

所属 (主指導教員)	神経形態形成学 (稲垣 直之 准教授)		
氏名	中澤 瞳	提出	平成 24 年 9 月 6 日
題目	神経細胞の軸索形成時期における Rab33a の機能解析		

<背景・目的>

神経細胞は神経突起を伸長し、他の神経細胞とシナプスを介して結合することにより神経回路を形成する。この神経回路網の形成に重要な神経突起は細胞体から形成され、極性形成に伴い伸長し、場合によっては細胞体の数万倍以上もの長さになる。神経細胞がこの長い神経突起を伸長するには、突起の先端において新たな細胞膜の付加が必要不可欠であり、この細胞膜の付加には、細胞内の膜輸送に関与する低分子量 G 蛋白質である Rab 蛋白質が重要な役割を担うと考えられている。

Rab 蛋白質は酵母から哺乳動物に至るまですべての真核生物に保存され、哺乳動物では 60 種類以上も存在する。それぞれの Rab 蛋白質は特定の膜に存在し、特異的なエフェクターとの相互作用により目的の標的膜への小胞輸送を制御すると考えられており、特に上皮細胞や神経細胞といった極性を有する細胞では、Rab 蛋白質による選択的な小胞輸送の制御が、形態形成や機能に重要であることがわかってきた。小胞輸送経路には、ER から Golgi 装置を介した細胞膜への輸送（エキソサイトーシス）と細胞膜が細胞内へ回収され、再び細胞膜に戻される輸送（エンドサイトーシス）がある。神経細胞ではこれまでに、エンドサイトーシス経路に関わる Rab 蛋白質が神経突起形や軸索や樹状突起への選択的な輸送に関わることが報告されている。例えば、Rab8 が神経極性形成初期の突起伸長およびその後の樹状突起の形成に関わること、また Rab10 が軸索内の輸送と伸長に関わることが報告されている。しかし、エキソサイトーシス経路に関わる Rab 蛋白質によって新たな細胞膜が付加され、突起伸長や軸索形成に関わる可能性は示唆されているものの、そういった Rab 蛋白質はよくわかっていない。

これまでに、Rab33a が脳やリンパ球、メラニン細胞で発現すること、PC12 細胞への NGF 刺激によって誘導された突起先端へ Rab33a が局在すること、またマウス幹細胞を用いた解析より、Rab33a が神経細胞の分化に関与する可能性のある遺伝子であると報告されていたが、その機能については全く分かっていない。本研究では、培養海馬神経細胞において Rab33a がこれまでよくわかっていなかったエキソサイトーシス経路に関与する Rab 蛋白質として、順行性輸送の制御と軸索形成に関わる可能性を見出した。

<結果・考察>

① **Rab33a は軸索形成に伴い発現が上昇し、軸索に多く存在する**：生体内において Rab33a の発現は脳に多かった。各発達段階における rat 脳と培養海馬神経細胞では Rab33a の発現は軸索形成時期に上昇し、その後減少することがわかった。また培養海馬神経細胞の免疫染色の結果、内在性の Rab33a が軸索形成後には軸索中に多く存在することがわかった。

② **Rab33a はエキソサイトーシス経路上の小胞に存在する**：神経細胞に EGFP-Rab33a を遺伝子導入しライブイメージングを行ったところ、内在性 Rab33a と同様にドット状に観察され、細胞内を順行性にも逆行性にも移動することがわかった。さらに Rab33a は synaptophysin と共局在し共に輸送されることがわかった。PC12 細胞において synaptophysin は細胞体で合成された後、エキソサイトーシスにより細胞膜へと輸送され、エンドサイトーシスを経てシナプス小胞に回収されると報告されている。二重免疫染色の結果、Rab33a とエンドサイトーシス経路上の Rab 蛋白質 (early endosome の Rab4 と Rab5、late endosome の Rab7 と Rab9、recycling endosome の Rab11) との共局在はみられなかったことから、Rab33a はエキソサイトーシス経路上の小胞上に存在する可能性が示唆された。

③ **Rab33a は順行性輸送に関与する**：神経細胞内で共局在が確認できた synaptophysin をマーカーに、Rab33a を発現抑制させた培養神経細胞において小胞輸送の挙動を解析した。その結果、順行性に輸送される RFP-synaptophysin の輸送頻度が有意に減少し、平均速度も順行性輸送のみが顕著に遅くなることがわかった。次に内在性の synaptophysin の局在を解析したところ、Rab33a を発現抑制させた神経細胞では、軸索に多く存在する内在性 synaptophysin の局在が有意に減少し、一方で Rab33a を過剰発現させた神経細胞では、本来ほとんど観察されない minor process への局在が増加した。これらの結果より、Rab33a が神経細胞内の順行性輸送を制御する可能性が示唆された。

④ **Rab33a は軸索形成に関与する**：Rab33a を発現抑制させた神経細胞の軸索形成直後の形態を観察した。その結果、Rab33a を発現抑制させた細胞では神経突起の長さが顕著に短くなっており、軸索形成した細胞 (stage3) の割合が有意に減少した。また、恒常活性変異体 Rab33a Q95L を神経細胞に過剰発現したところ、過剰な軸索形成が誘導された。一方で、恒常不活性型変異体 Rab33a T50R を過剰発現した細胞では、コントロール細胞と同程度しか過剰軸索形成はみられず、また Rab33a WT を過剰発現したところ、Rab33a Q95L と同程度の過剰な軸索形成の誘導がみられた。この結果から、Rab33a は軸索形成に関与し、その活性化が軸索形成に必要である可能性が示唆された。

以上の結果より、私は Rab33a がこれまでよくわかっていなかったエキソサイトーシス経路を介した順行輸送により、膜小胞を神経突起先端で供給し、軸索形成を促進している可能性を見出した。これまでの報告から、Rab 蛋白質は特異的な積荷の輸送や、特異的なエフェクターとの相互作用による選択的な輸送、また活性化した受容体を細胞体へ輸送することによって細胞内へのシグナル伝達に関与することがわかっている。今回の解析から、Rab33a が順行性輸送を制御している可能性、そして軸索形成に関与する可能性は示唆されたが、その分子メカニズムはまだ明らかにできていない。今後、Rab33 が輸送する小胞上の蛋白質や Rab33a と相互作用する分子を探索し機能を解析することにより、Rab33a の制御する小胞輸送の分子作用機構が明らかになることが期待される。

博士論文番号：0981016

神経細胞の軸索形成時期における Rab33a の機能解析

中澤 瞳

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 神経形態形成学
(稲垣 直之 准教授)

