

I R-Ras サブファミリー低分子量 G タンパク質の中樞神経系における役割の解析

Role of R-Ras subfamily small GTPases in the central nervous system

生沼泉
Oinuma, I.

神経細胞により構築される複雑かつ緻密な神経ネットワークによって、高次脳機能が発揮される。海馬や大脳皮質の神経細胞は、*in vitro* の初代培養系において時系列順に、細胞体の初期接着、ラメリポディアの萌出、マイナープロセスの形成と伸長、マイナープロセスの中からの軸索決定、軸索の伸長および分枝化、樹状突起の伸長と分枝化を伴った成熟、樹状突起スパインの形成および成熟という段取りで発達していく。その各々の過程で、低分子量 G 蛋白質は、様々な介在タンパク質を用いて神経細胞の形態制御を行うことが知られている。

R-Ras サブファミリーは、R-Ras (R-Ras1)、TC21 (R-Ras2)、および M-Ras (R-Ras3) の3つの構成因子から成る低分子量 G 蛋白質サブグループである。われわれのこれまでの研究で、R-Ras は神経軸索の決定やその後の伸長や分枝の過程に関与していること (Oinuma *et al.*, 2007; Iwasawa *et al.*, 2012)、また、M-Ras が樹状突起の伸長と分枝を伴った成熟の過程に関与している (Saito and Oinuma *et al.*, 2009; Tasaka *et al.*, 2012) ことが明らかになっている。しかしながら、TC21 の生理的役割や、上流・下流のシグナル経路はあまり解明されていない。そこで、今年度は主に、TC21 の脳神経系の構築における生理的役割を解明することを目的として研究を行った。

中枢神経系における各 R-Ras サブファミリーの発現パターンを調べるために、昨年度までは RT-PCR 法や *in situ* hybridization 法を用いた実験アプローチを用いていたが、さらに各遺伝子間の発現量比較における定量性を高めた評価をするために、「エピトープタグノックイン法」の実験システム構築を行った。具体的には、CRISPR/Cas9 システムを用いた受精卵に対するゲノム編集法を用いて、全身の組織において HA タグ配列を R-Ras、TC21、M-Ras それぞれの遺伝子座の開始 ATG の直後に付加することで各低分子量 G タンパク質の時空間的発現量を同一の HA タグの量で定量することを可能とした。現在、この実験システムを用い、各臓器間、各発達時期における TC21 の発現パターンと他の R-Ras ファミリーの発現パターンとの比較解析を進めている。

発現部位の空間的解析の過程で、TC21 は特に網膜神経系において高い発現が見られることが明らかとなった。それを踏まえ、マウス網膜の発達過程における TC21 の役割について、*in utero* electroporation 法 (子宮内電気細孔法) を用いて検証した。TC21 に対して特異的にノックダウン効果を発揮する shRNA ベクターを作成し、新生仔網膜に対しての特異的遺伝子操作により内在性の TC21 に RNA 干渉を用いたノックダウン

を行い、その表現型を解析した。その結果、未分化網膜前駆細胞から視細胞への分化過程に TC21 が必要であることが明らかとなった。

現在、TC21 がどのようなエフェクターを介して上記機能を発揮するかの分子メカニズムについて、引き続き研究を進めている。

Ⅱ 核ラミナとヘテロクロマチンの相互作用の解析

Interaction between nuclear lamina and heterochromatin

廣瀬富美子
Hirose, F.

核膜の裏側に存在する核ラミナは A-type lamin (lamin A) と B-type lamin (lamin B) タンパク質が重合した網目状の繊維構造である。核ラミナは、核膜とクロマチンの両者と相互作用し、転写・DNA 複製・DNA 修復など多岐にわたる核内反応の調節に関わっていることが知られているが、これに関わる因子やその制御メカニズムについては、解明されていない。我々はこの問題を解決するために、核ラミナと相互作用するクロマチン結合因子の精製を試み、HP1(heterochromatin protein 1)ファミリータンパク質をその候補因子として見出した。そこで、lamin A と各 HP1 ファミリータンパク質メンバー(HP1 α , HP1 β , HP1 γ)との相互作用の特異性を生細胞内でのたんぱく質間相互作用を検出できる Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 解析法調べたところ、HP1 β のみが lamin A と相互作用することが判明した。HP1 β はヘテロクロマチン特異的に結合することが報告されていることを考慮すると、lamin A が HP1 β との結合を介してヘテロクロマチンと相互作用している可能性が考えられる。R5 年度は、lamin A が HP1 β とのみ相互作用する分子的根拠を示すために、lamin A との相互作用に関与する HP1 β タンパク質のアミノ酸配列を決定するための実験を開始した。具体的には、HP1 β の一部を HP1 α の相当領域と置き換えた HP1 α と HP1 β のキメラ変異体および HP1 ファミリータンパク質の中で HP1 β のみにユニークなアミノ酸残基を HP1 α/γ のそれと置換した一アミノ酸置換型 HP1 β を作成した。これらの HP1 β 変異体がそれぞれ lamin A と相互作用するか否かを BiFC 解析法および共免疫沈降実験で調べた。現在までに得られた結果からは lamin A との特異的相互作用に関わるアミノ酸領域を特定の場所に絞り込めていない。このことは、HP1 β タンパク質上の複数の領域(アミノ酸配列)が lamin A との特異的結合に関与している可能性を示唆する。現在、さらなる HP1 β 変異体を作成し検討中である。