関与しているものと示唆された。

RICS は *in vitro* において NMDA シグナル伝達系の下流分子である CamK II によってリン酸化され、そのリン酸化によって GAP 活性が抑制されることが知られている (岡部ら, 2003)。そこで、海馬神経初代培養 DIV-7 および DIV-14 でグルタミン酸刺激を行った後、RICS 抗体を用いてイムノブロッティングを行ったところ、刺激 3 分後でリン酸化によるバンドのシフトが観察された。このバンドのシフトは、NMDA レセプターのアンタゴニストである APV やカルシウムキレート剤の EGTA, CamK II inhibitor である KN-93 存在化では見られなかった。DIV-14 と DIV-21 において、野生型マウスと RICSKO マウスのスパイン密度やその形態を観察したところ、RICSKO マウスではスパイン密度が高い傾向が見られたと共に、未成熟なスパイン形であるフィロポディア型スパイン数の割合が高かった。これらのことから、RICS ファミリーは、Rho ファミリー分子を介したスパイン形態の制御や NMDA を介した細胞骨格の再編やシグナル伝達において重要な働きをしていることが推察された。

3. まとめ

本研究では、RICS のスプライシングバリエントである PX-RICS を同定した。PX-RICS はリン脂質との相互作用をはじめ RICS にはない種々の特徴を有し、さらに PX-RICS は RICS よりもユビキタスな発現を呈することから、むしろ PX-RICS の方が主要なバリエントであると考えられる。また、PX-RICS および RICS はともに神経系で重要な役割を担っていることが示唆された。興味深いことに、RICS KO マウスの行動実験により、いくつかの行動異常を見出している。本研究によってその分子機構が明らかにできれば、記憶や学習といった高次脳機能を分子レベルで説明しようとする試みに貢献できると期待される。