平成 24 年 9 月 6 日提出

目 次

	ページ番号
序論	・・・4
実験材料と実験方法	・・・7
1. 細胞培養	
2. プラスミド	
3. 抗体	
4. Rab33a の発現解析	
5. ウェスタンブロッティング	
6. 免疫細胞染色	
7. Rab33a の細胞内局在解析	
8. 細胞への遺伝子導入法	
9. 共焦点顕微鏡を使ったタイムラプス	
10. RNAi 法による Rab33a の発現抑制	
10-1. miRNA による Rab33a の発現抑制効果の確認	
10-2. Rab33a 発現抑制における小胞輸送の挙動解析	
10-3. Rab33a 発現抑制における膜融合頻度の解析	
10-4. Rab33a 発現抑制による神経細胞の表現型解析	
11. Rab33a の過剰発現による表現型解析	
12. Rab33a に結合している GTP および GDP の解析	
13. 神経細胞の形態の定量解析	
14. 有意差検定	
結果	・・・18
1. Rab33a は脳において高い発現が認められる	
2. Rab33a は軸索形成時期に発現が上昇する	
3. Rab33a は Minor process および軸索に存在するが、極性形成に伴い軸索に濃縮する	

4. Rab33a は synaptophysin 陽性の小胞と共局在する
5. Rab33a は順行性輸送に関与する
6. Rab33a の発現抑制によって軸索先端における内在性 synaptophysin の局在が減少する
7. Rab33a の発現抑制によって軸索先端における synaptophysin 陽性の小胞の膜融合頻度が減少する
8. Rab33a の発現抑制によって軸索形成と伸長が阻害される
9. Rab33a の過剰発現によって過剰な軸索形成が誘導される
10. Rab33a の過剰発現によって内在性 synaptophysin の異所的な局在が増加する

考察 ・ ・ ・ 26

神経細胞の極性形成時期における Rab33a の発現
 Rab33a は、ゴルジ装置から軸索への小胞輸送に関与する
 Rab33a は順行性輸送に関与する
 Rab33a は突起先端での膜供給に関与する
 Rab33a は軸索形成と伸長に関与する
 結論

謝辞 ・ ・ ・ 31

参考文献 ・ ・ ・ 32

図表 ・ ・ ・ 38

<序論>

ヒトなど高等動物の脳内では、高度に発達した神経回路が張り巡らされ、感覚、認知・判断、運動といった複雑な高次脳機能を可能にしている。神経回路を構成する神経細胞は、形態的にも機能的にも大きく異なった 2 種類の神経突起（軸索と樹状突起）を有している(1)。軸索は他の細胞から伝えられた電氣的興奮を神経伝達物質の放出に置き換えて、標的細胞にシグナルを伝達する役割を担っている。一方、樹状突起は軸索末端から放出される神経伝達物質を受け取ることで電氣的興奮へと変換する。高度な情報伝達制御を行うための神経回路網の形成には、神経細胞が標的細胞とシナプスを形成しなくてはならず、神経細胞が神経突起を伸長することは極めて重要であると考えられる。

神経細胞の形態形成過程は以下に示すように、大きく 5 つの段階に分類される(2-4) (図 1)。初めに、神経細胞は Lamellipodium を形成し (Stage 1)、その後細胞体から Minor process と呼ばれる 3~5 本の短い神経突起が形成される (Stage 2)。時間経過とともに Minor process のうち 1 本が軸索として急速に伸長し (Stage 3)、残りの Minor process は樹状突起へと分化する (Stage 4)。その後、他の神経細胞の軸索とシナプスを形成して神経細胞は成熟する (Stage 5)。

極性形成過程において神経細胞は、直径約 10 μm の細胞体 (表面積約 300 μm^2) から直径約 1 μm の軸索を 20~50 $\mu\text{m}/\text{h}$ の割合で伸長させる。つまり、神経細胞は、60~150 $\mu\text{m}^2/\text{h}$ の割合で軸索の表面積を増大しており、これは 1 時間当たり細胞体の表面積の 1/5~1/2 量もの膜成分が必要とされることを意味する。この膨大な量の表面積の拡大を補うためには、小胞体で合成された膜成分が、ゴルジ装置から恒常的に軸索へと輸送され、突起先端へと供給されると考えられている (5-8)。この軸索への膜輸送には、細胞内の小胞輸送の制御に関与する低分子量 G タンパク質 Rab が重要な役割を担うと考えられている(9)。しかし、新たに合成された膜成分がどの Rab によってゴルジ装置から軸索先端に輸送され、細胞膜へ供給されるのかその分子機構はよく解っていない。

Rab ファミリーと細胞内輸送

Rab は、酵母から哺乳動物に至るすべての真核生物に保存されており、細胞内の膜（小胞）輸送を制御すると考えられている(10)。Rab は他の低分子量 G タンパク質と同様に、GDP を結合した不活性化型と GTP を結合した活性化型の 2 つのフォームをとることでその生理機能を果たす。ヒトやマウスなどの哺乳動物において、60 種類以上もの Rab のアイソフォームが知られており、それぞれの Rab は特定の膜に存在し、特異的なエフェクターとの相互作用により、目的の標

的膜への小胞輸送や細胞膜へのドッキングを制御すると考えられている。特に、上皮細胞や神経細胞などの極性を有する細胞においては、Rab による選択的な小胞輸送の制御が、形態形成や機能に重要であることが解ってきた(10-12)。

神経細胞における Rab の働き

神経細胞が極性を形成し、その形態を維持するためには、特定のタンパク質が細胞内において特異的な分布をする必要がある。神経細胞においては、これまでに、軸索や樹状突起への選択的な輸送に Rab が関わる可能性が報告されている (図 2)。例えば、培養海馬神経細胞において、極性形成後の樹状突起に多く存在する Rab8 を発現抑制させると Semliki Forest Virus glycoprotein E₂ (SFV-E₂) の樹状突起への輸送が阻害されること(13)、また Rab8 の不活性化型変異体を発現させることにより、AMPA 受容体の樹状突起への局在が、減少することが報告されている (14)。他にも、Rab27 と Slp1 が CRMP-2 を介してモータータンパク質である Kinesin-1 と結合することで、Neurotrophin 受容体の 1 つである TrkB 受容体の軸索への順行性輸送に関わる可能性(15)や、endocytosis によって回収された Trk 受容体の軸索へのリサイクリングに Rab11 が関与すること(16)が報告されている。

この Trk 受容体は神経成長因子 (Nerve growth factor : NGF) の刺激を受け、神経細胞の生存や分化、神経突起伸長に関わることが報告されているが(17)、それだけではなく、PC12 細胞を用いた実験により、活性化した Trk 受容体が、endocytosis によって回収され、signaling endosome として細胞内でのシグナルを維持し、突起伸長に関わる可能性も示されている(18,19)。この signaling endosome の細胞内への逆行性の輸送には、Rab5 や Rab7 の関与が報告されている(17)。PC12 細胞において、Rab5 または Rab7 の恒常不活性化型変異体を発現させると、NGF 刺激により誘導される突起伸長が促進され、逆に恒常活性化型変異体では、突起伸長が阻害されることが報告されている。この時、恒常不活性化型変異体の Rab5 または Rab7 を発現させた PC12 細胞では、signaling endosome として働く細胞内の Trk 受容体の活性化が高く保持されることがわかっている(20,21)。

