

海馬ニューロンの形態形成における
F-BAR/EFC 蛋白質 Rapostlin の役割

脇田 洋平

目次

要旨	1
第1章 序論	2
第2章 結果	8
第3章 考察	24
第4章 結論	28
実験方法	29
参考文献	35
謝辞	47

要旨

Pombe Cdc15 homology (PCH) 蛋白質は、細胞膜管状陥入を起こす F-BAR/EFC ドメインを持ち、様々な細胞膜の再構成に重要な役割を果たしている。その中でも、Rapostlin/formin-binding protein 17 (FBP17) は代表的な PCH 蛋白質の 1 つであり、エンドサイトーシスの調整に必須な蛋白質として注目を集めている。また、Rapostlin は Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 Rnd2 のエフェクターとして同定されたが、その神経系における機能は全く不明であった。

本論文で私は、Rapostlin が海馬を含む発達段階後期の脳に強く発現していることを見出した。この時期は、樹状突起スパインの形成および成熟が盛んに行われる時期である。初代培養海馬ニューロンにおいて、shRNA による Rapostlin ノックダウンおよび F-BAR ドメインに変異を入れ細胞膜管状陥入を起こす能力を欠失した Rapostlin-QQ を過剰発現すると、スパイン形成が阻害された。Rapostlin-WT の shRNA 耐性変異体を発現させると、Rapostlin ノックダウンによるスパインの減少が回復した。しかしながら、Rnd2 結合領域である HR1 ドメイン、あるいは SH3 ドメインを欠損させた Rapostlin shRNA 耐性変異体 (Rapostlin- Δ HR1、Rapostlin- Δ SH3) を発現させても、スパインの減少は回復しなかった。さらに、海馬ニューロンで Rapostlin のノックダウンおよび Rapostlin-QQ の過剰発現は、トランスフェリンの取り込みを阻害した。Rapostlin のノックダウンと同様に、Rnd2 のノックダウンはスパイン形成およびトランスフェリンの取り込みを阻害した。これらの結果から Rapostlin と Rnd2 が協調的に働き、スパイン形成を制御していることが示唆された。実際、Rnd2 は Rapostlin による細胞膜管状陥入を促進した。

以上の結果から私は、F-BAR ドメイン蛋白質 Rapostlin は、Rnd2 による調節を受け、細胞膜ダイナミクスを制御してスパイン形成を制御することを見出し、スパイン形成の新たなメカニズムを明らかにした。

第 1 章

序論

生命体は個体を取り巻く環境の様々な情報を知覚し、それらの情報を処理して外界に応答していく。この生命体の情報処理機能、即ち、認知、記憶、思考、情動、運動などの高次機能を発現するために脳神経系は必須である。ニューロンは脳神経系の構成単位であり、特徴的な極性を持っており、通常細胞体から一本の長い軸索と複数の短く分枝化した樹状突起を伸ばしている。情報は樹状突起や細胞体でシナプスを介して別のニューロンから受け取り、細胞体を通して軸索から、さらに別のニューロンへと伝達されていく。高次神経機能の発現には、ニューロンが神経突起を介して互いに接続し、複雑かつ精緻な神経回路を形成することが不可欠である。

神経回路は、さまざまな段階を経て形成される。ニューロンは神経幹細胞から分化した後、適切な場所へと移動し、神経突起を投射させ、標的となる相手とシナプスを形成する。この複雑に統制された神経回路は、ニューロンの形態が精密に制御されることによって形成される。この回路形成が正確に行われないと、脳神経系は正常に機能することが出来ない。すなわち、ニューロンの形態制御機構は、脳神経系の制御メカニズムを理解する上で非常に重要である。

ニューロンの形態形成の研究には、海馬ニューロンの初代培養系が広く用いられている (Goslin et al., 1998)。海馬ニューロンが基質に接着すると、細胞辺縁にラメリポディアを形成する (stage I)。しばらくすると、細胞体から極性を持たない複数本の短い突起を伸展させる (stage II)。そのうちの 1 本の突起が長く伸長し始め軸索となる (stage III)。その間、軸索となる突起以外の突起はほとんど伸長しないが、軸索が伸びていくにつれその他の突起も伸展が起こり、先が細く分枝化したパターンが特徴的な複数本の樹状突起を形成する (stage IV)。この樹状突起はさらに複雑に分枝化し、別のニューロンの軸索と相互作用しシナプスを形成して、成熟したニューロンとなる (stage V; Fig. 1-1)。海馬ニューロンのこのような形態変化は、主に細胞骨格の構築により決定づけられる。

Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質は、細胞骨格の制御を介して細胞の運動や形態変化を調節する分子である (Hall, 1998)。Rho ファミリー G 蛋白質は、他の

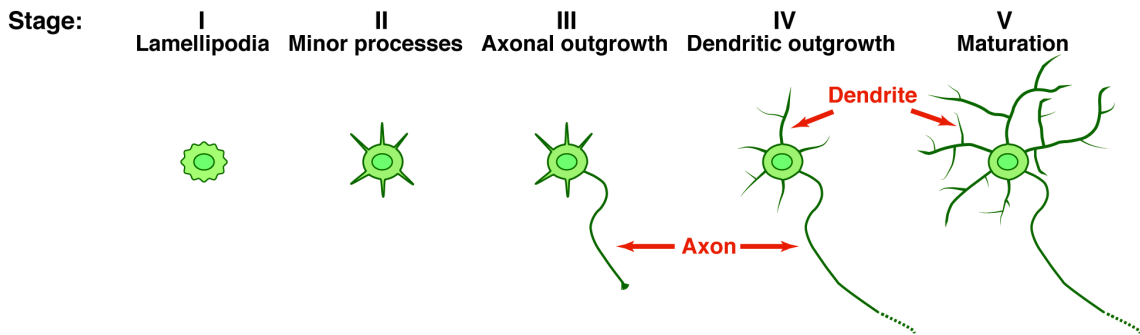


Fig. 1-1 培養ニューロンの成長過程

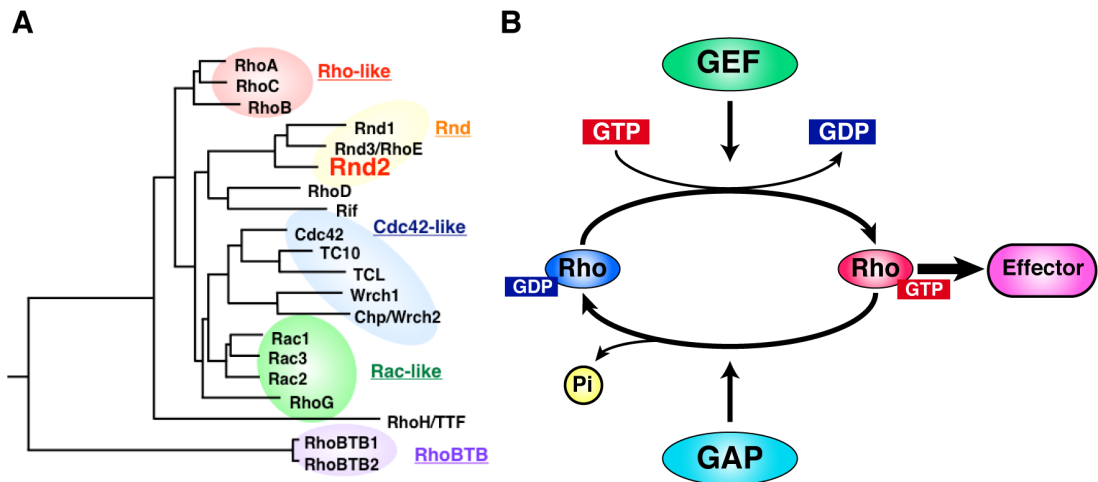


Fig. 1-2 Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質

(A) Rho ファミリーに属する 20 種の蛋白質の系統樹 (Burrige and Wennerberg, 2004)。(B) Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質は、不活性型の GDP 結合型と活性型の GTP 結合型をサイクルすることで分子スイッチとして働く。GEF (guanine nucleotide exchange factor) は GDP-GTP 交換反応を促進することで Rho ファミリー G 蛋白質を活性化する。活性化された Rho ファミリー G 蛋白質はそれぞれ特異的なエフェクターに作用して、多様な生理機能を発揮する。一方で、GAP (GTPase activating protein) は内在性の GTP 加水分解反応を促進することで Rho ファミリー G 蛋白質を不活性化する。

低分子量 G 蛋白質と同様に、不活性状態の GDP 結合型と活性状態の GTP 結合型が存在し、細胞内シグナル伝達において分子スイッチとして働く (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Fig. 1-2B)。Rho ファミリー G 蛋白質は不活性型から活性型に変換されると、その特異的なエフェクターに作用して多様な生理的機能を発揮する。Rho ファミリー G 蛋白質の活性化は、GDP-GTP 交換反応を促進する様々な GEF (guanine nucleotide exchange factor) により制御される。一方で、活性化された Rho ファミリー G 蛋白質は、内在性の GTPase 活性を触媒する GAP (GTPase activating protein) によって不活性化が促進される。このような活性制御因子により、Rho ファミリー G 蛋白質の活性は、細胞内で時間的、空間的に厳密に制御されている。

現在までに哺乳類において Rho ファミリーに属する低分子量 G 蛋白質は 22 種類同定されており、多様な細胞機能に関する研究が行われている (Fig. 1-2A)。中でも、RhoA、Rac1、Cdc42 は特に研究が進んでおり、線維芽細胞などの培養細胞において RhoA はストレスファイバー (stress fiber) を、Rac1 はラメリポディア (lamellipodia) を、Cdc42 はフィロポディア (filopodia) をそれぞれ形成し、細胞運動や細胞接着、極性形成などを制御することが知られている。これらは脳の広範な領域に発現しており、ニューロンにおいても、移動や神経突起の伸長、シナプス形成に関与していることがこれまでに多数報告されている (Kawauchi et al., 2003; Konno et al., 2005; Luo, 2000; Negishi and Katoh, 2002; Govek et al., 2005)。また近年の研究により、TC10 や Rnd1 といった他の Rho ファミリー蛋白質も神経突起形成に関与していることが次第にわかってきており、Rho ファミリーに属する様々な分子がニューロンの形態調節に関与していることが示唆される (Tanabe et al., 2000; Ishikawa et al., 2003; Ishikawa et al., 2006)。

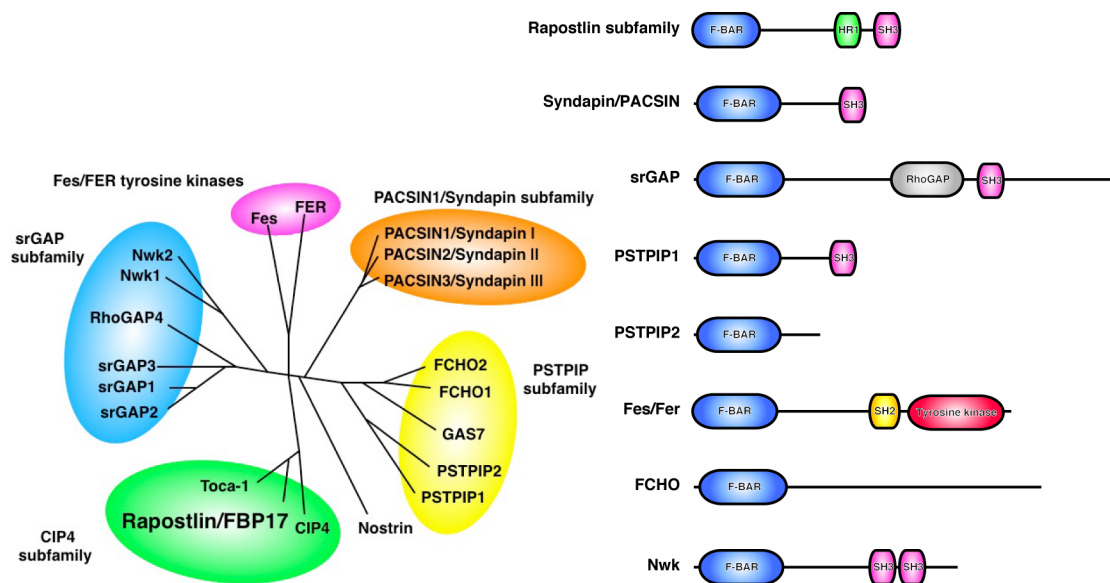


Fig. 1-3 PCH ファミリーの相同性を表した樹形図およびドメイン構造
 Rapostlin サブファミリーは Rapostlin、Toca-1、CIP4 から構成される。HR1, protein kinase C-related kinase homology region 1; SH3, Src homology 3 domain; SH2, Src homology 2 domain (Aspenström et al., 2006)。

細胞の形態制御は、脳を含む様々な組織の発達における最も重要な過程の一つである。上述のように、これまで細胞の形態制御機構の解明は、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質やそのエフェクター分子など、アクチン骨格の再構成を制御している分子を中心に研究がおこなわれてきた (Hall et al., 1998; Luo et al., 2000; Negishi et al., 2002; Burrige et al., 2004)。しかしながら、細胞形態制御における細胞膜の制御機構はほとんど明らかになっていない。そのため、細胞膜の変化とアクチン骨格の再構成という二つの現象の関係性が注目を集めてきた。近年、細胞膜を直接変形させる作用がある F-BAR/EFC ドメイン (Fer/CIP4 homology (FCH) domain and BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) / extended Fer/CIP4 homology) を持つ PCH (pombe Cdc15 homology) ファミリーが報告された (Aspenström et al., 2006; Dawson et al., 2006; Itoh et al., 2006; Chitu et al., 2007; Suetsugu et al., 2010)。Rapostlin (forming-binding protein 17, FBP17) は PCH ファミリー蛋白質の一員であり、エンドサイトーシスにおいて、陥入時にエンドサイトーシス部位に集積する (Kamioka et al., 2004; Itoh et al., 2005; Tsujita et al., 2006; Shimada et al., 2007; Wu et al., 2010)。Rapostlin の F-BAR ドメインは、二量体を形成してバナナ型の構造をとる (Peter et al., 2004; Shimada et al., 2007)。そし

