

## 論文内容の要旨

論文題目 RhoGAPタンパク質RICS/PX-RICSの機能解析  
(Functional Analysis of Rho Family GTPase-activating Protein RICS/PX-RICS)

氏名 坂上 史佳

当研究室において $\beta$ -catenin のアルマジロリピートに結合する新規タンパク質として同定された RICS (Rho GAP involved in the  $\beta$ -catenin-N-cadherin and NMDA receptor signaling)は1738アミノ酸からなるRhoGAPタンパク質で、N末端側にGAPドメイン、中央に3つのプロリンリッチドメイン、さらにそのC末端側に $\beta$ -catenin結合領域を持つ。そのGAP活性の生理的なターゲットはCdc42であることがわかっている。さらに、RICSの研究過程で、そのスプライシングバリエントが存在していることも明らかとなり、PX-RICSと名付けられた。PX-RICSはRICSのN末端側に、リン脂質結合ドメインであるphox homology (PX)ドメインとSH3ドメインが付加された2087アミノ酸からなるタンパク質である。RICSが脳に多く発現しているのに対してPX-RICSは脳の他にも多くの組織で幅広く発現している。

PX-RICSには、PI4P(小胞の出芽や融合に関与することが知られている)に高親和性を持つPXドメインと、膜輸送関連タンパク質に多く見出されているグラニンモチーフが存在する。また、PX-RICSのGAPドメインのターゲットであるCdc42は膜輸送に関与することが知られている。さらに本研究では、PX-RICSの結合因子としてGABARAPを同定した。GABARAPは微小管結合能を持ち、小胞体・ゴルジに局在することから、

細胞内輸送に関与すると考えられている。以上の事実から PX-RICS の細胞内輸送における役割に焦点をあて、これを解析した。PX-RICS と GABARAP の結合を *in vitro* プルダウンアッセイによって調べたところ、両者が直接結合することが確認された。また、HeLa 細胞における PX-RICS と GABARAP の局在を調べたところ、両者の局在は良く一致していた。次に、PX-RICS が  $\beta$ -catenin・N-cadherin と複合体を形成することから、 $\beta$ -catenin・N-cadherin の細胞内輸送に PX-RICS が関与するのか解析を行った。PX-RICS ノックアウトマウス由来と野性型由来の MEF 細胞における  $\beta$ -catenin・N-cadherin の局在を調べたところ、ノックアウトマウス由来の MEF 細胞では、細胞間接着領域における  $\beta$ -catenin・N-cadherin の量が減少しており、これらが小胞体に蓄積していた。そこで、ノックアウトマウス由来 MEF 細胞に様々な変異型 PX-RICS を導入し、PX-RICS のどのような機能が必須であるのか、レスキュー実験を行った。その結果、この輸送には「PX-RICS と PI4P の結合」・「PX-RICS の GAP 活性」・「PX-RICS と GABARAP の結合」が必須であることがわかった。さらにマスマスペクトロメトリーによって、PX-RICS の新たな結合因子として、14-3-3 $\theta$ および $\zeta$ を同定した。14-3-3 $\theta$ ・ $\zeta$ は HeLa 細胞で PX-RICS と共局在していた。そこで、14-3-3 $\theta$ と $\zeta$ が  $\beta$ -catenin・N-cadherin の細胞内輸送に必須であるかどうかを確認するため、RNAi により 14-3-3 $\theta$ と $\zeta$ をノックダウンし、 $\beta$ -catenin・N-cadherin の細胞内局在の変化の有無を調べた。14-3-3 $\theta$ 及び $\zeta$ をノックダウンした細胞では  $\beta$ -catenin・N-cadherin は核周辺に留まっており、細胞間接着領域ではその量が減少していた。さらに、これまで 14-3-3 の結合因子として同定されている多くのタンパク質の中から、細胞内輸送に関連する可能性のあるものをピックアップし、免疫沈降実験により PX-RICS-14-3-3 複合体と結合するか調べた。その結果、PX-RICS-14-3-3 複合体は、dynein-dynactin 複合体の構成因子 (dynein heavy chain, dynein intermediate chain, p150<sup>glued</sup>) と結合した。次に、これら dynein-dynactin 複合体の構成因子の HeLa 細胞における局在を、免疫蛍光染色によって確認した。その結果、これらのタンパク質は PX-RICS とともに、14-3-3 とともに、強く共局在することがわかった。よって PX-RICS が 14-3-3 を介してモータータンパク質である dynein-dynactin と巨大な複合体を形成することを示唆した。以上の結果から、PX-RICS が小胞体-ゴルジ間において  $\beta$ -catenin-N-cadherin 複合体の輸送を担っている可能性を示した。

また我々はこれまで、RICS/PX-RICSは脳に多く発現していること、Cdc42に対して GAP活性を発揮すること、神経細胞のPSD (postsynaptic density) 画分に多く含まれていること、NMDA受容体やN-cadherinと複合体を形成していること、CaMK IIによってリン酸化を受けそのGAP活性が抑制されることを見出している。これらの知見は

RICS/PX-RICSが脳神経系において記憶・情動などの高次機能に関与している可能性が高いことを示している。しかし、個体レベルでのRICS/PX-RICSの生理的役割に関しては未だ報告がない。そこで本研究では、当研究室で初めて作製されたRICS/PX-RICSノックアウトマウスを用いて、神経活動のファイナルアウトプットのひとつである行動に着目し、RICS/PX-RICSの生理機能を解析した。情動に関する試験である明暗往来試験を行った結果、不安の指標となる「明箱への移動時間」が、RICS/PX-RICSノックアウトマウスで顕著に短くなっていた。また、オープンフィールド試験では、RICS/PX-RICSノックアウトマウスにおいて、中央領域における滞在時間がやや長く、高架式十字迷路試験では、オープンアームへ入った回数が増加しており、オープンアーム滞在時間も有意に長くなっていた。よって、情動に関する3種の実験によりRICS/PX-RICSノックアウトマウスは低不安状態にあることが明らかになった。さらにうつモデル試験である、強制水泳試験、尾懸垂試験を行った。その結果、両試験においてうつ傾向の指標である「無動時間」がRICS/PX-RICSノックアウトマウスで有意に短くなっていた。さらに強制水泳試験においては水泳距離が長くなっていたことから、RICS/PX-RICSノックアウトマウスは抗うつ様行動を示すことがわかった。以上のことから、RICS/PX-RICSの欠損が不安の減少・抗うつ効果をもたらすことが初めて明らかになった。