一方、Rab が神経突起の伸長に直接的に関わる可能性も報告されている (図 2)。培養海馬神経細胞において Rab8 を発現抑制させると、細胞体から順行性に輸送される小胞の数が大幅に減少し、神経突起伸長が阻害された(13)。また、培養神経細胞において Rab11 を発現抑制もしくは不活性化型変異体を発現させると突起の長さが短くなり、活性型変異体の発現によって軸索の長さが長くなった (16,22)。そして、Rab10 においても発現抑制もしくは不活性化型変異体を過剰発現させると神経突起の長さが短くなること、活性型変異体の過剰発現により軸索の長さが長くなり、過剰な軸索形成も誘導されること、さらに、Rab10 の発現

抑制により突起先端への輸送や、軸索先端での膜融合頻度が減少していることが報告されている(23)。これらのことは、Rab による小胞輸送の制御が神経細胞の突起形成に重要であることを示唆している。

これまで軸索の伸長に関わる Rab として、Rab11 と Rab10 が報告されているが、Rab11 と Rab10 は、新たに合成された膜小胞の輸送というよりも、endosome を介した膜成分のリサイクリングに関与することが解っている。突起伸長に必要な膜成分は、リサイクリングだけではなく、小胞体で新たに合成され、ゴルジ装置から突起先端に輸送される経路も存在すると考えられている。しかし、新たに合成された膜成分をゴルジ装置から突起先端に輸送し、軸索の伸長に関与する Rab については、いまだによく解っていない (図 2、黄色矢印)。

Rab33a について

これまでに Rab33a は、脳やリンパ球、メラニン細胞で発現すること(24)、組織の中では特に脳に多く発現していること(25)、マウス脳においては胎生 13 日目をピークに、生後から成体にかけて発現量の減少がみられ、マウス幹細胞を神経細胞へ分化誘導させた際に、発現量が上昇する遺伝子の 1 つであること (26) が報告されている。本研究室において、極性形成安定化分子 Singar1 と相互作用する分子として Rab33a を同定していたが (佐田修士論文(27))、その機能は不明であった。

本研究では、これまで機能未知であった Rab33a の神経細胞内における機能の解析を行った。その結果、Rab33a が神経細胞内において新たに合成された膜成分のゴルジ装置から軸索先端への順行性の小胞輸送に関わる可能性を見出した。さらに、その結果 Rab33a が軸索先端における膜小胞の融合と軸索の伸長に関与することも分かった。また神経細胞内における局在解析の結果、Rab33a が上記の Rab8 や Rab10、Rab11 との共局在は確認できなかったため、Rab33a は神経突起伸長を引き起こす新たな膜輸送経路の制御に関与することが示唆された。

<材料と方法>

実験材料

1. 細胞培養

1-1. HEK293T 細胞の培養

ヒト胎児腎細胞株 HEK293T 細胞は、10%ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum : FBS, ジャパン・バイオシーラム)を含む Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Sigma) 中、CO₂濃度 5 %、37 °C のインキュベータ内で培養した。

1-2. 海馬神経細胞の初代培養

胎生 18 日目の Wister 系ラット (日本 SLC、日本クレア)全脳を 0.4 %の Glucose を含む PBS (pH 7.4 : GIBCO Invitrogen) 中に回収した。速やかに海馬のみを摘出し、0.18 % Glucose, 0.1 % BSA (Sigma), 0.0012 % DNase (Sigma), 0.05 % Papain (ナカライ) を含む PBS (pH 7.4) 中で 4 回パスツールピペットによるピペッティングを行った。37 °C で 20 分インキュベートした後、上清を除いて 0.18 % Glucose、0.1 % BSA、0.0012 % DNase を含む PBS (pH 7.4) を 3 ml 新たに加えて、パスツールピペットによるピペッティングおよび 37 °C でのインキュベートを 10 分行った。海馬組織より Dissociate された細胞を含んだ上清は、氷上の別のチューブに回収し、沈殿している海馬組織には新たな 0.18 % Glucose、0.1 % BSA、0.0012 % DNase を含む PBS (pH 7.4) を加えて、パスツールピペットによるピペッティングおよび 37 °C でのインキュベートを、海馬組織の細胞が完全に Dissociate されるまで繰り返し行った。遠心分離 (4 °C、15 分、1,000 rpm) により回収した神経細胞を 10 % FBS を含む Neurobasal medium (GIBCO) 5 ml に再び懸濁し、細胞数をカウントした後、あらかじめ poly-D-Lysine(Sigma) と Laminin (旭テクノガラス) でコートしたプラスチックデッシュ (Greiner bio-one) もしくは 13 mm ガラスプレート (旭テクノガラス)に細胞を播種した。神経細胞は、培養用の培地として 2 % B-27 supplement (GIBCO)、1 mM Glutamine (Sigma) を含む Neurobasal medium を用いた(28)。また CO₂濃度 5 %、37 °C のインキュベータ内で培養し、培地は 3 日に 1 度、半分量を交換した。

2. プラスミド

2-1. 遺伝子発現ベクターの構築

ライブイメージングで使用した pCMV::SypHy 4A は Addgene より購入した。ラット Rab33a とラット synaptophysin の cDNA は、成体ラット脳 の cDNA ライブラリー (CLONTECH) を template として、プライマー (以下表参照)を用いて PCR 反応を行い、増幅された DNA を pBluescript II SK (+) (Stratagene) にサブクローニングした。シーケンスにより塩基配列に変異がないことを確認し、動物細胞への遺伝子導入のための発現ベクターに組み込んだ。この方法で作られたベクターには、C 末端に終止コドンが付加されている。恒常活性化型変異体であるマウス Rab33a Q95L と不活性化型変異体であるマウス Rab33a T50N は東北大学大学院生命科学研究科の福田光則教授の御厚意により頂いた。Rab33a 変異体は pEF-BOS ベクターにクローニングされていたため (29)、発現ベクターにサブクローニングした。しかし、不活性化型変異体である Rab33a T50N では安定した発現が得られなかった (図 15A)。このため、Stratagene 社の QuikChange II site-directed mutagenesis kit を用いて、(30) を参照に発現が安定した新たな不活性化型変異体ラット Rab33a T50R を作成した。使用した primer の配列と発現ベクター (表 1) を表にまとめた。Myc、EGFP や RFP 等のタグ配列は、いずれも蛋白質の N 末端に融合して発現する。得られたプラスミド DNA は、HEK293T 細胞を用いて哺乳動物細胞で発現していることを確認した。pCAGGS-myc ベクターは、培養海馬神経細胞でより強く過剰発現させるため使用した。