て、F-BAR ドメインがその凹面の正電荷を持つ残基で、phosphatidylserine や phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) などの負電荷を持つ脂質との相互作用により、細胞膜と直接結合する。このようにバナナ型構造の内側に膜が結合することにより、Rapostlin は細胞管状陥入を起こし、clathrin 依存性エンドサイトーシスの一端を担っている。実際、shRNA による Rapostlin のノックダウンは、A431 細胞や HeLa 細胞において、エンドサイトーシスを阻害する (Itoh et al., 2005; Tsujita et al., 2006)。また、Rapostlin サブファミリー蛋白質は C 末端の SH3 ドメインを介して、N-WASP と dynamin に結合し、両蛋白質をエンドサイトーシス部位に移行させる。N-WASP は Arp2/3 複合体を活性化し、アクチン重合を促進している (Miki et al., 2003; Takenawa et al., 2007)。エンドサイトーシスにおいて、アクチン重合により生じる力は小胞切断の駆動力となるので、N-WASP によるアクチン重合の活性化はエンドサイトーシスに重要である (Qualmann et al., 2000; Schafer, 2002; Merrifield, 2004; Merrifield et al., 2004; Benesch et al., 2005; Innocenti et al., 2005; Kaksonen et al., 2006)。また、dynamin は管状に陥入した膜を切断して小胞にする (Hinshaw, 2000; Praefcke and McMahon, 2004)。このように、Rapostlin は細胞膜の陥入、アクチン重合、そして小胞切断を協調的に効率良く制御することによって、エンドサイトーシスに重要な役割を果たす。

Rapostlin は、N 末端の F-BAR ドメイン、C 末端の SH3 ドメインに加え、PCH ファミリーに共通のドメインである HR1 (protein kinase C-related kinase homology region 1; also referred to as acidic region) ドメインを真ん中に持っており、Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 Rnd2 と特異的に結合する (Fujita et al., 2002)。しかし、この相互作用が Rapostlin の機能に果たす役割についてはまだよく分かっていない。Rnd2 は Rho ファミリーの一員として新たに発見された Rnd サブファミリーに属する (Foster et al., 1996; Nobes et al., 1998; Chardin, 2006)。Rnd サブファミリーは Rnd1、Rnd2、Rnd3/RhoE からなり、通常の Rho ファミリー G 蛋白質と異なり、GTPase 活性を欠損した常時活性型の G 蛋白質である (Fig. 1-2A)。Rnd1 と Rnd3 については、RhoA シグナルを抑制して、ストレスファイバー形成の抑制などを起こすことが知られている。Rnd3 は RhoA のエフェクター、ROCK I を阻害し (Riento et al., 2003)、Rnd1 と Rnd3 は RhoA の GAP である p190 RhoGAP を活性化することによって RhoA シグナルを阻害する (Wennerberg et al., 2003)。Rnd3 は幅広い組織に発現しているが、Rnd1 と Rnd2 は主に脳に発現している (Foster et al., 1996; Nobes et al., 1998; Nishi et al., 1999)。Rnd1 は樹状突起の伸展及

びスパイン形成に関与している (Ishikawa et al., 2003, 2006)。Rnd1 は軸索ガイダンス因子 semaphorin による成長円錐崩壊にも必要である (Oinuma et al., 2003, 2004, 2004, 2006; Ito et al., 2006) 。Rnd2 は大脳皮質における放射状移動を制御しており (Nakamura et al., 2006; Heng et al., 2008)、また semaphorin による軸索の成長制御にも関わっている (Uesugi et al., 2009)。

樹状突起シナプス後部構造体スパインは、樹状突起から突出した小さな突起状の構造体であり、中枢神経系においてほとんどの興奮性シナプス入力を受け取る役割をもつ (Hering and Sheng, 2001; Nimchinsky et al., 2002; Yuste et al., 2004; Tada et al., 2006; Cooney et al., 2002; Park et al., 2006)。スパインの形態形成は、機能的なシナプス構造の形成に必須である。スパインの数や形態は活動依存的なシナプス可塑性と関連しており、実際、精神遅滞などの神経疾患においては、スパイン構造の異常がみられる (Negishi and Katoh, 2002; Ramakers, 2002; Newey et al., 2005)。スパインの形態制御機構としては、これまで、Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質とそのエフェクター (Hall, 1998; Luo, 2000; Etienne-Manneville and Hall, 2002; Negishi and Katoh, 2002; BurrIDGE and Wennerberg, 2004) などによる、アクチンフィラメントを介した制御 (Hering and Sheng, 2001; Tada and Sheng, 2006) が主に研究されてきた。それに比べて、スパイン形成には細胞膜の供給が必要であるにも関わらず、スパイン形成において膜輸送を制御する機構については、あまりよくわかっていない。最近、リサイクリングエンドソームからの細胞膜の供給が、スパイン形成に重要な役割を果たすことが報告され (Cooney et al., 2002; Park et al., 2006)、エンドサイトーシスからの細胞膜のリサイクリングがスパイン形成に重要であることが示唆された。しかし、その詳細な分子メカニズムについては未だ不明である (Cooney et al., 2002; Park et al., 2006; Thomas et al., 2009; Saneyoshi et al., 2010)。

Rapostlinは主に脳に発現しているが (Fujita et al., 2002)、その生理的役割については不明であった。本研究では、スパイン形成が盛んにおこなわれる発達段階後期の海馬を含む脳にRapostlinが発現していることを見出した。また初代培養ラット海馬ニューロンにおけるノックダウン実験により、Rapostlinがスパインの発達を制御していることが示された。さらに、Rnd2はRapostlinの細胞膜陥入作用を促進し、スパイン形成に関わっていることが明らかになった。以上の結果から、RapostlinとRnd2は協調的に細胞膜ダイナミクスを制御してスパイン形態を制御する、スパイン形成の新しいメカニズムが強く示唆された。

Rapostlin は発達段階後期の脳に強く発現している

私の所属する研究室では以前、ノーザンブロットイングによって、Rapostlin がラット組織の中で、脳に強く発現していることを見出した (Fujita et al., 2002)。本研究では、Rapostlin の発現を調べるために、Toca-1 には存在しない Rapostlin に特異的な配列 (Fujita et al., 2002; Ho et al., 2004) である Rapostlin の 339-369 残基に相当するペプチドを抗原としてウサギに抗血清を産生させ、抗 Rapostlin 抗体を精製した。この抗体は、293T 細胞に過剰発現させた Rapostlin を特異的に認識し、Toca-1 は認識しなかった (Fig. 2-1A)。

次に、ラット脳の発達に伴う Rapostlin の発現の変化を調べた。胎生 16 日齢 (E16) から成体までのラット脳ホモジネートを用いて、抗 Rapostlin 抗体によるイムノブロットイングをおこなったところ、Rapostlin の脳における発現は胎生期に弱く、シナプス形成がおこる生後に次第に増加した (Fig. 2-1B)。Rnd2 の脳での発現も、Rapostlin と同様に、生後次第に増加した (Fig. 2-1B)。

ラット脳における Rapostlin の発現分布を詳しく調べるために、スパイン形成が盛んな時期である P14 のラット切片に対して、抗 Rapostlin 抗体を用いて、免疫組織染色をおこなった (Fig. 2-1C)。Rapostlin の発現は、大脳皮質ニューロン (Fig. 2-1C, panel a)、海馬ニューロン (Fig. 2-1C, panel c)、および小脳プルキンエ細胞 (Fig. 2-1C, panel d) にみられた。抗 Rapostlin 抗体を予め抗原ペプチドで抗原吸収しておくこと、シグナルはみられなかった (Fig. 2-1C, panel b and data not shown)。この Rapostlin 発現の分布は *in situ* ハイブリダイゼーションにより報告された Rnd2 mRNA の発現分布と類似していた (Nishi et al., 1999)。Rapostlin と Rnd2 が脳においてスパイン形成が盛んな時期に強く発現していることから、両蛋白質がスパイン形成に重要な役割を果たしているかと推察された。

続いて、Rapostlin の神経機能を調べるために、ラットの初代培養海馬ニューロンを用いて実験を行った。培養海馬ニューロンにおける Rapostlin および Rnd2 の成長に伴った発現量の変化を、イムノブロットイングにより解析したところ、Rapostlin は脳全体でみられたのと同様に、海馬ニューロンにおいても発達段階後期に強い発現がみられた (Fig. 2-1D)。同様に、Rnd2 も海馬ニューロンにおい

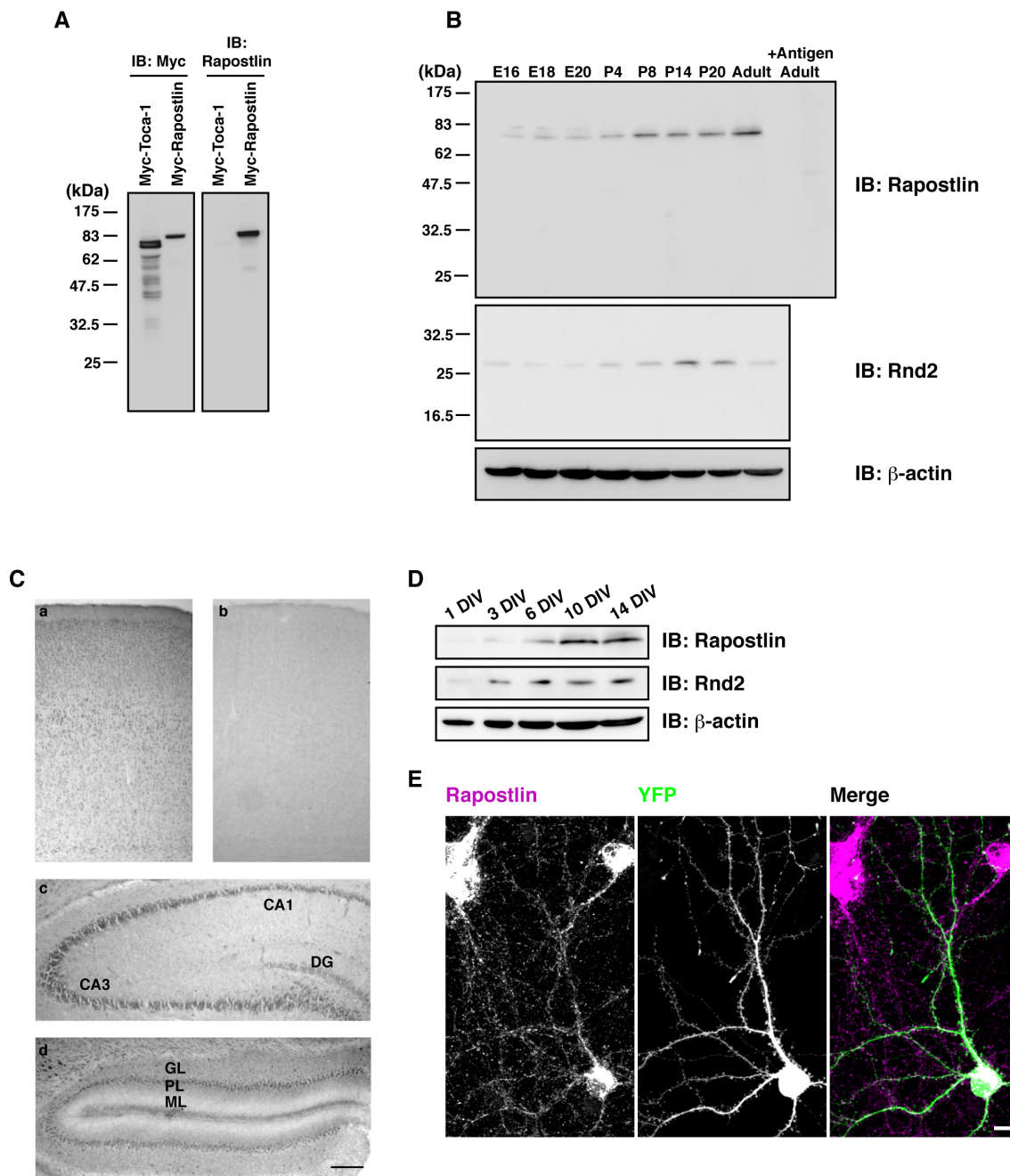


Fig. 2-1 Rapostlin は脳において発達段階後期に強く発現している

(A) HEK293T細胞にMyc-Toca-1もしくはMyc-Rapostlinの発現ベクターを導入し、抗Myc抗体および抗Rapostlin抗体により検出した。(B) 胎生16日齢 (E16) から成体までのラットの全脳ホモジネートを、SDS-PAGEおよびイムノブロッティングを行い、抗Rapostlin抗体および抗Rnd2抗体により検出した。内部標準として抗 β -actin抗体を用いた。スケールバー: 200 μ m。(C) 生後14日齢(P14)ラッ

ト脳の冠状切片に対して抗 Rapostlin 抗体を用いて免疫組織染色を行った。(a, b) 大脳皮質, (c) 海馬(CA, アンモン角; DG, 歯状回), (d) 嗅球 (GL, 嗅状層; MCL, 僧帽細胞層; GCL, 顆粒細胞層)。抗 Rapostlin 抗体を予め抗原ペプチドで抗原吸収しておく、シグナルはみられなかった (data not shown)。(D) 初代培養海馬ニューロンを培養 1、3、6、10、14 日目 (DIV, days in vitro) に回収し、細胞溶解物を SDS-PAGE およびイムノブロッティングを行い、抗 Rapostlin 抗体および抗 Rnd2 抗体により検出した。内部標準として抗 β -actin 抗体を用いた。(E) 初代培養海馬ニューロンを培養 15 日目に固定し、抗 Rapostlin 抗体 (Red) を用いて免疫染色を行った。細胞の形態は EYFP 発現ベクターの遺伝子導入により可視化した(green)。スケールバー: 20 μ m。

て発達段階後期に強い発現がみられた (Fig. 2-1D)。

さらに、培養 15 日目 (15 DIV) の初代培養ラット海馬ニューロンにおける内在性 Rapostlin の細胞内局在を、免疫細胞染色によって調べたところ、Rapostlin は細胞体および樹状突起に局在していた (Fig. 2-1E)。

