

## I R-Ras サブファミリー低分子量 G タンパク質の神経回路形成における役割の解析

Role of R-Ras subfamily small GTPases in neuronal network formation

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、それら研究はいずれも、培養細胞レベルでの *in vitro* での研究に基づいた知見であり、*in vivo* における生理的役割に関しては調べられていなかった。そこで、われわれは、個体脳内での R-Ras の神経回路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。

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グ解析を行った。その結果、R-Ras 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、大脳皮質の皮質層の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 R-Ras タンパク質の発現量の変化を解析したところ、神経軸索の伸長および枝分かれ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、マウス大脳の体性感覚野の神経細胞の軸索伸長における R-Ras 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。R-Ras 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、大脳皮質体性感覚野 2 / 3 層の神経細胞に対しての特異的遺伝子操作により内在性の R-Ras 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。胎生期早期

からのノックダウンでは、神経細胞の軸索投射時期よりも以前のイベントである **radial migration** (脳室側から皮質側への放射状移動) が阻害されることが明らかになった。そのため、その後の発達過程で起こる軸索伸長への影響を評価することが困難だったため、さらに、胎生期後期における時期特異的なノックダウンを、薬剤誘導による時期特異的なノックダウンシステムを構築し、それを用いて行うことで行い、軸索伸長期特異的な影響を観察した。その結果、神経細胞が移動を完了した生後1日目からの **R-Ras** のノックダウンにより、神経軸索の伸長が抑制されている様子が観察された。また、この軸索伸長抑制効果は **shRNA** 耐性ミュータントである **res-R-Ras** を共発現させることによって阻止された。また、軸索伸長期の体性感覚野神経細胞においては、野生型 **R-Ras** (**R-Ras-WT**) を過剰発現させることで、神経軸索の伸長促進が見られた。

以上の結果より、大脳皮質発達過程において **R-Ras** が神経細胞の移動、そしてその後の軸索伸長に寄与していることが示唆された。現在、**R-Ras** 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与し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、**lamin A** と **HP1(heterochromatin protein 1)** が相互作用することを見出した。まず、**lamin A** と **HP1** ファミリータンパク質(**HP1 $\alpha$** , **HP1 $\beta$** , **HP1 $\gamma$** ) との相互作用の特異性を調べたところ、**HP1 $\beta$** のみが **lamin A** と相互作用した。**HP1 $\beta$**  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 $\beta$**  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。能性が考えられた。そこで、ヘテロクロマチンの核膜直下への配置に **lamin A-HP1** 間相互作用が関与しているかどうかを調べることを目的に、**HP1** と **lamin A** の核内ダイナミクスを追跡するために、両者の相互作用を生細胞で検出できる **Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)** 解析システムを樹立した。同調培養細胞を用いて細胞周期を通しての両タンパク質の相互作用の時期と場所を観察したところ、分裂期の終期の染色体の周りで始まり、**G1** 期初期の約5時間の間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ヘテロクロマチンの核内配置の決定に重要な役割

を担っていることを示唆する。現在、両タンパク質の相互作用の特徴を生化学的アプローチによって解析している。

## 発表論文等 List of Publications

I-1 松田孝彦、生沼泉：精密・迅速・可逆的な遺伝子発現 ON/OFF 制御システムの開発と神経発生研究への適用。ポスター発表 第 94 回日本生化学会大会（令和 3 年 11 月、Web 開催）

II-1 Takanobu Moriuchi and Fumiko Hirose: SUMOylation of RepoMan during late telophase regulates dephosphorylation of lamin A. *Journal of Cell Science* 134 (17), 247171 (2021). doi:10.1242/jcs.247171

## 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. 公益財団法人 島津科学技術振興財団 研究開発助成（令和 3 年度-令和 4 年度）

研究課題 遺伝子機能の *in vitro* ならびに *in vivo* における定量的比較計測法の開発

研究代表者 生沼 泉

3. 兵庫県立大学 女性研究者研究活動助成金（令和 3 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