表 1 Primer 一覧

遺伝子名 (付加したサイト)	primer	発現ベクター
Rab33a wild-type (Sal I)	5'-GCATGTCGACATGGCGCAGCCCATCC	pCAGGS-Myc
	TGGGCCATGG-3'	pEGFP-C1
	5'-GCATGTCGACTCAACAAGGACAGGA	pCMV-Myc
	AGTTTTACTGTTAGC-3'	pCMV-FLAG
synaptophysin (BamH I)	5'-TAGGATCCATGGACGTGGTGAATCAG	pmRFP
	CTGG-3'	
	5'-GCGGATCCTTACATCTGATTGGAGAA	
Rab33a T50R	GGAG-3'	pCAGGS-Myc
	5'-TCCAACGTGGGCAAGCGCTGCCTG-3'	
	5'-CAGGCAGCGCTTGCCACGTTGG-3'	pCMV-FLAG

2-2. 発現抑制ベクターの構築

Rab33a の発現抑制を行う際に使用するベクターの構築には、Invitrogene 社の BLOCK-iT Pol 2 miRNAi expression vector kit を用いた。ラット Rab33a の 278 から 298 番目 (miRNA #1 : 5'-CAGGACAAGAACGCTTCCGTA-3') と、365 から 385 番目 (miRNA #2 : 5'-TGACCTCCTTCACCAACTTAA-3') を標的とする塩基配列を同キット内の pcDNA 6.2-GW/EmGFP-miRNA vector に ligation し、発現抑制ベクターを構築した。ネガティブコントロールとして、同 kit 内に添付していた pcDNA 6.2-GW/EmGFP-miRNA-neg vector を用いた。このベクターが遺伝子導入された細胞は GFP を発現するため、GFP 陽性の神経細胞において評価を行った。また、本ベクターの EmGFP を mRFP に入れ替え、GFP の代わりに RFP を発現するベクターも構築した。

3. 抗体

anti-Myc、Tau-1、anti-MAP-2、anti-synaptophysin、anti-GFP、Giantin、anti-Rab4、anti-Rab5、anti-Rab7、anti-Rab9、anti-Rab11、anti-Rab10、anti-Rab8、anti-L1、anti-Trk、anti-FLAG M2、anti-Actin、anti-GM130、anti-Adaptin γ 、anti-TGN38 の各抗体は商用抗体を使用した。anti-Rab33a (rabbit) 抗体は東北大学大学院生命科学研究科の福田光則教授の御厚意により頂いた (31)。使用した抗体を表 2 にまとめた。

表 2 抗体一覧

名前	免疫動物と種類	販売会社、供与元
anti-Rab33a	rabbit polyclonal	Mitsunori Fukuda
anti-Myc	rabbit polyclonal	MBL
Tau-1	mouse monoclonal (PC1C6)	Millipore
anti-MAP2	mouse monoclonal (HM-2)	Sigma
anti-Synaptophysin	mouse	Progen
anti-Synaptophysin	mouse (H-8)	Santa Cruz
normal mouse IgG	mouse	Millipore
anti-GFP	Chicken (GFP-1010)	aves
anti-Giantin	mouse monoclonal (9B6)	Abcam
anti-Rab10	mouse monoclonal (4E2)	Abcam
anti-Rab8	mouse monoclonal (4/Rab4)	BD
anti-Trk	mouse monoclonal (B-3)	Santa cruz
anti-Rab4	mouse monoclonal	BD

anti-Rab5	mouse monoclonal	BD
anti-Rab7	mouse monoclonal	Abcam
anti-Rab9	mouse monoclonal	Abcam
anti-Rab11	mouse monoclonal	BD
anti-FLAG M2	mouse monoclonal	Sigma
anti-Actin	mouse monoclonal	Millipore
anti-GM130	mouse monoclonal	BD
anti-Adaptin γ	mouse monoclonal	BD
anti-TGN38	mouse monoclonal	BD

実験方法

4. Rab33a の発現解析

4-1. 成体ラットにおける Rab33a の発現分布

Wister 系成体ラットより脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、肺、骨格筋、および胎盤を回収し、RIPA Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM DTT、1.0 % Triton X-100、0.1 % SDS、0.1 % Sodium deoxycholate、10 mM NaF、10 μ g/ml Leupeptin、25 μ M PMSF) を用いて蛋白質を抽出した。蛋白質抽出液をエッペンチューブに回収し、氷上で 30 分間静置した後、4 °C で 30 分、17400 g (TOMY MX-100) で遠心した。遠心後の上清を別のエッペンチューブに分取し、2 $\times$ SDS sample buffer と溶解した。その後、5 μ g の蛋白質を SDS-PAGE により分離し、抗 Rab33a 抗体 (rabbit) によるウェスタンブロットにより Rab33a のバンドを検出した。

4-2. ラット脳における発生に伴う Rab33a の発現解析

Wister 系ラットの E15、E18、P1、P7、P14、および成体ラットより摘出した全脳を RIPA Lysis buffer を用いて蛋白質を抽出した。蛋白質抽出液をエッペンチューブに回収し、氷上で 30 分間静置した後、4 °C で 30 分、17400 g (TOMY MX-100) で遠心した。遠心後の上清を別のエッペンチューブに分取し、2 $\times$ SDS sample buffer と溶解し、SDS-PAGE 用の sample とした。その後、10 μ g の蛋白質を SDS-PAGE により分離し、抗 Rab33a 抗体 (rabbit) によるウェスタンブロットにより Rab33a のバンドを検出した。ローディングコントロールとして Actin の検出も行った。

4-3. 培養海馬神経細胞における Rab33a の発現変動解析

実験材料 1-2 に示した方法に従って回収した 1.0×10^6 個の海馬神経細胞を、Poly-D-Lysine/Laminin でコートした 35 mm プラスチックデッシュに撒いた。培養開始 14 時間、62 時間、7 日、14 日の神経細胞から RIPA Lysis buffer を用いて蛋白質抽出を行い、15 μ g の蛋白質を SDS-PAGE により分離した。その後、抗 Rab33a 抗体 (rabbit) によるウェスタンブロットにより Rab33a のバンドを検出した。ローディングコントロールとして Actin の検出も行った。

5. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE 後のゲルから PVDF 膜 (Millipore) へのタンパク質の転写には、Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell (Bio-Rad) を用い、2 mA/cm² で室温、90 分を行った。転写後の PVDF 膜を 3 % Skim milk を含む TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl) 溶液に室温で 1 時間ブロッキングした後、3 % Skim milk を含む TBS で 1 晩 4 °C で、1 次抗体反応を行った。1 次抗体反応後、PVDF 膜を 0.05 % Tween 20 を含む TBS で 3 回洗浄し、0.05 % Tween 20 を含む TBS で室温 1 時間、2 次抗体反応を行った。その後、0.05 % Tween 20 を含む TBS で 3 回洗浄し、ECL 試薬 (Amersham biosciences) を用いて、タンパク質のシグナルを X 線フィルム (富士フィルム) に感光させて検出した。