Rapostlin のノックダウンはスパイン形成を抑制する

Rapostlin の生理的役割を調べるため、Rapostlin の発現を抑制する Rapostlin に対する shRNA ベクターを作製した。Rapostlin shRNA-A および shRNA-B は内在性 Rapostlin の発現レベルを抑制したが、Rapostlin shRNA-C 及び luciferase shRNA は Rapostlin の発現量に影響しなかったため、control shRNA として用いた (Fig. 2-2A)。 α -tubulin の発現量に変化はみられなかった。この結果は Rapostlin 抗体の特異性を裏付けるものである。Rapostlin の発現は樹状突起スパイン形成の時期に増えるため、shRNA による Rapostlin ノックダウンによってスパイン形成への影響を調べた。初代培養海馬ニューロンに、Rapostlin shRNA と EYFP 発現ベクターを培養 11 日目にトランスフェクションし、スパインが発達する時期である培養 15 日目に固定し樹状突起スパインの発達を観察した。スパイン形成に対する Rapostlin のノックダウンの効果を定量的に解析したところ、Rapostlin shRNA を発現させた海馬ニューロンでは、Control shRNA を発現させたニューロンと比較して、樹状突起スパインの数が減少した (Fig. 2-2B)。定量的に解析するため

Fig. 2-2

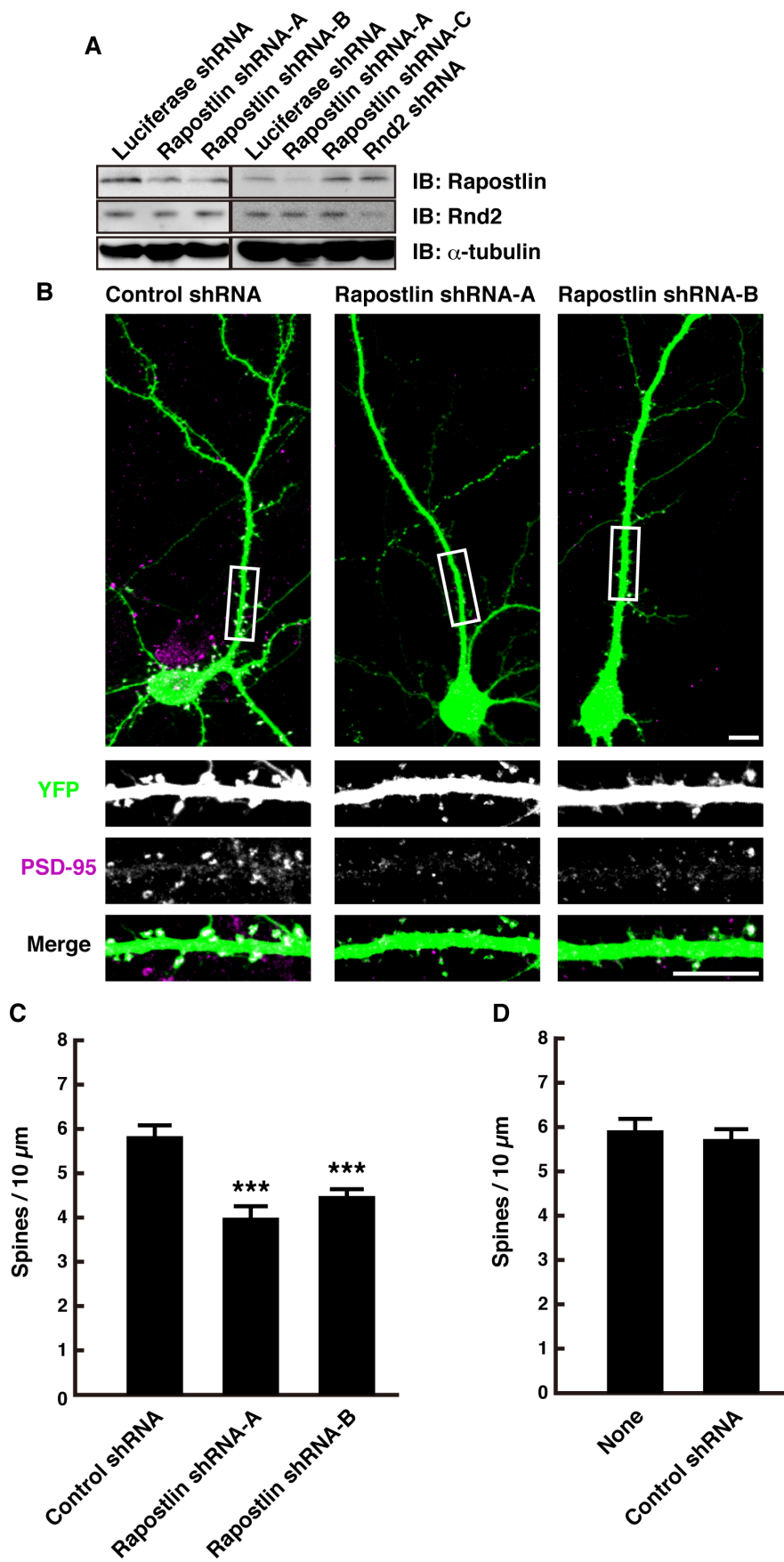


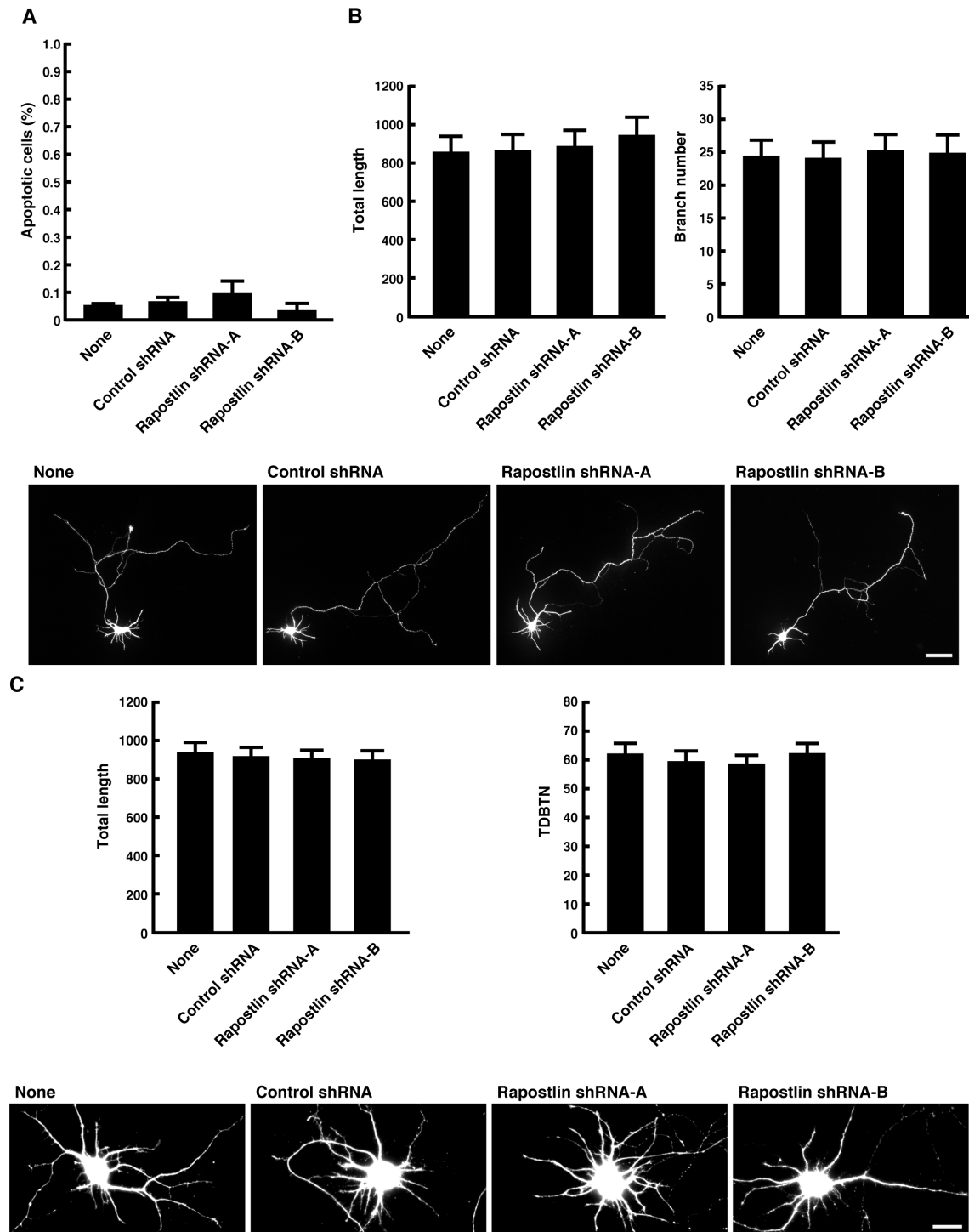
Fig. 2-2 Rapostlinのノックダウンは樹状突起スパイン形成を阻害する

(A) shRNA発現ベクターを導入した海馬ニューロンを培養8日目に回収し、細胞溶解物をSDS-PAGEおよびイムノブロッティングを行い、抗Rapostlin抗体により検出した。内部標準として抗 α -tubulin抗体を用いた。(B) 培養11日目の海馬ニューロンにEYFPおよびshRNAの発現ベクターを導入し、培養15日目に固定した。遺伝子導入された細胞は、ポストシナプスマーカーであるPSD-95で染色(magenta)し、EYFPの蛍光(green)で形態を観察した。下3つのパネルは一番上のパネルの囲まれた領域を拡大したものである。スケールバー: 10 μ m。(C and D) 同様の条件で、EYFPおよび表記の発現ベクターを導入した海馬ニューロンの樹状突起スパインの密度を定量した。ニューロンあたり100-200 μ mの樹状突起上に存在するスパインの数を定量した。それぞれの処理群に対して、3回の独立した実験から合計45個の細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。*** $P < 0.001$ (vs. Control shRNA; $n=60$; t test)。

Fig. 2-3 Rapostlinのノックダウンは軸索および樹状突起の形態形成に影響しない。

(A) 培養11日目の海馬ニューロンにEYFPおよびshRNAの発現ベクターを導入し、培養15日目に固定した。TUNEL陽性核を持ちEYFPの蛍光を観察できるニューロンをTUNEL陽性ニューロンとして定量した。(green)で形態を観察し、定量した。それぞれの処理群に対して、3回の独立した実験から細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。*** $P < 0.001$ (vs. None)。(B) 培養2日目の海馬ニューロンにEYFPおよびshRNAの発現ベクターを導入し、培養4日目に固定した。遺伝子導入された細胞は、EYFPの蛍光で形態を観察し、軸索の全長(total length)ならびに分枝数(Branch number)を定量した。軸索は5 μ m以上の突起を分枝として数えた。軸索は軸索マーカーTau-1で染色し、判別した(data not shown)。それぞれの処理群に対して、3回の独立した実験から合計45個の細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。スケールバー: 50 μ m。(C) 培養5日目の海馬ニューロンにEYFPおよびshRNAの発現ベクターを導入し、培養7日目に固定した。遺伝子導入された細胞は、EYFPの蛍光で形態を観察し、樹状突起の全長(total length)ならびに全分枝数(TDBTN)を定量した。樹状突起は5 μ m以上の突起を分枝として数えた。樹状突起は樹状突起マーカーMAP2で染色し、判別した(data not shown)。それぞれの処理群に対して、3回の独立した実験から合計45個の細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す。スケールバー: 20 μ m。

Fig. 2-3



に、実際に樹状突起上のスパインの数を定量したところ、Rapostlin をノックダウンしたニューロンでは有意にスパインの数が減少していた (Fig. 2-2C)。一方で、Control shRNA を発現させた海馬ニューロンでは、EYFP 発現ベクターのみ遺伝子導入したニューロンと比較して、樹状突起スパインの数に大きな変化は見られなかった (Fig. 2-2D)。

以上の結果から、Rapostlin が海馬ニューロンの樹状突起スパインの形成に関わっていることが示唆された。

この Rapostlin ノックダウンによるスパイン形成の抑制が、細胞生存率の低下によるものであるかを検証するため TUNEL アッセイを行った。初代培養海馬ニューロンに、Rapostlin shRNA と EYFP 発現ベクターを培養 11 日目にトランスフェクションし、スパインが発達する時期である培養 15 日目に TUNEL 染色を行い細胞死の判定をした。その結果、EYFP 発現ベクターのみを発現させた海馬ニューロンにおいて TUNEL 陽性細胞の割合は低かった (Fig. 2-3A)。また、EYFP 発現ベクターと Rapostlin shRNA を共発現させた細胞においても、同程度の細胞死が認められた。以上の結果から、Rapostlin ノックダウンによるスパイン形成の抑制は細胞生存率の低下によるものではないことが認められた。

また、Rapostlin が軸索および樹状突起の形態に関与するかどうかを調べた。培養 1 日目の海馬ニューロンに遺伝子導入し、培養 3 日目に固定し、軸索の形態観察を行った。また、培養 5 日目の海馬ニューロンに遺伝子導入し、培養 7 日目に固定し、樹状突起の形態観察を行った。しかしながら、Rapostlin をノックダウンしても、軸索と樹状突起の全長 (Total length) と全分枝数 (TDBTN: Total dendritic branch tip number) に変化は無かった (Fig. 2-3B, C)。

Rapostlin-QQ の過剰発現は樹状突起スパイン形成を抑制する

次に、樹状突起スパイン形成への Rapostlin の関与をさらに詳しく調べるため、Rapostlin-WT およびその変異体 Rapostlin-QQ を過剰発現させ、樹状突起スパインの形態を解析した。培養 11 日目の海馬ニューロンに遺伝子導入し、培養 15 日目に固定し、形態観察を行ったところ、Rapostlin-WT と EYFP 発現ベクターを発現させた海馬ニューロンでは、EYFP 発現ベクターのみを発現させた海馬ニューロンと比較して、樹状突起スパインの形成に大きな変化は見られなかった。

