

I R-Ras サブファミリー低分子量 G タンパク質 TC21 の神経細胞樹状突起形態制御およびシナプス形成における役割の解析

Role of TC21 of R-Ras subfamily small GTPases in neuronal dendritic maturation and synapse formation

生沼泉
Oinuma, I.

記憶や学習などの高次脳機能は、脳神経の主な構成細胞である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。一方で、TC21 の中枢神経系における具体的な機能の解析はなされていない。そこで、われわれは、まず、TC21 の脳における発現部位および時期を解析し、神経細胞の発達過程でどのような生理的機能があるのかを明らかにすることを目的として研究を行った。

はじめに、胎生期から成体までのマウス脳を回収し、RT-PCR 法を用いた発現のタイミング解析を行った。その結果、TC21 の mRNA は神経細胞が発達する間、持続して発現していることがわかった。次に、*in situ hybridization* 法を用いて成体脳組織における発現部位の空間的解析を行った。その結果、大脳皮質の皮質層や海馬のアンモン角など、神経細胞が密度高く存在している部位に特に強いシグナルが認められた。また、胎生期から成体までのラット脳や海馬初代培養神経細胞での TC21 タンパク質の発現量の変化を解析したところ、樹状突起の成熟やスパインの形成が起こる時期に非常に強い発現が認められた。

上記結果を踏まえ、まず、樹状突起が成熟する時期のラット初代培養神経細胞に常時

活性型変異体 TC21 (TC21-QL) を過剰発現させ、その表現型を解析した。その結果、常時活性型変異体 TC21 を過剰発現させることにより、樹状突起から伸びる短い突起構造物であるフィロポディアの数の増加が観察された。次に、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、内在性の TC21 に RNA 干渉を用いたノックダウンを行った。その結果、樹状突起のフィロポディアの数が減少した。また、このノックダウンによる効果は shRNA 耐性ミュータントである res-TC21 を共発現させることによって阻止された。また、スパイン形成期のラット海馬初代培養神経細胞においては、野生型 TC21 (TC21-WT) を過剰発現させることで、スパインの増加が見られ、内在性の TC21 を RNA 干渉を用いてノックダウンすることで、スパインの減少が見られた。

以上の結果より、神経細胞において TC21 は神経細胞樹状突起において、将来スパインになるようなフィロポディアの形成や維持への関与、さらにはスパインへの成熟への関与が示唆された。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/C) 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。なかでも、核膜直下でのヘテロクロマチンの形成に深く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、核ラミナとクロマチンの相互作用に関わる因子の同定を試みている。核ラミナは細胞分裂のたびに崩壊と再構築を繰り返す。我々は、核ラミナとクロマチンとの特異的な相互作用は、核ラミナの構築と分裂期染色体の脱凝縮が起こる分裂期終盤に起こるであろうと想定し、この時期に lamin A と相互作用する因子を検索してきた。その結果、ヘテロクロマチン結合たんぱく質である HP1 が免疫沈降実験で lamin A と共沈降し、さらに細胞内での共局在することを見出した。

我々は lamin A が核膜直下のヘテロクロマチン形成に関与することを示す予備的な証拠を得ている。そこで、分裂期の終わりから G1 期にかけて起こるヘテロクロマチンの核膜直下への再配置に lamin A-HP1 間相互作用が関与しているかどうかを調べるために、ヘテロクロマチンと lamin A の核内ダイナミクスを追跡するための蛍光たんぱく質を利用したライブセルイメージングの系を立ち上げた。生細胞での lamin A と HP1 との相互作用は、蛍光たんぱく質を利用した細胞内のたんぱく質因子間相互作用を検出できる Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 解析システムを利用した。

BiFC 法により HP1 ファミリータンパク質のひとつである HP1 β と lamin A の相互作用は分裂期の終期の染色体の周りで始まり、G1 期初期の約 5 時間の中に相互作用の場は核内部から核周縁部に移動することを見つけた。このことは、ヘテロクロマチン結合タンパク質と核ラミナ構成タンパク質の直接的な相互作用が重要な役割を担っていることを示唆する。

発表論文等 List of Publications

- I-1 松田孝彦、生沼泉：ゲノム編集技術を用いたマウス中枢神経系における内在性蛋白質の蛍光標識と発現動態の解析．ポスター発表 第 93 回日本生化学会大会（令和 2 年 9 月、Web 開催）
- II-1 廣瀬富美子：RepoMan/PP1 γ 複合体は分裂期終期の lamin A を脱リン酸化する
ポスター発表 第 42 回分子生物学会年会（令和 2 年 12 月、Web 開催）

科学研究費補助金等

1. 科学研究費助成事業（基盤 B）（令和 2 年度-令和 4 年度）
研究課題 ガイダンスシグナルのハブ分子としての低分子量 G 蛋白質 R-Ras の機能解析
研究代表者 生沼 泉
2. 科学研究費助成事業（新学術領域研究）（平成 31-令和 2 年度）
研究課題 アクチン足場の選択的スプライシングの時空間ダイナミクスが担う軸索誘導の新概念
研究代表者 生沼 泉
3. 科学研究費助成事業（基盤 C）（平成 30-令和 2 年度）
研究課題 G1 期における核ラミナとヘテロクロマチンの相互作用の解析
研究代表者 廣瀬 富美子