6. 免疫細胞染色

免疫染色は(32) を参考にして行った。細胞を培養している Medium と等量の 7.4 % ホルムアルデヒドを含む PBS 加え (終濃度 3.7 %)、氷上で 15 分間静置し、固定処理を行った。2 ml の氷冷した PBS を加え、アスピレーターで吸出し、新たな PBS を 2 ml 加えた。この操作を 3 回繰り返し、氷上で 10 分間静置した。完全に PBS を吸い出し、速やかに 0.05 % Triton X-100 を含む PBS を 500 μ l 加え、氷上で 15 分間静置し、透過処理を行った。完全に 0.05 % Triton X-100/PBS を吸い取り、すばやく 10 % FBS を含む PBS を 500 μ l 加え、1 時間室温で静置し、ブロッキングを行った。カバースリップを 24 穴マイクロプレート (IWAKI) の上蓋に取り出し、10 % FBS を含む PBS で希釈した 1 次抗体を加え 1 晩、4 °C でインキュベートした。1 次抗体反応後、上蓋に静かに冷却した PBS を流し込み、カバースリップを 3 ml の PBS を入れた 24 穴マイクロプレートに戻し、氷上で 1 時間静置した。カバースリップを 24 穴マイクロプレートの上蓋に取り出し、PBS で希釈した 2 次抗体を加え、蛍光が退色しないように遮光して 1 時間、室温で静置した。2 次抗体反応後、上蓋に静かに PBS を流し込み、カバースリップを 3 ml の PBS を入れた 24 穴マイクロプレートに戻し、室温で 1 時間静置した。カバースリップをスライドガラス (マツナミ) にマウントし、50 % Glycerol を含む PBS で封入し、マニキュアで密閉した。

7. Rab33a の細胞内局在解析

7-1. CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate)および CellTracker™ Blue CMAC (7-amino-4-chloromethylcoumarin) 標識

神経細胞を固定処理する 2 時間前に、培養液中に CMFDA (Molecular probes, 終濃度 0.2 %) もしくは CMAC (Molecular probes, 終濃度 0.05 %) を加え、CO₂ 濃度 5 %、37 °C のインキュベータ内で静置した。その後、細胞を固定し、1 次抗体と 2 次抗体を用いて免疫染色を行った。

7-2. Nocodazole 処理

神経細胞を固定処理する 2 時間前に、培養液中に Nocodazole (Sigma-Aldrich, 終濃度 7 μ M) もしくは Control として DMSO を加え、CO₂ 濃度 5 %、37 °C のインキュベータ内で静置した。その後、細胞を固定し、1 次抗体と 2 次抗体を用いて免疫染色を行った。

7-3. 染色強度の定量

免疫染色強度は、Axioplan2 (Plan-Apochromat×63 oil、1.40 NA、Plan-NEOFLUAR×40 0.75 NA or ×20 0.50 NA、AxioCamMRm CCD camera、AXiovision3 imaging software、Carl Zeiss) により得た細胞の蛍光イメージを、MetaMorph imaging system (Universal imaging company) により測定した。

7-4. オルガネラ IP

(33)に示すようにオルガネラ IP を行った。実験材料 1-2 に示した方法に従って回収した 1.0×10^7 個/dish の大脳皮質の神経細胞（海馬を含む）を、Poly-D-Lysine/Laminin でコートした 100 mm プラスチックデッシュに撒いた。培養 4 日目の神経細胞から Homogenize buffer (5mM Hepes-KOH (pH 7.5), 5mM EDTA, 0.03M sucrose, appropriate protease inhibitor)を用いて cell lysate を抽出し、800g で遠心した上澄みを Homogenize buffer で洗浄した Dynabeads M-280 (Dyna) 50 μ l で一晩 preabsorption した。また、5 μ g の Normal mouse IgG もしくは抗 synaptophysin 抗体(H-8, Santa Cruz)で Dynabeads M-280 20 μ l を一晩 incubate した。preabsorption 後の上澄みと一次抗体でコーティングした Dynabeads を 4 °C で 1 hr 転倒攪拌した後、wash buffer (PBS, 2mM EDTA)で 15 分 2 回洗浄し、beads に付着している蛋白質を SDS-PAGE により分離した。その後、抗 Rab33a 抗体 (rabbit) と抗 synaptophysin 抗体(mouse)によるウェスタンブロットにより Rab33a と synaptophysin のバンドを検出した。Rab33a を検出する際の二次抗体には、Clean-Blot IP Detection Reagent (Thermo)を使用した。

8. 細胞への遺伝子導入法

8-1. HEK293T 細胞への遺伝子導入

HEK293T 細胞は、リン酸カルシウム法で遺伝子導入した。遺伝子導入前に培養 Medium を交換し、CO₂ 濃度 5 %、37 °C のインキュベータ内で 3 時間培養した。プラスミド DNA を含む 250 mM CaCl₂ 溶液に、等量の 2×BES (pH 7.0) をオートピペッターで泡立てながら滴下し、滴下後 25 分間静置した。静置したプラスミド DNA 溶液を、細胞培養液に加え、インキュベータ内で 24 時間培養した。24 時間後、新しい培養 Medium に交換し、さらに 24 時間培養した後に目的の実験に用いた。

8-2. 海馬神経細胞への遺伝子導入

海馬神経細胞への遺伝子導入は、Rat Neuron Nucleofector Kit (Lonza) を用いた。実験材料 1-2 に示した方法に従って回収した海馬神経細胞を遠心(1,000rpm、15 min、4 °C)によって回収し、PBS に Suspend した。1.0×10⁶ 個の細胞を含む PBS (1 反応あたり)を遠心 (4 °C、15 分、1,000 rpm) にかけて、上清を取り除いた後、回収した細胞を 75μl の Rat Neuron Nucleofector Solution と 18μl の Supplement (1 反応あたり)の混合溶液に再度 Suspend した。3~4μg のプラスミド DNA を加えて専用キュベットに入れ、Nucleofector 装置の Program “O-03”により遺伝子導入した。キュベットから回収した細胞を 10 % FBS を含む Neurobasal medium に Suspend し、細胞数をカウントした後、あらかじめ poly-D-Lysine/Laminin でコートしたプラスチックデッシュ、13 mm ガラスプレートもしくはガラスボトムデッシュ(松浪硝子)に細胞を播種した。CO₂ 濃度 5 %、37 °C のインキュベータ内で 3 時間培養後、2 % B-27 supplement、1 mM Glutamine を含む Neurobasal medium に交換し、実験に用いるまで培養を行った。

9. 共焦点顕微鏡を使ったタイムラプス

実験方法 8-2 に示したように回収した海馬神経細胞に EGFP-Rab33a と RFP-Synaptophysin を遺伝子導入し、松浪硝子のガラスボトムデッシュ(D110300)に細胞を播種した。培養 3 日目に神経細胞の軸索における EGFP-Rab33a と RFP-Synaptophysin の挙動を観察した。観察を始める 3 時間前に培養 Medium を 2 % B-27 supplement、1 mM Glutamine を含む L-15 Medium に交換し、CO₂ 濃度 5 %、37 °C のインキュベータ内で培養した。その後、共焦点顕微鏡上に置き観察した。Axio Observer Z1 (alpha Plan-Apochromat ×100 oil 1.46 NA, LSM 710 scan module, ZEN2009, Carl Zeiss) を用いて蛍光イメージを取得した。