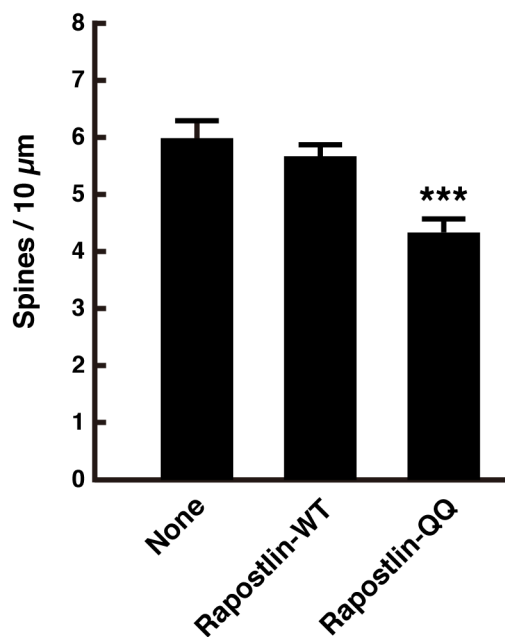
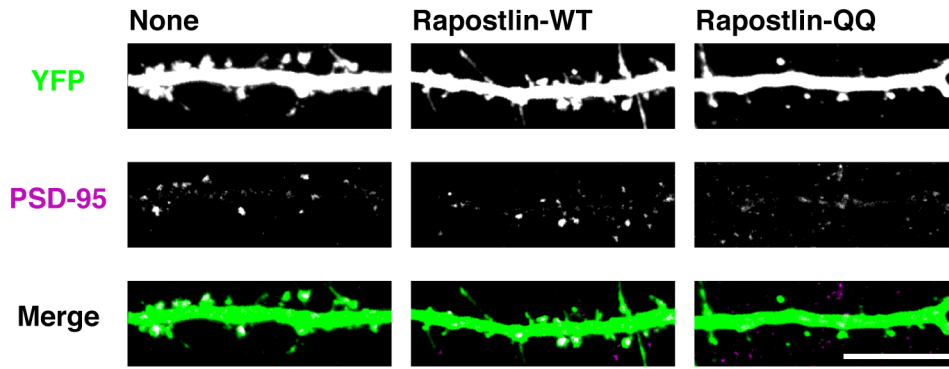


Fig. 2-4 Rapostlin-QQの過剰発現は樹状突起スパイン形成を阻害する

培養11日目の海馬ニューロンにEYFPおよびRapostlin-WTまたはRapostlin-QQの発現ベクターを導入し、培養15日目に固定した。遺伝子導入された細胞は、ポストシナプスマーカーであるPSD-95で染色 (magenta) し、EYFPの蛍光 (green) で形態を観察し、樹状突起スパインの密度を定量した。ニューロンあたり100-200 μm の樹状突起上に存在するスパインの数を定量した。それぞれの処理群に対して、3回の独立した実験から合計45個の細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。*** $P < 0.01$ (vs. none)。スケールバー: 10 μm 。

一方で、Rapostlin-QQ を発現させるとスパインの数は減少した (Fig. 2-4)。Rapostlin-QQ 変異体は、F-BAR ドメインの保存された lysine 残基を glutamine に変異させたもので、*in vitro* での膜結合活性と膜変形活性が阻害され、細胞での細胞膜陥入作用が阻害される (Tsujita et al., 2006; Shimada et al., 2007)。以上の結果から、Rapostlin は細胞膜陥入作用を介して海馬ニューロンの樹状突起スパイン形成に重要な役割を果たしており、Rapostlin-QQ はドミナントネガティブ体として作用していると考えられる。

Rapostlin ノックダウンおよび Rapostlin-QQ の過剰発現はトランスフェリン取り込みを阻害する

これまでの研究で、Rapostlin の F-BAR ドメインは clathrin 依存性エンドサイトーシスに重要な役割を果たすことが知られている (Takei et al., 1999; Farsad et al., 2001; Kamioka et al., 2004; Habermann, 2004; Peter et al., 2004; Itoh et al., 2005; Tsujita et al., 2006; Dawson et al., 2006; Itoh and De Camilli, 2006; Shimada et al., 2007; Wu et al., 2010)。また、海馬ニューロンの細胞体および樹状突起では、clathrin 依存性エンドサイトーシスによりトランスフェリンの取り込みが起こっていることが知られている (Thomas et al., 2009; Mundigl et al., 1993)。そのため、次に Rapostlin のノックダウンおよび Rapostlin-QQ の過剰発現が clathrin 依存性エンドサイトーシスに影響するかどうかを調べた。海馬ニューロンに Control shRNA と EYFP 発現ベクターをトランスフェクションし、YFP を発現していない神経ニューロンとトランスフェリン取り込み量を比較したところ、大きな差は認められなかった。しかし、Rapostlin をノックダウンした細胞ではトランスフェリン取り込み量が大きく減少した (Fig. 2-5A)。さらに、Rapostlin を過剰発現させてもトランスフェリン取り込み量に変化はなかったが、Rapostlin-QQ を発現させた細胞ではトランスフェリン取り込み量が減少した (Fig. 2-5B)。以上の結果から、海馬ニューロンにおいて Rapostlin は clathrin 依存性エンドサイトーシスに関わっていることが示唆された。

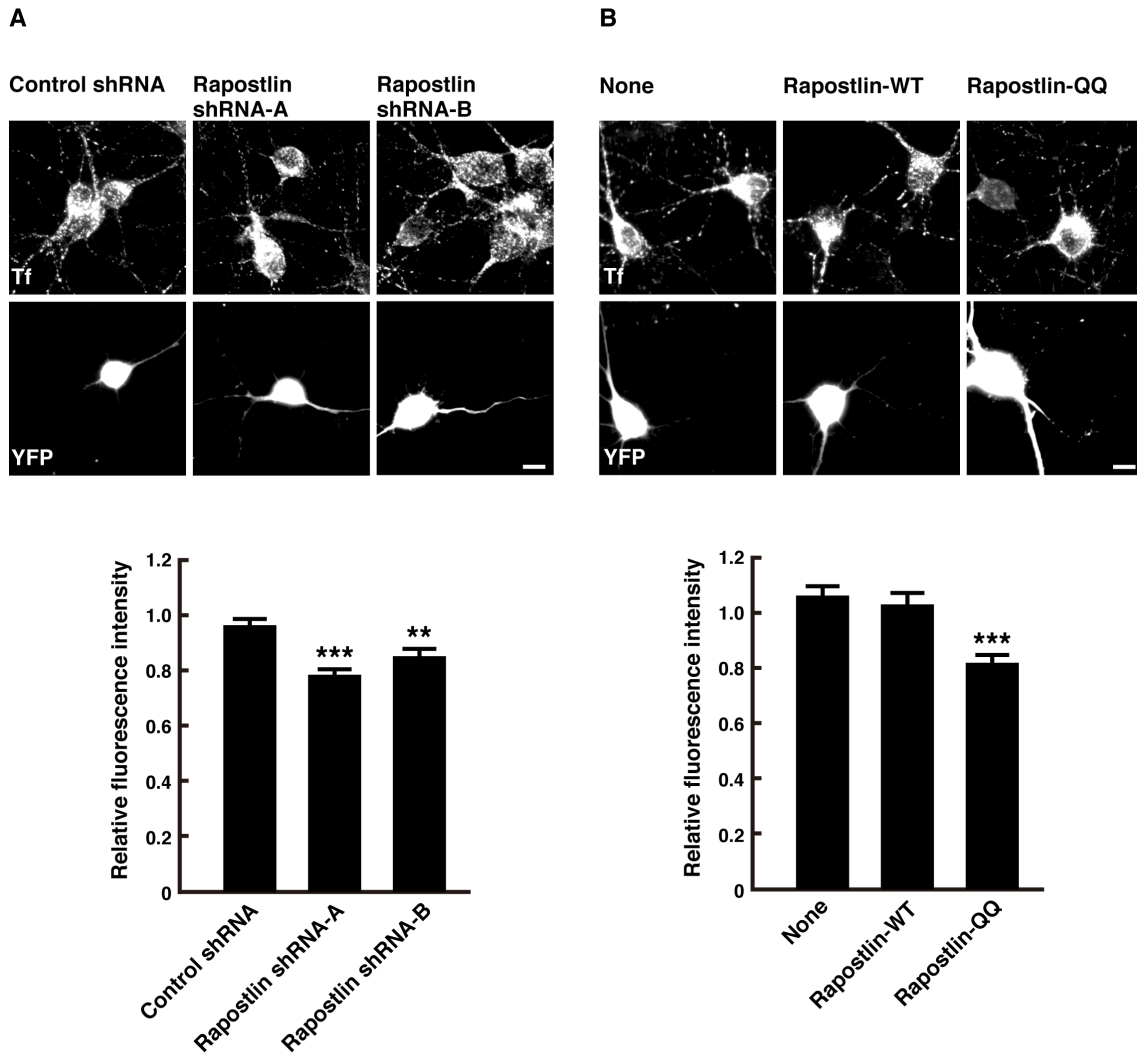


Fig. 2-5 Rapostlin ノックダウンおよび Rapostlin-QQ の過剰発現はトランスフェリン取り込みを阻害する。

A) 培養7日目の海馬ニューロンにEYFPおよびshRNAの発現ベクターを導入した。培養10日目にAlexa 594 でラベルされたトランスフェリンを培養液に混合し、10分間37°C、5% CO₂のインキュベーター内で培養した後、固定した。遺伝子導入された細胞は、ポストシナプスマーカーであるPSD-95で染色 (magenta) し、EYFPの蛍光 (green) で形態を観察した。YFP陽性ニューロンの細胞体および樹状突起に取り込まれたAlexa594-トランスフェリンの蛍光強度を測定し、同じフィールド内のYFP陰性細胞の蛍光強度で割り、正規化した。それぞれの処理群に対して、3回の独立した実験から合計60個以上の細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (vs. control shRNA; $n=60$; t test)。スケールバー: 10 μm 。(B) 同様の条件で、EYFPおよびRapostlin-WTまたはRapostlin-QQ発現ベクターを導入した海馬ニューロンに取り込まれたトランスフェリンの蛍光強度を定量した。***, $p < 0.001$ (vs. None; $n=45$; t test)。スケールバー: 10 μm 。

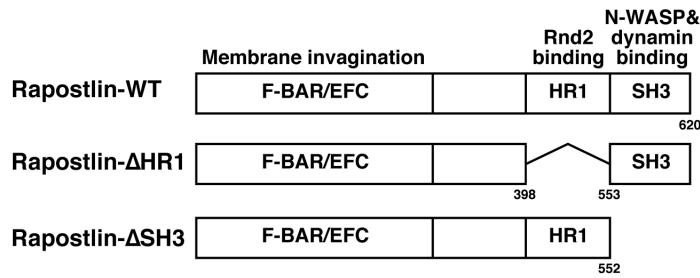
HR1 ドメインおよび SH3 ドメインは Rapostlin による樹状突起スパイン形成に関わっている

次に、Rapostlin の他のドメインが樹状突起スパイン形成に関わっているかを調べた。Rapostlin は、N 末端の F-BAR ドメインに加え、真ん中の領域に HR1 ドメインを持っており、HR1 ドメインを介して Rnd2 と作用することが分かっている (Fujita et al., 2002)。さらに、Rapostlin は C 末端に SH3 ドメインを持っており、N-WASP や dynamin (Kamioka et al., 2004; Itoh et al., 2005; Tsujita et al., 2006; Takano et al., 2008) と作用することが知られている (Fig. 2-6A)。HR1 ドメインおよび SH3 ドメインが樹状突起スパイン形成に関わっているか調べるために、それぞれのドメインを欠損させた Rapostlin shRNA 耐性変異体 (Rapostlin- Δ HR1、Rapostlin- Δ SH3) を作製し、レスキュー実験を行い、形態を観察した。Rapostlin shRNA と Rapostlin-WT を共発現させたところ、Rapostlin ノックダウンによるスパインの減少は回復した。一方で、Rapostlin- Δ HR1 および Rapostlin- Δ SH3 を共発現しても、Rapostlin ノックダウンによるスパインの減少は抑制されなかった (Fig. 2-6B)。以上の結果から、Rapostlin によるスパイン形成には、HR1 および SH3 ドメインが必要であることが示唆された。

Rnd2 のノックダウンは樹状突起スパイン形成およびトランスフェリン取り込みを阻害する

以前の研究で、Rapostlin は HR1 ドメインを介して Rnd2 と結合することが明らかにされている (Fujita et al., 2002)。そのため、海馬ニューロンにおいて Rnd2 がスパイン形成およびトランスフェリン取り込みに関わっているか調べることにした。Rnd2 の生理的機能を調べるために、Rnd2 の発現を抑制するように、Rnd2 に対する shRNA ベクターを作製した。Rnd2 shRNA は内在性 Rnd2 の発現レベルを抑制した (Fig. 2-2A)。また、control shRNA 及び Rapostlin shRNA は Rnd2 の発現量に影響しなかった。培養 11 日目の海馬ニューロンに遺伝子導入し、培養 15 日目に固定し、形態観察を行ったところ、Rnd2 shRNA と EYFP 発現ベクターを発現させた海馬ニューロンでは、EYFP 発現ベクターのみを発現させた海馬ニューロンと比較して、スパインの数は減少し、また、トランスフェリン

A



B

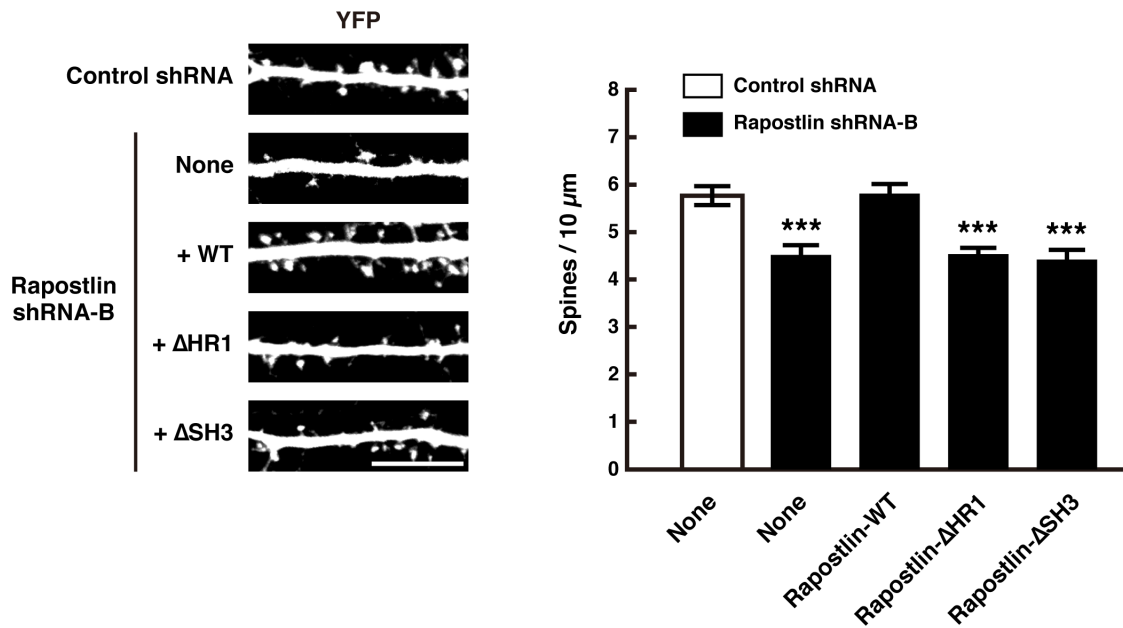


Fig. 2-6 Rapostlinによる樹状突起スパイン形成には、HR1ドメインおよびSH3ドメインが関係している

(A) Rapostlin のドメイン構造。F-BAR, Fer/CIP4 homology (FCH) domain and BAR domain / extended Fer/CIP4 homology domain; HR1, protein kinase C-related kinase homology region 1; SH3, Src homology 3 domain。 (B) 培養 11 日目の海馬ニューロンに EYFP および表記の発現ベクターを導入し、培養 15 日目に固定した。スケールバー: 10 μm。同様の条件で、EYFP および表記の発現ベクターを導入した海馬ニューロンの樹状突起スパインの密度を定量した。ニューロンあたり 100-200 μm の樹状突起上に存在するスパインの数を定量した。それぞれの処理群に対して、3 回の独立した実験から合計 45 個の細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。*** $P < 0.001$ (vs. Control shRNA; $n=45$; t test)。

