

Title	Role of Rab3 GDP/GTP Exchange Protein in Synaptic Vesicle Trafficking at the Mouse Neuromuscular Junction
Author(s)	岡本, 三紀
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48941
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	岡本(田中)三紀
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 21651 号
学位授与年月日	平成 20 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Role of Rab3 GDP/GTP Exchange Protein in Synaptic Vesicle Trafficking at the Mouse Neuromuscular Junction (マウス神経筋接合部のシナプス小胞輸送における Rab3 GDP/GTP 交換反応促進蛋白質の役割)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 内山 安男 教授 祖父江憲治

論文内容の要旨

[目 的]

低分子量 G 蛋白質 Rab ファミリーは細胞内小胞輸送に関与し、中でも Rab3A は神経細胞におけるシナプス小胞輸送を調節している。Rab3A は他の低分子量 G 蛋白質と同様に GDP 結合型から GTP 結合型に移行することで活性化され、その活性制御分子には GDP の解離を抑制する Rab GDI (GDP Dissociation Inhibitor)、GDP から GTP の交換反応を促進する Rab3 GEP (GDP/GTP Exchange Protein)、さらに GTPase 活性を促進する Rab3 GAP (GTPase Activating Protein) が同定されている。Rab3 GEP は Rab3A に対して GEP 活性を持つ蛋白質としてラットの脳より精製され、Rab3A、-3C、-3D に対して GEP 活性を示し、他の Rab ファミリーに対して作用しない。また培養神経細胞の前シナプス神経終末に局在し、神経伝達物質放出に関与していることが明らかとなっている。しかし生体内における Rab3 GEP の生理的役割は明らかではない。そこで、Rab3 GEP 欠損マウスを作製し、その表現型解析を行った。

[方法ならびに成績]

I. Rab3 GEP 欠損マウスの作製

マウス Rab3 GEP 遺伝子のエクソン 1-2 を含む領域を neo 耐性遺伝子で置き換えたターゲティングベクターを作成した。ES 細胞にエレクトロポレーション法を用いてベクターを導入し、サザンプロット解析により相同組み換えを起こした ES 細胞を 6 クローン分離した。さらにその ES 細胞をマウス受精卵の胚盤胞に注入してキメラマウスを作製し、キメラマウスと野生型マウスとの交配によりヘテロマウスを得た。マウスの遺伝子型を同定するため、尾部 DNA または卵黄嚢から抽出した DNA を用いて PCR を行った。

ヘテロマウス同士の交配より得られたホモマウスの Rab3 GEP 蛋白質の欠損を確認するために、胎生 E18.5 の胎児の脳から蛋白質を抽出し、ウェスタンプロット解析を行った。抗 Rab3 GEP 抗体は GST-Rab3 GEP 融合蛋白質を大腸菌内で産生させ、それを免疫原として得られたウサギポリクローナル抗体を用いた。ホモ接合マウスでは Rab3 GEP が完全に消失し、それに付随して Rab3A が 2.5 倍に増加、Rab3A に結合する蛋白質 Rabphilin-3 が約 25% にまで減少していた。Rabphilin-3 の減少は Rab3A 欠損マウスでも観察されており、これらの結果から Rabphilin-3 は

GTP 結合型 Rab3A の非存在下で不安定な蛋白質であることが考えられた。また Rab3A、Rabphilin-3 の発現量の変化が認められることより、Rab3 GEP は生体内でも Rab3A のリサイクリングに関与していることが明らかとなった。

II. Rab3 GEP 欠損マウスの神経能析

Rab3 GEP ヘテロマウス同士の交配により得られたマウスの遺伝子型解析から、胎生期には 25% の割合でホモマウスが存在するが、出生直後に自発呼吸ができず 30 分以内に全例が死亡することが明らかとなった。また、四肢の動きが鈍く、痛覚刺激に対する応答も認められないことより神経系の異常が示唆された。Rab3 GEP 欠損マウスの胎児を用いて、抗ニューロフィラメント抗体および蛍光標識した α ブングロトキシンを用いて免疫染色を行ったが、末梢神経やニコチン性アセチルコリン受容体の分布には異常が認められなかった。しかし、神経生理学的解析では顕著な差が認められた。頸髄を刺激し大腿筋で筋電図を記録すると、野生型マウスでは 30 ms 後に活動電位が検出されたのに対し、Rab3 GEP 欠損マウスでは同様の活動電位が検出されなかった。さらに坐骨神経刺激に対する腓腹筋応答、横隔神経刺激に対する横隔筋応答においても同様に活動電位が認められなかった。しかし、脊髄内神経路の興奮伝導速度は野生型マウスとの比較で有意差はなかった。形態学的解析では、電子顕微鏡により Rab3 GEP 欠損マウスの神経筋接合部において、前シナプス神経末端でのシナプス小胞の形態異常と小胞数の顕著な減少も観察された。以上の結果より Rab3 GEP 欠損マウスは神経筋接合部における興奮伝達の異常を示すことが明らかとなった。

[総括]

Rab3 GEP は胎生期における神経系の発生に必須ではないが、神経伝達物質の放出過程において重要な役割を担うことが明らかとなった。特に神経筋接合部位における神経細胞終末でのシナプス小胞数は劇的に減少していた。Rab3A および Rab GDI α 欠損マウスは生存可能であり、シナプス小胞数の減少は報告されていない。従って Rab3 GEP 欠損による GDP 結合型の不活性 Rab3A の蓄積によって、シナプス小胞の生合成が阻害されることが示唆される。また、Rab3A、Rab GDI α 欠損マウスと比較して Rab3 GEP 欠損マウスがより重篤な表現型を示す理由として、二つの可能性を想定している。一つは Rab3 GEP が Rab3A だけでなく、Rab3C および Rab3D にも作用するため Rab ファミリーの機能がより広範囲に阻害されることである、もう一つは Rab3 GEP が Rab3 サブファミリー以外のシグナル制御に関与する可能性である。Rab3 GEP は、ヒトの腫瘍細胞で高発現する DENN/MADD と同一であり、Death domain を有するマルチドメイン蛋白質である。また、アルツハイマー病患者で特異的な発現低下が報告されている。これらの可能性を検討するため現在 Rab3 GEP 条件的欠損マウスの作製に取り組んでいる。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、Rab3 GDP/GTP Exchange Protein (Rab3 GEP) の生体内における生理的機能を明らかにする目的で Rab3 GEP 欠損マウスを作製し、その表現型を解析した。

Rab3 GEP 欠損マウスは出生直後、呼吸不全により全て死亡した。筋電図による解析から、Rab3 GEP 欠損マウスの神経伝導は正常であるが、神経筋接合部を介した神経筋伝達が障害されていることが明らかとなった。またその神経終末では、シナプス小胞数の減少、未成熟な active zone およびミトコンドリアの変性が観察された。

本研究により Rab3 GEP は神経伝達に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、神経細胞におけるシナプス小胞のリサイクリングを調節する Rab3 システムの解明に加え、Rab3 GEP の新たな役割を期待できる結果が得られた。以上の結果より本研究は学位授与に値するものと認める。