10. RNAi 法による Rab33a の発現抑制

10-1. miRNA による Rab33a の発現抑制効果の確認

HEK293T 細胞を用いて miRNA の効果検討を行った。pCMV-Myc-Rab33a WT (0.5 μ g) と Rab33a に対する miRNA (5 μ g) もしくは Control miRNA (5 μ g) を上述のようにリン酸カルシウム法で HEK293T 細胞に遺伝子導入した。培養 48 時間後、細胞から RIPA Lysis buffer を用いて蛋白質を回収し、2 $\times$ SDS sample buffer に溶解した。その後、抗 Myc 抗体 (rabbit) によるウェスタンブロットにより、Rab33a に対する発現抑制の効果を検討した。

HEK293T 細胞で発現抑制効果があったベクターが、神経細胞においても同様に抑制効果を示すかを、培養神経細胞のウェスタンブロットと免疫染色によって評価した。実験方法 8-2 に示したように Rat Neuron Nucleofector Kit を用いて神経細胞に Rab33a に対する miRNA (WB: 12 μ g, 免疫染色: 5 μ g) もしくは Control miRNA (WB: 12 μ g, 免疫染色: 5 μ g) を遺伝子導入した。遺伝子導入後、miRNA を十分に発現させるため、2 % B-27 supplement、1 mM Glutamine、10 % FBS を含む Neurobasal medium に細胞を Suspend し、滅菌シャーレ (90-A; 極東製薬) 中で 24 時間浮遊培養した。浮遊培養 24 時間後、遠心 (4 $^{\circ}$ C、15 分、1,000 rpm) により細胞を回収した。上清を除いた後、PBS に細胞を Suspend し遠心 (4 $^{\circ}$ C、15 分、1,000 rpm) した。上清を除いた後、0.18 % Glucose, 0.1 % BSA (Sigma), 0.0012 % DNase (Sigma), 0.05 % Papain (ナカライ) を含む PBS (pH 7.4) 中で 4 回パスツールピペットによるピペッティングを行い、細胞を完全に Dissociate した。37 $^{\circ}$ C で 20 分インキュベートした後、沈殿している細胞には新たな 0.18 % Glucose, 0.1 % BSA, 0.0012 % DNase を含む PBS (pH 7.4) を加えて、パスツールピペットによるピペッティングおよび 37 $^{\circ}$ C でのインキュベートを、細胞が完全に Dissociate されるまで繰り返し行った。遠心分離 (4 $^{\circ}$ C、15 分、1,000 rpm) により回収した神経細胞を 10 % FBS を含む Neurobasal medium に再び懸濁し、細胞数をカウントした後、あらかじめ poly-D-Lysine/Laminin でコートした 13 mm ガラスプレート (免疫染色) および直径 35mm の dish (WB) に細胞を播種した。CO₂ 濃度 5 %、37 $^{\circ}$ C のインキュベータ内で 3 時間培養後、2 % B-27 supplement、1 mM Glutamine を含む Neurobasal medium に交換し、培養 36 時間後に上述したように免疫染色を行った。1 次抗体には抗 Rab33a 抗体 (rabbit) を用い、GFP 陽性の細胞について内在性 Rab33a の蛍光輝度を評価した。ウェスタンブロットの試料は、培養 48 時間後に RIPA Lysis buffer を用いて回収した。

10-2. Rab33a 発現抑制における小胞輸送の挙動解析

実験方法 8-2 に示したように、回収した海馬神経細胞に RFP-Synaptophysin (3 μ g) と Rab33a に対する miRNA (5 μ g) もしくは Control miRNA (5 μ g) を遺伝子

導入し、ガラスボトムデッシュ(D110300, 松浪硝子)に細胞を播種した。培養 3 日目に神経細胞の軸索における RFP-Synaptophysin の挙動を観察した。観察を始める 3 時間前に、培養 Medium を 2 % B-27 supplement、1 mM Glutamine を含む L-15 Medium に交換し、CO₂ 濃度 5 %、37 °C のインキュベータ内で培養した。IX81N-ZDC (Olympus)、CCD camera (C4742-80-12AG; Hamamatsu) を用いて蛍光イメージを取得した。得られたイメージから MetaMorph imaging system (Universal imaging company) を用いて Kymograph を作成、Multi Gauge software (Fujifilm)によりその挙動を解析した。

また、Rab33a 発現抑制させた神経細胞の内在性 synaptophysin の局在解析は、以下に示すとおりに行った。実験方法 10-1 に示したように Rat Neuron Nucleofector Kit を用いて Rab33a に対する miRNA (5 µg) もしくは Control miRNA (5 µg) を遺伝子導入し、24 時間浮遊培養した後細胞を回収し、あらかじめ poly-D-Lysine/Laminin でコートした 13 mm ガラスプレートに細胞を播種した。CO₂ 濃度 5 %、37 °C のインキュベータ内で 3 時間培養後、2 % B-27 supplement、1 mM Glutamine を含む Neurobasal medium に交換し、軸索形成後の培養 2 日後に上述したように免疫染色を行った。1 次抗体には抗 Rab33a 抗体 (rabbit) と抗 synaptophysin 抗体(mouse)を用い、GFP 陽性の細胞かつ Rab33a が発現抑制されている神経細胞および極性形成が完了している神経細胞の軸索先端における synaptophysin の蛍光強度の評価を行った。

10-3. Rab33a 発現抑制における膜融合頻度の解析

実験方法 8-2 に示したように回収した海馬神経細胞に pCMV::SypHy 4A (3 µg) と Rab33a に対する miRNA (5 µg) もしくは Control miRNA (5 µg) を遺伝子導入し、松浪硝子のガラスボトムデッシュ(D111300)に細胞を播種した。培養 3 日目に神経細胞の軸索先端における SypHy の蛍光イメージを観察した。観察を始める 3 時間前に、培養 Medium を 2 % B-27 supplement、1 mM Glutamine を含む L-15 Medium に交換し、CO₂ 濃度 5 %、37 °C のインキュベータ内で培養した。突起先端における膜融合の観察は(34)を参照し、全反射照明蛍光顕微鏡[Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF)] [ECLIPSE TE2000-U (Nikon)、Apo TIRF ×60 oil 1.49 NA (Nikon)、CCD camera (C9100; Hamamatsu)] を用いて、SypHy の蛍光イメージを取得した。

10-4. Rab33a 発現抑制による神経細胞の表現型解析

Rab33a 発現抑制の表現型解析は、以下に示すとおりに行った。実験方法 10-1 に示したように Rat Neuron Nucleofector Kit を用いて Rab33a に対する miRNA (5 µg) もしくは Control miRNA (5 µg) を遺伝子導入し、24 時間浮遊培養した後細