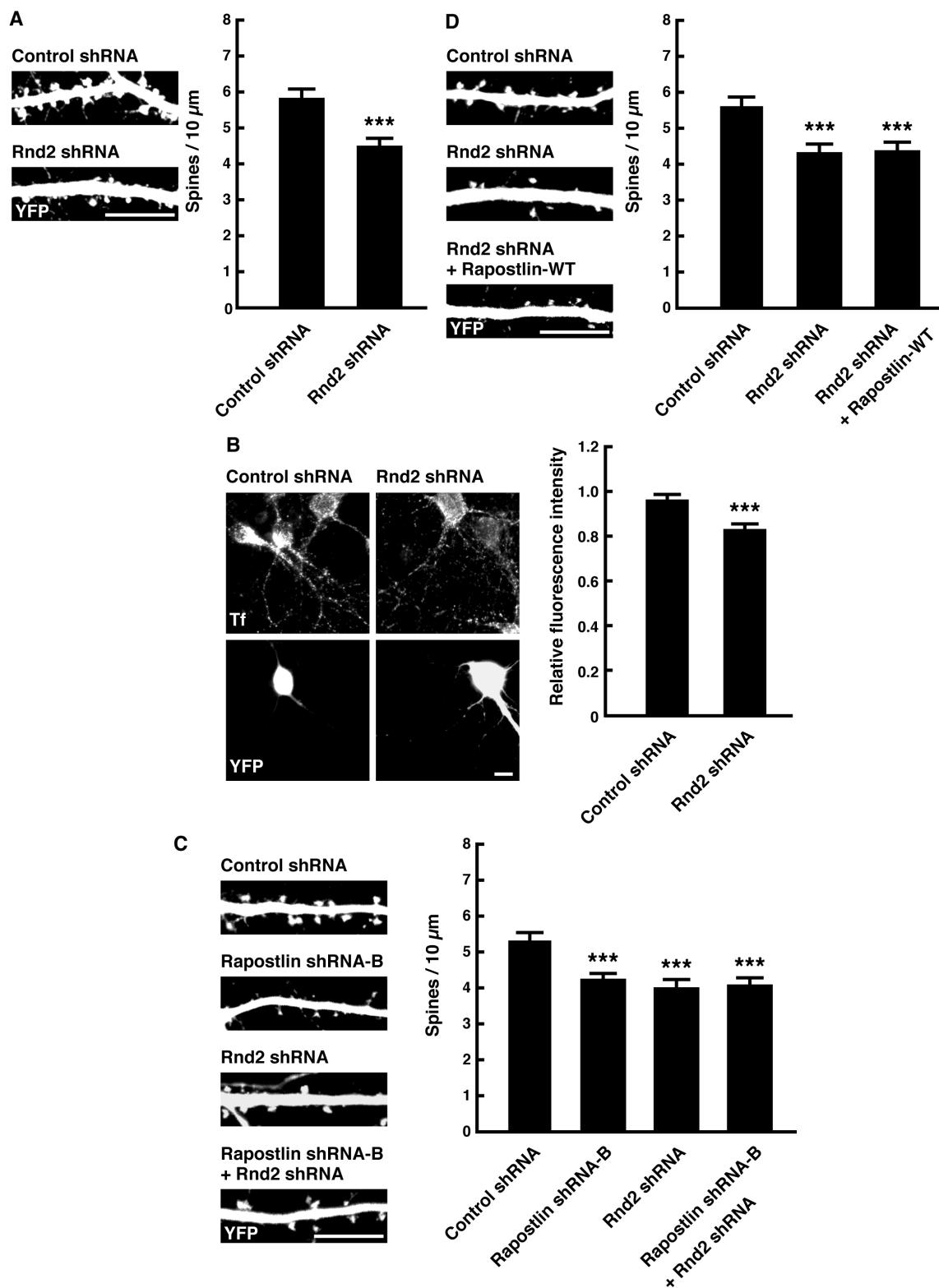


Fig. 2-7 Rnd2ノックダウンはスパイン形成およびトランスフェリン取り込みを阻害する

(A) 培養11日目の海馬ニューロンにEYFPおよびshRNAの発現ベクターを導入し、培養15日目に固定した。遺伝子導入された細胞は、ポストシナプスマーカーであるPSD-95で染色 (magenta) し、EYFPの蛍光 (green) で形態を観察し、

定量した。ニューロンあたり 100-200 μm の樹状突起上に存在するスパインの数を定量した。それぞれの処理群に対して、3回の独立した実験から合計 45 個の細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。*** $P < 0.001$ (vs. Control shRNA; $n=60$; t test)。スケールバー: 10 μm 。(B) 培養 7 日目の海馬ニューロンに EYFP および shRNA の発現ベクターを導入した。培養 10 日目に Alexa 594 でラベルされたトランスフェリンを培養液に混合し、10 分間 37°C、5% CO_2 のインキュベータ内で培養した後、固定した。遺伝子導入された細胞は、ポストシナプスマーカーである PSD-95 で染色 (magenta) し、EYFP の蛍光 (green) で形態を観察した。YFP 陽性ニューロンの細胞体および樹状突起に取り込まれた Alexa594-トランスフェリンの蛍光強度を測定し、同じフィールド内の YFP 陰性細胞の蛍光強度で割り、正規化した。それぞれの処理群に対して、3回の独立した実験から合計 60 個以上の細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (vs. control shRNA; $n=60$; t test)。スケールバー: 10 μm 。(C、D) 培養 11 日目の海馬ニューロンに EYFP および表記の発現ベクターを導入し、培養 15 日目に固定した。スケールバー: 10 μm 。同様の条件で、EYFP および表記の発現ベクターを導入した海馬ニューロンの樹状突起スパインの密度を定量した。ニューロンあたり 100-200 μm の樹状突起上に存在するスパインの数を定量した。それぞれの処理群に対して、3回の独立した実験から合計 45 個の細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。*** $P < 0.001$ (vs. Control shRNA; $n=45$; t test)。

取り込み量も減少した (Fig. 2-7A, B)。以上の結果から、海馬ニューロンにおいて Rnd2 はエンドサイトーシスおよびスパインの形成に関わっていることが示唆された。

これまでの結果から、Rapostlin と Rnd2 が同一のシグナル伝達経路で働き、スパイン形成を制御している可能性が示唆された。Rapostlin と Rnd2 の関係性を明らかにするため、次に Rapostlin と Rnd2 のダブルノックダウンを行った。培養 11 日目の海馬ニューロンに遺伝子導入し、培養 15 日目に固定し、形態観察を行ったところ、Rapostlin shRNA と Rnd2 shRNA の両方を発現させた海馬ニューロンでは、Control shRNA を発現させた海馬ニューロンと比較して、スパインの数は減少した。しかしながら、Rapostlin shRNA あるいは Rnd2 shRNA をそれぞれ単独で発現させた海馬ニューロンと比較して、スパイン数の減少度合いは変わらなかった (Fig. 2-7C)。一方で、Rnd2 ノックダウンした海馬ニューロンに

Rapostlin

を発現させても、スパイン数の減少は回復しなかった (Fig. 2-7D)。一つの可能性として、Rnd2 によるスパイン形成シグナルの下流では、Rapostlin の他に Rnd2 と相互作用する因子が必要だということが推察される。

Rnd2 は Rapostlin による細胞膜の管状陥入構造形成を促進する

私の所属する研究室では、Rapostlin が HR1 を介して Rnd2 と結合することを見出した (Fujita et al., 2002)。Rnd2 の海馬ニューロンでの発現は、Rapostlin と同様に生後に増加した (Fig. 2-1)。さらに、Rnd2 のノックダウンは、Rapostlin のノックダウンと同様にスパイン形成を抑制した (Fig. 2-7)。これらの結果から私は、Rnd2 が上流の調節因子として、Rapostlin の細胞膜変形作用を制御しているのではないかと推測した。この仮説を立証するために、Rnd2 が Rapostlin による細胞膜陥入作用に影響するかを調べる一連の実験をおこなった。

Rapostlin は、過剰発現すると、N 末の F-BAR/EFC ドメインの細胞膜陥入活性により、管状の細胞膜陥入を起こす (Kamioka et al., 2004; Itoh et al., 2005; Tsujita et al., 2006)。この特徴を用いて、Rapostlin による細胞膜陥入活性への Rnd2 の影響を調べた。HeLa 細胞に GFP タグのついた Rapostlin を過剰発現させた (Fig. 2-8)。以前報告された通り (Itoh et al., 2005; Tsujita et al., 2006)、Rapostlin を過剰発現させると、細胞膜の管状陥入を起こした。一方、HeLa 細胞に GFP タグのついた Rapostlin-QQ を過剰発現させたところ、細胞膜の陥入を起こさず、Rapostlin-QQ は細胞内に分散していた。興味深いことに、GFP-Rapostlin 単独発現に比べ、Myc-Rnd2 を共発現させると GFP-Rapostlin による細胞膜の管状陥入が促進された (Fig. 2-8B, C)。また、Myc-Rnd2 は GFP-Rapostlin により生じた管状陥入構造に共局在した (Fig. 2-8B)。

以上の結果から、Rnd2 は Rapostlin の F-BAR ドメインによる細胞膜陥入活性をシグナルの上流で制御していることが示唆された。

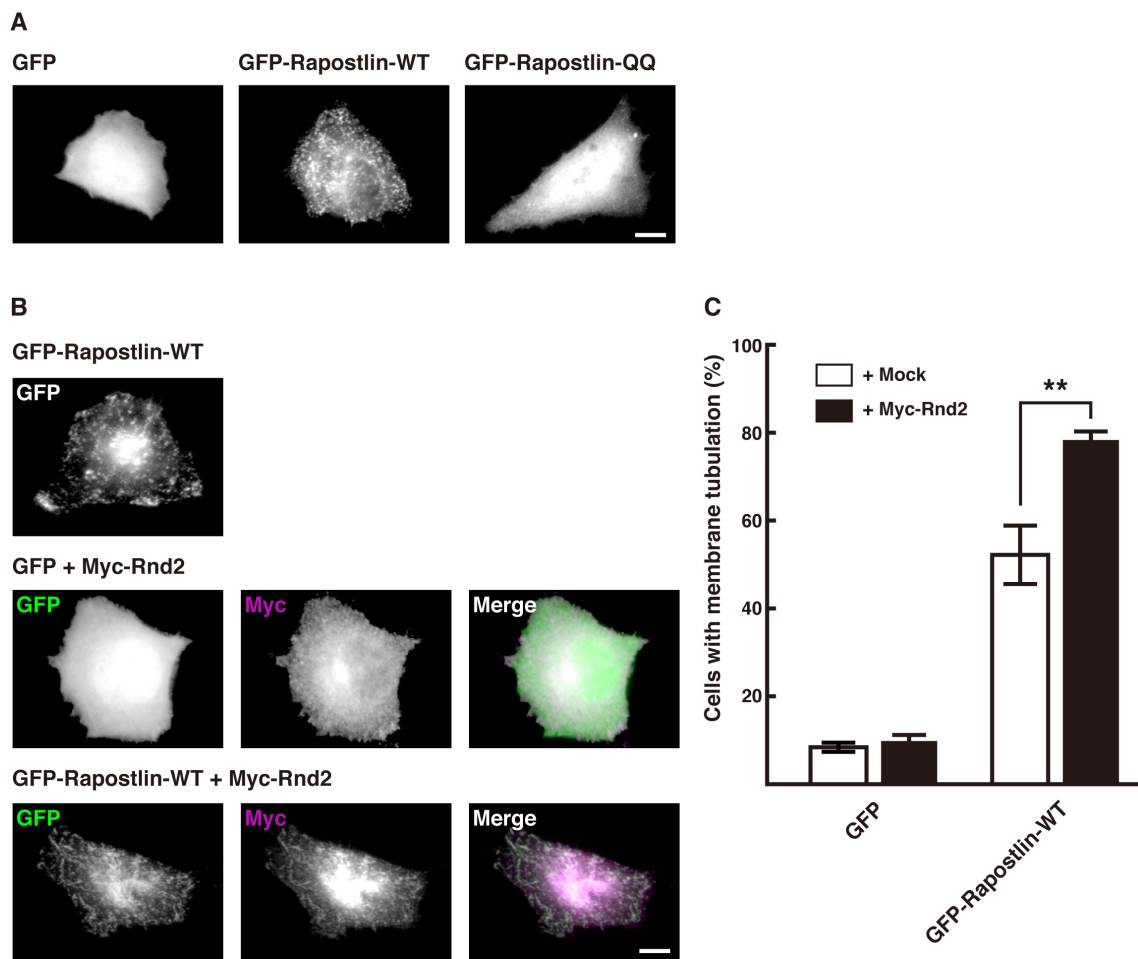


Fig. 2-8 Rnd2はHeLa細胞においてRapostlinにより細胞膜の管状陥入構造形成を促進する。

(A) GFPおよびGFP-Rapostlin、GFP-Rapostlin-QQ発現ベクターをHeLa細胞に遺伝子導入し、GFPの蛍光を観察した。(B) GFPもしくはGFP-RapostlinとMyc-Rnd2発現ベクターをHeLa細胞に遺伝子導入し、共発現させ、観察した。一番右のパネルはGFP (green)とMyc (magenta) の画像を重ね合わせたものである。スケールバー: 20 μm 。(C) 同様の条件で、表記の発現ベクターをHeLa細胞に遺伝子導入し、細胞膜管状陥入を起こしている細胞の数を定量した。それぞれの処理群に対して、3回の独立した実験から合計150個の以上の細胞の画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準偏差をエラーバーで表した。**, $p < 0.01$ (vs. + mock; t test)。