胞を回収し、あらかじめ poly-D-Lysine/Laminin でコートした 13 mm ガラスプレートに細胞を播種した。CO₂ 濃度 5 %、37 °C のインキュベータ内で 3 時間培養後、2 % B-27 supplement、1 mM Glutamine を含む Neurobasal medium に交換し、軸索形成直後の培養 36 時間後に上述したように免疫染色を行った。1 次抗体には抗 Rab33a 抗体 (rabbit) を用い、GFP 陽性の細胞かつ Rab33a が発現抑制されている神経細胞における形態の評価を行った。

11. Rab33a の過剰発現による表現型解析

遺伝子導入は実験方法 8-2 に示したように Rat Neuron Nucleofector Kit を用いて行った。pCAGGA-myc-GST (3 µg)、pCAGGS-myc-Rab33a Q95L (3 µg)、pCAGGS-myc-T50R (3 µg)、pCAGGS-myc-Rab33a wild-type (3 µg) を遺伝子導入し、あらかじめ poly-D-Lysine/Laminin でコートした 13 mm ガラスプレートに細胞を播種した。CO₂ 濃度 5 %、37 °C のインキュベータ内で 3 時間培養後、2 % B-27 supplement、1 mM Glutamine を含む Neurobasal medium に交換し、目的の実験に用いるまで培養した。

形態的評価については培養開始後 6 日目に細胞を固定し、免疫染色を行った。1 次抗体には抗 Myc 抗体 (rabbit) を用い、抗 Myc 抗体陽性の細胞について形態的評価を行った。pCAGGS-Myc-GST は神経細胞の形態変化を観察するための陰性コントロールベクターとして用いた。

内在性 synaptophysin の局在解析については、培養開始後 3 日目に細胞を固定し、免疫染色を行った。1 次抗体には抗 Myc 抗体 (rabbit) および抗 Synaptophysin 抗体 (mouse) を用い、抗 Myc 抗体陽性の細胞について内在性 Synaptophysin の局在変化の評価を行った。pCAGGS-Myc-GST は神経細胞の形態変化を観察するための陰性コントロールベクターとして用いた。

12. Rab33a に結合している GTP および GDP の解析

実験方法 8-1 に示したように HEK293T 細胞に pCMV-FLAG-Rab33a wild-type、pCMV-FLAG-Rab33a Q95L および pCMV-FLAG-Rab33a T50N をリン酸カルシウム法により遺伝子導入した。遺伝子導入を行った 48 時間後に 10 % FBS と ³²P_i (1.2 mCi/dish; GE Healthcare) を含む phosphate-free DMEM (GIBCO Invitrogen) に交換し、CO₂ 濃度 5 %、37 °C のインキュベータ内で 3 時間培養した。その後、HEK293T 細胞から immunoprecipitation buffer A [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, and 2 µg/ml aprotinin] を用いて細胞抽出液を回収した。取り込まれなかった細胞抽出液中の GTP および GDP は Charcoal (ナカライ) に吸着させた。遠心分離 (4 °C、5 分、15,000 rpm) により回収した上澄みを 1 µg の Flag 抗体を含むエッペンチューブと含まないエッペンチ

ューブとに二等分し、4°C で 30 分間 rotate した。この溶液に、あらかじめ immunoprecipitation buffe A で平衡化しておいた 50% protein G-Sepharose 4B (GE Healthcare)を 15 μ l 加え、4°C で 60 分間 rotate した。その後、immunoprecipitation buffe A で 3 回、immunoprecipitation buffe B [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM MgCl₂, 150 mM NaCl]で 2 回 wash を行い、遠心分離 (4 °C、5 分、2000 rpm)により回収したビーズに Elution buffer [40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 40 mM EDTA, 4% (w/v) SDS, 1 mM GDP, 1mM GTP]を加え懸濁し、65°C で 5 分間処理した。溶出液を PEI-cellulose TLC にスポットし、0.75 M の KH₂PO₄(pH 3.4)で展開し、放射活性は BAS (富士フイルム) を使って検出した。

13. 神経細胞の形態の定量解析

それぞれの免疫染色画像を取り込み定量ソフト ImageGauge (Fijifilm)で解析を行い、神経突起の長さや細胞内での蛍光強度を測定し、数値化データを得たのち表計算ソフト Excel (Microsoft) により統計解析および有意差検定を行った。極性形成の判定基準としては、幅広く用いられている基準に従って判定を行った。これは、最も長い神経突起の長さが他の突起の長さの 2 倍以上であり、かつ最も長い神経突起の長さが 100 μ m 以上であった場合には極性形成が行われた Stage3 の神経細胞とし、それ以外の場合には極性形成前の Stage2 の神経細胞とみなした。

14. 有意差検定

Unpaired Student *t* tests を用いて有意差の検定を行った。図 16C 左のグラフにおいてのみ、多群比較のために ANOVA によって多重比較検定を行った後、Shaffer's *post hoc* test を行った。

<結果>

1. Rab33a は脳において高い発現が認められる

Rab33a の各臓器におけるタンパク質の発現分布を解析するため、抗 Rab33a 抗体を用いて成体ラットの脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、肺、骨格筋、および胎盤由来の抽出液をウェスタンブロットにより解析した。その結果、脳由来のサンプルにおいて 26kDa 付近に Rab33a のバンドが検出され、その他の組織由来のサンプルでは 26kDa の Rab33a のバンドは全く認められなかった (図 3A)。

2. Rab33a は軸索形成時期に発現が上昇する

次に、ラット脳の発達に伴う Rab33a の発現量の推移を解析した。胎生 15 日 (E15)、胎生 18 日 (E18)、生後 1 日 (P1)、生後 4 日 (P4)、生後 7 日 (P7)、生後 14 日 (P14) および成体ラットの脳からタンパク質を回収し、Rab33a の各発生過程における発現量をウェスタンブロットにより解析した。その結果、Rab33a は胎生期から発現が認められ、神経突起伸長が盛んな E18 サンプルで最も高い発現量を示した (図 3B)。Rab33a の高い発現は P4 まで維持され、P7 以降から緩やかに低下した。

次に、培養海馬神経細胞の極性形成に伴う Rab33a の発現量の変化を調べた。異なる期間培養を行った海馬神経細胞から蛋白質を調整し、各 Time point における Rab33a の発現量をウェスタンブロットにより解析した。その結果、極性形成前 (培養 22 時間) と極性形成後 (培養 65 時間) の間で Rab33a の発現量の上昇が認められた (図 3C)。Rab33a は 7 日間培養を行ったサンプル (DIV7) でも、高い発現レベルを維持していたが、軸索の伸長が終わり、シナプスの形成が開始する培養 14 日目 (DIV14) のサンプルでは、Rab33a の発現レベルは低下した (図 3C)。