第3章

考察

F-BAR ドメイン蛋白質 Rapostlin は細胞膜の変形により clathrin 依存性エンドサイトーシスに重要な役割を果たすが (Itoh et al., 2005; Tsujita et al., 2006; Shimada et al., 2007; Wu et al., 2010)、その生理的役割はほとんどわかっていない。本研究では、Rapostlin がスパイン形成の盛んな脳の発達段階後期に海馬を含む脳に強く発現していることを見出したので、Rapostlin のスパイン形成における機能を調べた。ラット海馬ニューロンにおいて、Rapostlin は F-BAR ドメインを介してスパインの形成及びエンドサイトーシスの制御に関わっていることが明らかになった。また、HR1 ドメインおよび SH3 ドメインも Rapostlin によるスパイン形成に重要な役割を果たしていることが示された。また、Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 Rnd2 は Rapostlin に HR1 を介して直接結合するが (Fujita et al., 2002)、この Rnd2 もスパイン形成およびエンドサイトーシスに重要な役割を果たしていた。さらに、Rnd2 が Rapostlin の細胞膜陥入作用を促進することを明らかにし、Rapostlin の細胞膜陥入作用を上流で制御する因子をはじめて同定した。以上から、Rapostlin は Rnd2 によって厳密に制御を受けながら、膜輸送機構を介してスパイン形成を制御するというスパイン形成の新たなメカニズムが強く示唆された。

Rapostlin は Rapostlin、CIP4 そして Toca-1 からなるサブファミリーを構成している。最近の研究から、これらの分子は細胞運動性および細胞接着に関係していることが明らかになってきた。CIP4 は肺がん細胞の運動および侵襲を促進し (Pichot et al., 2010)、CIP4 のノックアウトマウスは、T 細胞の運搬に欠陥があることが明らかにされた (Koduru et al., 2010)。また、Toca-1 は EGF 誘導性細胞運動および表皮がん細胞の侵襲を促進する (Hu et al., 2011)。そして Rapostlin は貪食細胞のポドソーム形成を制御していることが分かっている (Tsuboi et al., 2009)。これからの結果は、F-BAR ドメイン蛋白質ファミリーが細胞形態制御に働いていることを強く支持するものである。

F-BAR/EFC ドメイン蛋白質の Rapostlin サブファミリーのうち、Rapostlin と Toca-1 は脳に強く発現しているが (Fujita et al., 2002)、CIP4 は幅広い組織に発現している (Aspenström, 1997; Wang et al., 2002)。以前の研究で、Toca-1 は発現が脳の発達段階初期に強くみられ、海馬ニューロンにおいて軸索の分枝に関わっ

ていることが報告されている (Kakimoto et al., 2006)。

本研究で私は、Toca-1 の発現が発達段階初期に強くみられたのとは対照的に、Rapostlin が脳の発達段階後期に強く発現がみられ、樹状突起スパインの形成を制御していることを明らかにした。このことは、Toca-1 と Rapostlin は、非常に相同性が高いにも関わらず、神経発達において異なる機能を担っていることを示している。

樹状突起スパインは中枢神経系の興奮性ニューロン樹状突起のシナプス後部に見られるアクチンリッチな構造体であり、アクチン骨格の制御は樹状突起スパインの形成や可塑性に非常に重要であることが知られている (Harris and Kater, 1994; Fischer et al., 1998)。Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 Rac は、アクチン骨格の制御を主とした細胞内シグナル伝達における分子スイッチとして働くことが知られており (Hall, 1998)、樹状突起スパインの形態形成においても重要な役割を担っている (Nakayama et al., 2000; Tashiro et al., 2000)。

最近の研究から、リサイクリングエンドソームから細胞膜の供給が、スパイン形成に重要な役割を果たすことが報告され (Cooney et al., 2002; Park et al., 2006; Thomas et al., 2009; Saneyoshi et al., 2010)、エンドサイトーシスからの細胞膜のリサイクリングが、スパインの形成に重要であることが示唆された。リサイクリングエンドソームを含むリサイクル経路が AMPA 受容体をスパインに輸送することが明らかになっており、また同時にスパイン形成に必要な表面積の拡大を担う膜脂質をスパインの成長および再構築のために供給することが分かっている。リサイクリングエンドソームの輸送を止めると、活動依存的なスパインの形成および既存のスパインの維持がされなくなり、またエンドソームの輸送がスパインの拡大と同時に起こることから (Park et al., 2006)、細胞膜輸送はスパインの形態制御に重大な役割を果たしている可能性が考えられる。しかしながら、スパイン形成における細胞膜輸送機構の詳細な分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。

本実験の結果より、Rapostlin はスパイン形成を制御するためのエンドサイトーシスを促進するために、樹状突起内のリサイクリングエンドソームの維持に必要であることが示唆された (Fig. 3)。これらの結果から、本研究はスパイン形成における膜輸送の制御機構の一端について新たな知見をもたらした。

Rapostlin は SH3 ドメインを介して、N-WASP および dynamin と結合し、エンドサイトーシス部位に移行させる (Kamioka et al., 2004; Itoh et al., 2005; Tsujita et

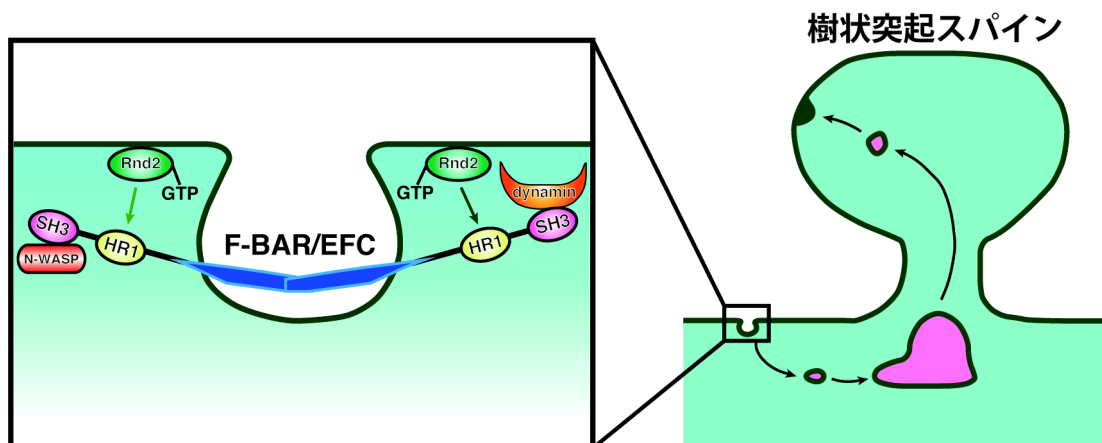


Fig. 3 RapostlinおよびRnd2による樹状突起スパイン形成制御のモデル図

al., 2006; Takano et al., 2008)。N-WASP は Arp2/3 複合体の活性化を通じてアクチン重合を促進し (Miki and Takenawa, 2003; Takenawa and Suetsugu, 2007)、この N-WASP によるアクチン重合はエンドサイトーシスの際に小胞を切断する力を生み出すための重要な役割を担っている (Merrifield et al., 2004; Benesch et al., 2005; Kaksonen et al., 2006)。Dynamin もまたエンドサイトーシス性の小胞を切断するのに重要な役割を担っている (Hinshaw, 2000)。そのため、Rapostlin はエンドサイトーシスにおいて細胞膜陥入とアクチン骨格の再構築を調整する重要な役割を果たしている。今回行ったノックダウンおよびレスキュー実験により、Rapostlin の SH3 ドメインが Rapostlin によるスパイン形成に必要不可欠であることが示された。興味深いことに、N-WASP と dynamin も海馬ニューロンのジュ樹状突起スパイン形成に関与している (Irie and Yamaguchi, 2002; Gray et al., 2005; Wegner et al., 2008; Jaskolski et al., 2009)。そのため、Rapostlin は N-WASP および dynamin と協調して海馬ニューロンの樹状突起スパイン形成に関与している可能性が考えられる。

さらに、今回の結果は HR1 ドメインも Rapostlin によるスパイン形成に重要であることを指し示している。まず、Rapostlin は HR1 ドメインを介して低分子量 G 蛋白質の中でも Rnd2 と直接結合する (Fujita et al., 2002)。次に、今回の実験結果により、Rnd2 が海馬ニューロンにおけるエンドサイトーシスの制御およびスパインの形成に関わっていることが示された。また、Rnd2 と Rapostlin は共に海馬を含む脳に生後期に強い発現を示す。最後に、Rnd2 は Rapostlin の細胞膜陥入

活性を促進する。以上の結果から、Rnd2はRapostlinの上流因子として働き、海馬ニューロンのエンドサイトーシスおよびスパイン形成を制御していると仮定した。しかしながら、RapostlinとN-WASPによるアクチン重合はHR1ドメインを介しているという報告があるため、Rapostlinによるスパイン形成においてHR1ドメインがさらなる役割を果たしている可能性が考えられる。一方で、未だにRnd2がどのようにRapostlinの細胞膜陥入を促進しているのかは不明である。Rapostlinによる膜の管状陥入に、F-BARドメインの二量体の端同士が結合して多量体化することが重要であると報告されている(Shimada et al., 2007)。Rnd2はRapostlinの多量体化を促進するのかもしれない。あるいは、他のRhoファミリー蛋白質にみられるように(Katoh et al., 2003, 2006; Hiramoto et al., 2006; Takenawa and Suetsugu, 2007)、Rnd2はRapostlinを細胞膜の特定の領域に移行させるのかもしれない。実際に、RhoファミリーG蛋白質TC10は、インスリン刺激によってRapostlinサブファミリーのCIP4を細胞内領域から細胞膜に移行させる(Chang et al., 2002, 2007)。ただし、F-BARドメインは単独で直接細胞膜と結合出来る(Itoh et al., 2005; Tsujita et al., 2006; Shimada et al., 2007)。いずれにしても、Rnd2がRapostlinの細胞膜陥入作用を促進することを示し、Rapostlinによる細胞膜陥入作用の上流の制御メカニズムの一端が初めて明らかになった。

本研究は、F-BARドメイン蛋白質Rapostlinの神経発達における新規生理的機能を明らかにした。また、Rapostlinによる細胞膜陥入作用を制御する新しい調節分子として、Rnd2を同定した。しかしながら、樹状突起発達段階におけるRnd2の活性制御機構は不明である。胎児期の脳皮質ニューロンでは、Rnd2は転写因子neurogenin2により発現が制御され、放射状移動を促進していることが明らかにされている(Heng et al., 2008)。また、転写因子もしくは薬物治療によりRnd2の発現量が制御されることが報告されている(Armentano et al., 2006; Marie-Claire et al., 2007; et al., 2007; Shimomura et al., 2009)。海馬ニューロンのシナプス活性により、樹状突起におけるRnd2の発現量が変わるかどうかにも興味深く、今後検討していく必要がある。

第 4 章

結論

本研究により得られた知見をまとめると、以下の通りである

- ・ Rnd2 は Rapostlin による細胞膜管状陥入作用を促進する。
- ・ Rapostlin および Rnd2 は発達段階後期のラット海馬ニューロンに発現している。
- ・ Rapostlin と Rnd2 は協調して海馬ニューロンにおけるエンドサイトーシスの制御および樹状突起スパインの形成に関わっている。

本研究により、F-BAR ドメイン蛋白質 Rapostlin による樹状突起スパイン形成制御に関わる新たな経路の一端が明らかになった。

実験手法

プラスミドの構築

Rapostlin-WT (amino acids 2-620) の cDNA は、Myc epitope タグまたは EGFP 配列を N 末に持つように、発現ベクター-pCMV (Clontech, Mountain View, CA) および pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) に組み込んだ。F-BAR ドメイン変異体 Rapostlin-QQ は PCR を用いて変異を導入し、pCMV-Myc に組み込んだ。CAG プロモーターにより EYFP を発現する pCAG-EYFP は大阪大学の宮崎純一博士並びに千葉大学の斎藤哲一郎 博士から頂いた (Niwa et al., 1991)。Toca-1 は以前の報告の通り構築された (Kakimoto et al., 2006)。Rnd2 の cDNA は、HeLa 細胞に発現させる際には、Myc epitope タグを N 末に持つように pEF-BOS に組み込んだ。本研究で shRNA に用いた標的配列は以下の通りである。Rapostlin shRNA-A, nucleotide 132-150, 5'- ACAGCTCAGGAA TCTTTCA-3' (Tanaka et al., 2006); Rapostlin shRNA-B, nucleotide 419-437, 5'- GGTTTGAGCGGGACTGTAA-3'; Rapostlin shRNA-C, nucleotide 945-963, 5'- GTCCAGAGGCAAGCTCTGG-3'。これらの標的配列は、shRNA 発現ベクター-pSilencer (Ambion, Austin, TX) を用いて細胞に発現させた。また、以前の報告 (Fujito et al., 2005; Yamaki et al., 2007) の通りに、ホタル luciferase に対する shRNA 配列、5'- CGTACGCGGAATACTTCGA-3'、および Rapostlin の発現に影響を及ぼさなかった Rapostlin shRNA-C を Control shRNA として用いた。Rnd2 shRNA は以前の報告のとおり構築された (Uesugi et al., 2009)。Rapostlin-WT の shRNA 耐性変異体、Rapostlin- Δ HR1 (amino acids 2-398, 553-620) および Rapostlin- Δ SH3 (amino acids 2-552) を PCR 法により作製し、Myc epitope タグを N 末に持つように pEF-BOS に組み込んだ。

抗体と試薬

Rapostlin-WT に対する抗体を作製するために、大腸菌に発現させて精製した glutathione S-transferase を融合させた Rapostlin-WT のアミノ酸残基 339-369 に相当するペプチド (PPPPPPASASPSAVPNGPQSPKQQKEPLSHR) を抗原として、

Rapostlin-WT に対するウサギ抗血清を得た。この抗 Rapostlin-WT 抗血清を、Rapostlin-WT のアミノ酸残基 354-369 に相当するペプチド (CNGPQSPKQQKEPLSHR) 、または、Rapostlin-WT のアミノ酸残基 339-353 に相当するペプチド (CPPPPPPASASPSAVP) を用いて精製し、ウサギ抗 Rapostlin-WT ポリクローナル抗体を得た。Rnd2 に対する抗体を作製するために、大腸菌に発現させて精製した glutathione S-transferase を融合させた Rnd2 のアミノ酸残基 185-216 に相当するペプチド (GHRQLRRRTDSRRGMQRSALSGRPDRGNEGEI) を抗原として、Rnd2 に対するウサギ抗血清を得た。この抗 Rnd2 抗血清を、Rnd2 のアミノ酸残基 206-216 に相当するペプチド (CGRPDRGNEGEI) を用いて精製し、ウサギ抗 Rnd2 ポリクローナル抗体を得た (Fujita et al., 2002; Nakamura et al., 2006; Tanaka et al., 2006; Uesugi et al., 2009)。

その他本研究で使用した抗体は以下の通りである。を Millipore より購入した。マウスモノクローナル抗 MAP2 抗体、抗 α -tubulin 抗体、抗 β -actin 抗体を Sigma-Aldrich より購入した。マウスモノクローナル抗 PSD-95 抗体を Abcam より購入した。マウスモノクローナル抗 Tau-1 抗体を Chemicon より購入した。マウスモノクローナル抗 Myc 抗体を Santa Cruz Biotechnology より購入した。セイヨウワサビ・ペルオキシダーゼ (HRP)標識 2 次抗体を DAKO より、ウサギポリクローナル抗 GFP 抗体および Alexa 488、Alexa 594 標識 2 次抗体を Molecular Probes より、biotin 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体を Chemicon より購入した。Poly-L-Lysine (PLL) は Sigma Aldrich より購入した。

イムノブロット法

蛋白質を SDS-PAGE によって分離した後、polyvinylidene difluoride 膜 (Millipore)に転写した。この膜を 3% skim milk を含むトリス緩衝液でブロッキングし、1 次抗体反応を行った。1 次抗体の認識には HRP 標識 2 次抗体 (DAKO) を用い、ECL 検出キットを用いて (Chemi-lumi One; Nacalai Tesque もしくは ECL Plus Western Blotting Detection System; GE Healthcare) 、chemiluminescence によって検出した。

ラット脳のホモジナイズ

Wistar ラットの脳を摘出後、homogenizing buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.32 M Sucrose、10 mM MgCl₂、1 mM EDTA、1 μg/ml aprotinin、1 μg/ml leupeptin、0.1 mM benzamidine、0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] 中に入れ、テフロンホモジナイザーでホモジナイズした (Ishikawa et al., 2003; Kakimoto et al., 2006)。

免疫細胞染色

カバーガラス上の培養海馬ニューロンは、4% paraformaldehyde を含む PBS で 15 分間固定した。50 mM NH₄Cl を含む PBS で残存した paraformaldehyde を除去した後、細胞を 0.2% Triton X-100 を含む PBS で 10 分間透過処理を行い、10% fetal bovine serum を含む PBS で 30 分間インキュベートしてブロッキングした。続いて、1 次抗体を希釈した 10% fetal bovine serum を含む PBS、または Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO) で室温 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、さらに 2 次抗体を希釈した 10% fetal bovine serum を含む PBS、または Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO) で室温 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、0.1% *p*-phenylenediamine dihydrochloride を含む 90% グリセロール溶液、または ProLong Golg Antifade Reagents (Molecular Probes) で封入した。

免疫組織染色

凍結させたラットの脳をクリオスタットで 40 μm の厚さに切り、その切片を 0.3% Triton X-100 を含む PBS で室温 15 分間透過処理し、2% goat serum および 0.15% Triton X-100 を含む PBS で室温 1 時間ブロッキングした。1 次抗体を希釈した溶液に切片を浸し、4°C で 24 時間インキュベートした後、0.1% Tween 20 を含む PBS で洗浄し、さらに 2 次抗体を希釈した溶液に切片を浸し、4°C で 24 時間インキュベートした。再び 0.1% Tween 20 を含む PBS で洗浄し、ProLong Golg Antifade Reagents で封入した。

HEK293T 細胞の培養と遺伝子導入

HEK293T 細胞は、4 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 0.2 mg/ml streptomycin および、10 % FBS を添加した DMEM を用いて、インキュベータ内 (95 % air, 5 % CO₂, 37 °C, 加湿) で培養した。遺伝子導入は Lipofectamine Plus (Invitrogen) を用いて、その添付文書に従って行った。

海馬ニューロンの初代培養と遺伝子導入

動物の取り扱いは、京都大学における動物実験の実施に関する規定に従った。本研究で用いた Wistar ラットはすべて Japan SLC より購入し、海馬ニューロン初代培養には胎生 19 日齢のラットの海馬を用いた。まず、母ラットを麻酔下断頭し、胎児を摘出し、氷冷 HBSS (Hanks' balanced salt solution; Ca²⁺、Mg²⁺無添加) 中に回収した。その胎児の脳から海馬を摘出し、HBSS で洗浄した後、0.25% trypsin と 0.1% DNase を含む HBSS で 10 分間、37°C でインキュベートした。その海馬を HBSS で洗浄した後、パスツールピペットでピペッティングすることにより海馬を分散し細胞懸濁液を得た (Ishikawa et al., 2003; Kakimoto et al., 2006)。分散した細胞を、24-well プレートに 1 ウェルあたり 3×10^4 個の濃度で、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; 10% fetal bovine serum, 4 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 及び 0.1 mg/ml streptomycin を含む) 中に据えた poly-L-lysine コートしたカバーガラス (直径 13 mm) 上にまき、37°C、5% CO₂ のインキュベータ内で培養した。5 時間後、Neurobasal medium (Invitrogen) [2% B-27 supplement (Invitrogen), 0.5 mM GlutaMAX (Invitrogen), 50 units/ml penicillin, 及び 0.05 mg/ml streptomycin を含む] に培養液を交換した。海馬ニューロンへの遺伝子導入は Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、その添付文書に従って行った。第 2 章の Rapostlin shRNA および Rnd2 shRNA の効果を評価した実験では、分散した海馬ニューロンに、Rat Neuron Nucleofector Kit (Amaxa Biosystems) を用いて添付文書に従って遺伝子導入した後、培養ディッシュにまき 24-well プレートと同様の条件で培養した。

トランスフェリン取り込みアッセイ

記述されたプラスミドを、培養7日目の海馬ニューロンに遺伝子導入し、37°C、5% CO₂のインキュベータ内で培養した。その後、培養10日目に B-27 supplement を含まない Neurobasal medium に培養液を交換し、6時間後に Alexa 594 でラベルされたトランスフェリン(Molecular Probes)を 10 µg/ml の濃度になるよう加え、10分間 37°C、5% CO₂のインキュベータ内で培養した。一度 PBS で溶液を洗い流した後、固定し観察した。

TUNEL アッセイ

記述されたプラスミドを、培養11日目の海馬ニューロンにし電子導入し、培養15日目に固定した。TUNEL (TdT-mediated dUTP- biotin nick end labeling) アッセイは、*in situ* 細胞死検出キット TMR Red (Roche) を用いて、その添付文書に従って行った。

データ解析

海馬ニューロンの形態は、遺伝子導入された細胞の EYFP の蛍光像を取得して、Image J software (National Institute of Health) を用いて測定した。軸索の定量は、全長 (total length) ならびに分枝数 (Branch number) を定量した。軸索は 5 µm 以上の突起を分枝として数えた。軸索は軸索マーカー Tau-1 で染色し、判別した (data not shown)。3回の独立した実験から各処理群につき 15個のニューロンの画像を取得して解析に用いた。統計的有意差の検定には Student's *t* 検定を行った。

樹状突起の定量は、細胞体から伸びる樹状突起の全分枝数 (TDBTN; total dendritic branch tip number)、樹状突起の長さ (total dendritic length) を測定した (Yu and Malenka, 2003; Rosso et al., 2005; Ishikawa et al., 2006)。また、branching index は分枝の頻度を現す指標であり、(TDBTN – number of primary dendrites) / total dendritic length を計算し、1 µm あたりの分枝数を求めた (Redmond et al.,

2000)。樹状突起に存在する $5\ \mu\text{m}$ 以上の突起を分枝と定義した (Yu and Malenka, 2003)。樹状突起は樹状突起マーカーMAP2で染色し、判別した (data not shown)。3回の独立した実験から各処理群につき15個のニューロンの画像を取得して解析に用いた。統計的有意差の検定には Student's t 検定を行った。

樹状突起スパインの定量は、1細胞あたり合計 $250\ \mu\text{m}$ 以上の樹状突起を計測し、その樹状突起上のスパインの数を数えた。本研究では、マッシュルーム型の頭部および細い首部を持つもの、もしくは首部を持たない樽型のものをスパインとし、頭部を持たない細長い突起は除外した。3回の独立した実験から各処理群につき15個のニューロンの画像を取得して解析に用いた。統計的有意差の検定には Student's t 検定を行った。

参考文献

- Armentano, M., Filosa, A., Andolfi, G., and Studer, M. (2006) COUP-TFI is required for the formation of commissural projections in the forebrain by regulating axonal growth. *Development* 133, 4151-4162
- Aspenström, P. (1997) A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton. *Curr. Biol.* 7, 479-487
- Aspenström, P., Fransson, A., Richnau, N. (2006) Pombe Cdc15 homology proteins: regulators of membrane dynamics and the actin cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci.* 31, 670-679
- Benesch, S., Polo, S., Lai, F. P. L., Anderson, K. I., Stradal, T. E. B., Wehland, J., and Rottner, K. (2005) N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *J. Cell Sci.* 118, 3103-3115
- BurrIDGE, K., and Wennerberg, K. (2004) Rho and Rac Take Center Stage. *Cell* 116, 167-179
- Chang, L., Adams, R. D., and Saltiel, A. R. (2002) The TC10-interacting protein CIP4/2 is required for insulin-stimulated Glut4 translocation in 3T3L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12835-12840
- Chang, L., Chiang, S. H., and Saltiel, A. R. (2007) TC10a Is Required for Insulin-Stimulated Glucose Uptake in Adipocytes. *Endocrinology* 148, 27-33
- Chardin, P. (2006) Function and regulation of Rnd proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 54-62

- Chitu, V., and Stanley, E. R. (2007) Pombe Cdc15 homology (PCH) proteins: coordinators of membrane-cytoskeletal interactions. *Trends Cell Biol.* 17, 145-156
- Cooney, J. R., Hurlburt, J. L., Selig, D. K., Harris, K. M., and Fiala, J. C. (2002) Endosomal Compartments Serve Multiple Hippocampal Dendritic Spines from a Widespread Rather Than a Local Store of Recycling Membrane. *J. Neurosci.* 22, 2215-2224
- Dawson, J. C., Legg, J. A., and Machesky, L. M. (2006) Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis. *Trends Cell Biol.* 16, 493-498
- Etienne-Manneville, S., Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635
- Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S. R., Rose, K., De Camilli, P. (2001) Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J. Cell Biol.* 155, 193-200
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20, 847-854
- Foster, R., Hu, K. Q., Lu, Y., Nolan, K. M., Thissen, J., Settleman, J. (1996) Identification of a Novel Human Rho Protein with Unusual Properties: GTPase Deficiency and In Vivo Farnesylation. *Mol. Cell Biol.* 16, 2689-2699
- Fujimoto, S., Negishi, M., and Katoh, H. (2009) RhoG Promotes Neural Progenitor Cell Proliferation in Mouse Cerebral Cortex *Mol. Biol. Cell.* 20, 4941-50
- Fujita, H., Katoh, H., Ishikawa, Y., Mori, K., and Negishi, M. (2002) Rapostlin Is a Novel Effector of Rnd2 GTPase Inducing Neurite Branching. *J. Biol. Chem.* 277, 45428- 45434

- Fujito, T., Ikeda, W., Kakunaga, S., Minami, Y., Kajita, M., Sakamoto, Y., Monden, M., and Takai, Y. (2005) Inhibition of cell movement and proliferation by cell-cell contact-induced interaction of Necl-5 with nectin-3. *J. Cell Biol.* 171, 165-173
- Goslin, K., Asmussen, H., Banker, G. (1998) Rat hippocampal neurons in low-density culture. *Culturing Nerve Cells*, 2nd edition (ed. Banker, G., and Goslin, K.), pp. 339-370. The MIT Press, Cambridge, MA.
- Govek EE, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 19, 1-49
- Gray, N. W., Kruchten, A. E., Chen, J., and McNiven, M. A. (2005) A dynamin-3 spliced variant modulates the actin/cortactin-dependent morphogenesis of dendritic spines. *J. Cell Sci.* 118, 1279-1290
- Habermann, B. (2004) The BAR-domain family of proteins: a case of bending and binding? *EMBO Rep.* 5, 250-255
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514
- Harris KM, Kater SB (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 341-371
- Heng, J. I., Nguyen, L., Castro, D. S., Zimmer, C., Wildner, H., Armant, O., Skowronska-Krawczyk, D., Bedogni, F., Matter, J. M., Hevner, R., and Guillemot, F. (2008) Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. *Nature* 455, 114-118
- Hering, H., and Sheng, M. (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 880-888.
- Hinshaw, J. E. (2000) Dynain and Its Role in Membrane Fission. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 483-519

- Hiramoto K, Negishi M, Katoh H (2006) Dock4 is regulated by RhoG and promotes Rac-dependent cell migration. *Exp. Cell Res.* 312, 4205-4216
- Hu, J., Mukhopadhyay, A., and Craig, A. W. B. (2011) Transducer of Cdc42-dependent actin assembly promotes epidermal growth factor-induced cell motility and invasiveness. *J. Biol. Chem.* 286, 2261-2272
- Innocenti, M., Gerboth, S., Rottner, K., Lai, F. P. L., Hertzog, M., Stradal, T. E. B., Frittoli, E., Didry, D., Polo, S., Disanza, A., Benesch, S., Di Fiore, P. P., Carrier, M. F., Scita, G. (2005) Abi1 regulates the activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes. *Nat. Cell Biol.* 7, 969-976
- Irie, F., Yamaguchi, Y. (2002) EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nat. Neurosci.* 5, 1117-1118
- Ishikawa Y, Katoh H, Negishi M (2003) A Role of Rnd1 GTPase in Dendritic Spine Formation in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 23, 11065-11072
- Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2006) Small GTPase Rnd1 is involved in neuronal activity-dependent dendritic development in hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 400, 218-223
- Ito, Y., Oinuma, I., Katoh, H., Kaibuchi, K., and Negishi, M. (2006) Sema4D/plexin-B1 activates GSK-3b through R-Ras GAP activity, inducing growth cone collapse. *EMBO Rep.* 7, 704-709
- Itoh, T., and De Camilli, P. (2006) BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 897-912
- Itoh, T., Erdmann, K. S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., and De Camilli, P. (2005) Dynamin and the Actin Cytoskeleton Cooperatively Regulate Plasma Membrane Invagination by BAR and F-BAR Proteins. *Dev. Cell* 9, 791-804

- Jaskolski, F., Mayo-Martin, B., Jane, D., and Henley, J. M. (2009) Dynamin-dependent membrane drift recruits AMPA receptors to dendritic spines. *J. Biol. Chem.* 284, 12491-12503
- Kakimoto T, Katoh H, and Negishi M (2004) Identification of splicing variants of Rapostlin, a novel RND2 effector that interacts with neural Wiskott-Aldrich syndrome protein and induces neurite branching. *J. Biol. Chem.* 279, 14104-14110
- Kakimoto, T., Katoh, H., and Negishi, M. (2006) Regulation of Neuronal Morphology by Toca-1, an F-BAR/EFC Protein That Induces Plasma Membrane Invagination. *J. Biol. Chem.* 281, 29042-29053
- Kaksonen, M., Toret, C. P., and Drubin, D. G. (2006) Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 404-414
- Kamioka, Y., Fukuhara, S., Sawa, H., Nagashima, K., Masuda, M., Matsuda, M., and Mochizuki, N. (2004) A Novel Dynamin-associating Molecule, Formin-binding Protein 17, Induces Tubular Membrane Invaginations and Participates in Endocytosis. *J. Biol. Chem.* 279, 40091-40099
- Katoh, H., and Negishi, M. (2003) RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature* 424, 461-464
- Katoh, H., Fujimoto, S., Ishida, C., Ishikawa, Y., and Negishi, M. (2006) Differential distribution of ELMO1 and ELMO2 mRNAs in the developing mouse brain. *Brain Res.* 1073, 103-108
- Katoh, H., Harada, A., Mori, K., and Negishi, M. (2002) Socius Is a Novel Rnd GTPase-Interacting Protein Involved in Disassembly of Actin Stress Fibers. *Mol. Cell Biol.* 22, 2952-2964

- Kawauchi T, Chihama K, Nabeshima Y, Hoshino M (2003) The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. *EMBO J.* 22, 4190-4201
- Kim SH, Choi HJ, Lee KW, Hong NH, Sung BH, Choi KY, Kim SM, Chang S, Eom SH, and Song WK. (2006) Interaction of SPIN90 with syndapin is implicated in clathrin-mediated endocytic pathway in fibroblasts. *Genes Cells.* 11, 1197-1211
- Koduru, S., Kumar, L., Massaad, M. J., Ramesh, N., Bras, S. L., Ozcan, E., Oyoshi, M. K., Kaku, M., Fujiwara, Y., Kremer, L., King, S., Fuhlbrigge, R., Rodig, S., Sage, P., Carman, C., Alcaide, P., Luscinskas, F. W., and Geha, R. S. (2010) Cdc42 interacting protein 4 (CIP4) is essential for integrin-dependent T-cell trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16252-16256
- Konno D, Yoshimura S, Hori K, Maruoka H, Sobue K (2005) Involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/rac1 and cdc42 pathways in radial migration of cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 280, 5082-5088
- Luo, L. (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 173-180
- Merrifield, C. J. (2004) Seeing is believing: imaging actin dynamics at single sites of endocytosis. *Trends Cell Biol.* 14, 352-358
- Merrifield, C. J., Qualmann, B., Kessels, M. M., and Almers, W. (2004) Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 83, 13-18
- Miki, H., and Takenawa, T. (2003) Regulation of Actin Dynamics by WASP Family Proteins. *J. Biochem.* 134, 309-313

- Mundigl, O., Matteoli, M., Daniell, L., Thomas-Reetz, A., Metcalf, A., Jahn, R., and Camilli, P. D. (1993) Synaptic vesicle proteins and early endosomes in cultured hippocampal neurons: differential effects of Brefeldin A in axon and dendrites. *J. Cell Biol.* 122, 1207-1221
- Nakamura, K., Yamashita, Y., Tamamaki, N., Katoh, H., Kaneko, T., and Negishi, M. (2006) In vivo function of Rnd2 in the development of neocortical pyramidal neurons. *Neurosci. Res.* 54, 149-153
- Nakayama AY, Harms MB, Luo L (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 20, 5329-5338
- Negishi, M., and Katoh, H. (2002) Rho Family GTPases as Key Regulators for Neuronal Network Formation. *J. Biochem.* 132, 157-166
- Newey, S. E., Velamoor, V., Govek, E. E., Van Aelst, L. (2005) Rho GTPases, Dendritic Structure, and Mental Retardation. *J. Neurobiol.* 64, 58-74
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., and Svoboda, K. (2002) Structure and Function of Dendritic Spines. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 313-53
- Nishi, M., Takeshima, H., Houtani, T., Nakagawa, K., Noda, T., and Sugimoto, T. (1999) RhoN, a novel small GTP-binding protein expressed predominantly in neurons and hepatic stellate cells. *Mol. Brain Res.* 67, 74-81
- Nobes, C. D., Lauritzen, I., Mattei, M. G., Paris, S., Hall, A., and Chardin, P. (1998) A New Member of the Rho family, Rnd1, Promotes Disassembly of Actin Filament Structures and Loss of Cell Adhesion. *J. Cell Biol.* 141, 187-197

- Oinuma, I., Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2004) The Semaphorin 4D Receptor Plexin-B1 Is a GTPase Activating Protein for R-Ras. *Science* 305, 862-865
- Oinuma, I., Katoh, H., and Negishi, M. (2004) Molecular Dissection of the Semaphorin 4D Receptor Plexin-B1-Stimulated R-Ras GTPase-Activating Protein Activity and Neurite Remodeling in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 24, 11473-11480
- Oinuma, I., Katoh, H., and Negishi, M. (2006) Semaphorin 4D/Plexin-B1-mediated R-Ras GAP activity inhibits cell migration by regulating β 1 integrin activity. *J. Cell Biol.* 173, 601-613
- Oinuma, I., Katoh, H., Harada, A., and Negishi, M. (2003) Direct Interaction of Rnd1 with Plexin-B1 Regulates PDZ-RhoGEF-mediated Rho Activation by Plexin-B1 and Induces Cell Contraction in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* 278, 25671-25677
- Park, M., Salgado, J. M., Ostroff, L., Helton, T. D., Robinson, C. G., Harris, K. M., and Ehlers, M. D. (2006) Plasticity-Induced Growth of Dendritic Spines by Exocytic Trafficking from Recycling Endosomes. *Neuron* 52, 817-830
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J. G., Evans, P. R., McMahon, H. T. (2004) BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR structure. *Science* 303, 495-499
- Pichot, C. S., Arvanitis, C., Hartig, S. M., Jensen, S. A., Bechill, J., Marzouk, S., Yu, J., Frost, J. A., and Corey, S. J. (2010) Cdc42-interacting protein 4 promotes breast cancer cell invasion and formation of invadopodia through activation of N-WASp. *Cancer Res.* 70, 8347-8356
- Praefcke, G. J. K., McMahon, H. T. (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 133-147

- Qualmann, B., Kessels, M. M., Kelly, R. B. (2000) Molecular Links between Endocytosis and the Actin Cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 150, F111-F116
- Ramakers, G. J. A. (2002) Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci.* 25, 191-199
- Riento, K., Guasch, R. M., Garg, R., Jin, B., and Ridley A. J. (2003) RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol. Cell Biol.* 23, 4219-4229
- Saneyoshi, T., Fortin, D. A., and Soderling, T. R. (2010) Regulation of spine and synapse formation by activity-dependent intracellular signaling pathways. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 108-115
- Schafer, D. A. (2002) Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 76-81
- Shimada, A., Niwa, H., Tsujita, K., Suetsugu, S., Nitta, K., Hanawa-Suetsugu, K., Akasaka, R., Nishino, Y., Toyama, M., Chen, L., Liu, Z. J., Wang, B. C., Yamamoto, M., Terada, T., Miyazawa, A., Tanaka, A., Sugano, S., Sirouzu, M., Nagayama, K., Takenawa, T., and Yokoyama, S. (2007) Curved EFC/F-BAR-Domain Dimers Are Joined End to End into a Filament for Membrane Invagination in Endocytosis. *Cell* 129, 761-772
- Shimomura, A., Ohama, T., Hori, M., and Ozaki, H. (2009) 17Beta-estradiol induces gastrointestinal motility disorder by decreasing CPI-17 phosphorylation via changes in rho-family G-protein Rnd expression in small intestine. *J. Vet. Med. Sci.* 71, 1591-1597
- Suetsugu, S. (2010) The proposed functions of membrane curvatures mediated by the BAR domain superfamily proteins. *J. Biochem.* 148, 1-12

- Tada, T., and Sheng, M. (2006) Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 95-101
- Takano, K., Toyooka, K., and Suetsugu, S. (2008) EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *EMBO J.* 27, 2817-2828
- Takei, K., Slepnev, V. I., Haucke, V., De Camilli, P. (1999) Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 1, 33-39
- Takenawa, T., and Suetsugu, S. (2007) The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 37-48
- Tanabe K, Tachibana T, Yamashita T, Che YH, Yoneda Y, Ochi T, Tohyama M, Yoshikawa H, Kiyama H (2000) The small GTP-binding protein TC10 promotes nerve elongation in neuronal cells, and its expression is induced during nerve regeneration in rats. *J. Neurosci.* 20, 4138-4144
- Tanaka, H., Katoh, H., and Negishi, M. (2006) Pragmin, a novel effector of Rnd2 GTPase, stimulates RhoA activity. *J. Biol. Chem.* 281, 10355-10364
- Tashiro A, Minden A, Yuste R (2000) Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb. Cortex* 10, 927-938
- Thomas S, Ritter B, Verbich D, Sanson C, Bourbonnière L, McKinney RA, and McPherson PS. (2009) Intersectin regulates dendritic spine development and somatodendritic endocytosis but not synaptic vesicle recycling in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 284, 12410-12419
- Tsuboi, S., Takada, H., Hara, T., Mochizuki, N., Funyu, T., Saitoh, H., Terayama, Y., Yamaya, K., Ohyama, C., Nonoyama, S., and Ochs, H. D. (2009) FBP17 Mediates a Common Molecular Step in the Formation of Podosomes and Phagocytic Cups in Macrophages. *J. Biol. Chem.* 284, 8548-8556

- Tsujita, K., Suetsugu, S., Sasaki, N., Furutani, M., Oikawa, T., and Takenawa, T. (2006) Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J. Cell Biol.* 172, 269-279
- Ueda, S., Fujimoto, S., Hiramoto, K., Negishi, M., and Katoh, H. (2008) Dock4 regulates dendritic development in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* 86, 3052- 61
- Uesugi, K., Oinuma, I., Katoh, H., and Negishi, M. (2009) Different requirement for Rnd GTPases of R-Ras GAP activity of Plexin-C1 and Plexin-D1. *J. Biol. Chem.* 284, 6743-6751
- Wang, L., Rudert, W. A., Grishin, A., Dombrosky-Ferlan, P., Sullivan, K., Deng, X., Whitcomb, D., Corey, S. (2002) Identification and genetic analysis of human and mouse activated Cdc42 interacting protein-4 isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1426-1430
- Wegner, A. M., Nebhan, C. A., Hu, L., Majumdar, D., Meier, K. M., Weaver, A. M., and Webb, D. J. (2008) N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J. Biol. Chem.* 283, 15912-15920
- Wennerberg, K., Forget, M. A., Ellerbroek, S. M., Arthur, W. T., Burridge, K., Settleman, J., Der, C. J., and Hansen, S. H. (2003) Rnd Proteins Functions as RhoA Antagonists by Activating p190 RhoGAP. *Curr. Biol.* 13, 1106-1115
- Wu, M., Huang, B., Graham, M., Raimondi, A., Heuser, J. E., Zhuang, X., and Camilli, P. (2010) Coupling between clathrin-dependent endocytic budding and F-BAR-dependent tubulation in a cell-free system. *Nat. Cell Biol.* 12, 902-908

- Yamaki, N., Negishi, M., and Katoh, H. (2007) RhoG regulates anoikis through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Exp. Cell Res.* 313, 2821-2832
- Yuste, R., and Bonhoeffer, T. (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 24-34
- Zhang H, Webb DJ, Asmussen H, Niu S, and Horwitz AF. (2005) Synapse formation is regulated by the signaling adaptor GIT1. *J. Neurosci.* 25, 3379-3388

謝辞

本研究の終わりに臨み、本研究の機会を賜り、また終始有益な御助言ならびに御指導を賜りました、京都大学院 生命科学研究科 生体システム学分野 教授 根岸 学 先生に謹んで感謝の意を表します。

本研究に際し、直接の御指導を賜りました、京都大学院 生命科学研究科 生体システム学分野 准教授 加藤 裕教 先生に深く感謝いたします。

本研究の全般を通じ、懇切なる御指導と的確な御助言を賜りました、京都大学院 生命科学研究科 生体システム学分野 助教 生沼 泉 先生に深く感謝します。

研究に際し、有益な議論を頂いた京都大学院 生命科学研究科 生体システム学分野の皆様は深く感謝します。

最後に、常に研究に専念できる環境を整えてくれ、温かく見守り励ましてくれた父 隆字、母 弥生、妹 祐希、ならびに祖父母に心から感謝し、この学位論文を尊敬する亡き祖父に捧げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yohei Wakita, Tetsuhiro Kakimoto, Hironori Katoh and Manabu Negishi
The F-BAR Protein Rapostlin Regulates Dendritic Spine Formation in Hippocampal Neurons
The Journal of Biological Chemistry, 286 (37), 32672-32683, 2011