3. Rab33a は Minor process および軸索に存在するが、極性形成に伴い軸索に濃縮する(27)

培養海馬神経細胞の極性形成に伴う Rab33a の細胞内分布の変化を解析するため、抗 Rab33a 抗体と green volume marker である CMFDA を用いて神経細胞の免疫染色を行った。Stage2 (極性形成前)、Stage3 (極性形成後) と Stage4 の神経細胞を用いて、各段階の内在性 Rab33a の細胞内分布を解析した。その結果、どの発達段階においても内在性 Rab33a は細胞全体に存在していることが分かった。また、Stage 2 では、Minor process の成長円錐 (46%、n=185) に濃縮し (図 4A)、Stage 3 では、Minor process (40%、n=106) に加え、軸索の成長円錐 (56%、n=76)

にも濃縮が見られた (図 4B)。Stage 4 では、軸索の成長円錐 (40%、n=93) から軸索のシャフトの遠位部分にかけて、他の Minor process よりも強い濃縮が見られた (図 4C)。(佐田修士論文データ)

4. Rab33a は synaptophysin 陽性の小胞と共局在する

Rab は細胞内の膜 (小胞) 輸送の制御に関わる分子であることから、Rab33a も神経細胞内において小胞上に存在することが考えられる。そのため次に、極性形成時期の神経細胞における Rab33a の挙動と細胞内局在を解析した。培養海馬神経細胞に EGFP-Rab33a を遺伝子導入し、24 時間培養した細胞の Time lapse 観察によって Rab33a の挙動を解析した。その結果、EGFP-Rab33a は核周辺部において強い濃縮が観察され、さらに細胞全体にも小胞様のドット状に観察された (図 5A)。この小胞様のドットは細胞体内だけでなく神経突起内にも存在し、突起内を順行性にも逆行性にも輸送される様子が観察できた (図 5A Kymographs)。このことから、Rab33a も他の Rab と同様に細胞内において小胞輸送に関わる可能性が示唆される。

次に培養海馬神経細胞内における内在性 Rab33a の局在を解析するために、免疫染色を行った。高倍率で観察した結果、上記 Time lapse で観察されたように、内在性 Rab33a も核の周辺部に強く濃縮し、その他の部位では小胞様に観察された。細胞体で Rab33a の強い濃縮が観察された部分は、シス-ゴルジ装置のマーカーである Giantin(35)、GM130(36)、またトランス-ゴルジ装置のマーカーである Adaptin γ (37)、TGN38(38)によって染色された部分と一致した (図 6)。Rab33a のゴルジ装置への局在をさらに確認するため、微小管重合阻害剤である Nocodazole で神経細胞を処理し、ゴルジ装置を細胞質中で分散させ、Rab33a と Golgi 装置のマーカーとの共局在を観察した。その結果、Rab33a も Nocodazole 処理によって、ゴルジ装置マーカーと同様に細胞質内に分散が認められた (図 6)。また各ゴルジ装置マーカーとの局在を解析した結果、Giantin 陽性領域の $27 \pm 6.9\%$ が Rab33a 陽性(n=3)、GM130 陽性領域の $9.0 \pm 2.1\%$ が Rab33a 陽性(n=3)、adaptin γ 陽性領域の $12 \pm 2.0\%$ が Rab33a 陽性(n=3)、TGN38 陽性領域の $8.9 \pm 1.8\%$ が Rab33a 陽性(n=3)であることが分かった。

軸索内においては内在性 Rab33a と synaptophysin との共局在が認められた (図 5B)。二重免疫染色像を解析したところ、synaptophysin 陽性小胞のうち $25.0 \pm 1.9\%$ (n=399) が Rab33a と共局在することが分かった。また、軸索の成長円錐における内在性 Rab33a は、成長円錐全体に染色像が認められたが、内在性 synaptophysin は主に成長円錐の C ドメインに存在した。成長円錐の C ドメインでは、synaptophysin 陽性小胞のうち $8.0 \pm 0.5\%$ (n=814) が Rab33a と共局在することが分かった (図 5C, 矢頭)。さらに EGFP-Rab33a と RFP-synaptophysin を

遺伝子導入した神経細胞の共焦点顕微鏡を用いた Time lapse 観察により、軸索において両分子が共に輸送される様子が観察できた (図 5D)。また、神経細胞を用いたオルガネラ IP によって Rab33a と synaptophysin が同じ小胞上に存在することが分かった (図 5E)。これまでに、synaptophysin はシナプス小胞に豊富に存在するタンパク質としてよく知られている(39,40)。しかし、シナプス形成前にも synaptophysin の発現は認められており、軸索形成に伴い発現が上昇し、軸索への局在が多くなることが報告されている(41)。さらに PC12 細胞を用いた解析より、新たに合成された synaptophysin はゴルジ装置から突起の細胞膜へと輸送され、early endosome へと回収されることが報告されており、神経細胞においても、ゴルジ装置から、軸索内を輸送され、突起先端の細胞膜へと exocytosis によって挿入され、その後 endocytosis によって early endosome へと回収されることが報告されている(42-45)。そこで、Rab33a が synaptophysin を含む小胞のどの輸送経路上に存在するかを免疫染色によって解析した。本解析では、early endosome 上に局在する Rab4、Rab5 や Rab10、late endosome 上に局在する Rab7 や Rab9、および recycling endosome 上に局在する Rab8 や Rab11 といった endosome 上に局在する Rab タンパク質と Rab33a との二重免疫染色を行った。また、Rab11 や Rab27 によって軸索へ輸送されることが報告されている Trk(15,16)と Rab33a との二重免疫染色も行った。その結果、どの Rab タンパク質とも共局在は認められなかった (図 7)。また、Trk との共局在も認められなかった (図 7)。このことから、Rab33a が synaptophysin 陽性の小胞のうち、endocytosis 後の小胞ではなく、ゴルジ装置から細胞膜へ輸送される小胞に局在する可能性が示唆された

5. Rab33a は順行性輸送に関与する

次に、Rab33a が小胞輸送への関与を、RNAi 法により解析した。解析に先立ち、Rab33a に対する miRNA およびコントロールの miRNA と Myc-Rab33a を Transfection した HEK293T 細胞からタンパク質を抽出し、抗 Myc 抗体によるウェスタンブロットを行った。その結果、コントロールの miRNA を導入した細胞に対し、Rab33a に対する miRNA を導入した HEK293T 細胞では Rab33a の発現が低下していた (図 8A)。同様に、神経細胞における内在性 Rab33a に対する発現抑制効果も検討した結果、コントロールの miRNA を導入した細胞に対し、Rab33a に対する miRNA を導入した神経細胞では内在性 Rab33a の発現が低下していた (図 8B)。また、miRNA を導入した神経細胞 (GFP 陽性の神経細胞) について、抗 Rab33a 抗体による免疫染色を行った結果、コントロールの miRNA を導入した神経細胞と比較し、miRNA #1 では抗 Rab33a 抗体による染色強度が 83 %低下していた (図 8C, miRNA #2 : 74 %, 各 45 cells)。このことから作成した miRNA は内在的に発現する Rab33a の発現を抑制することが分かった。

続いて培養海馬神経細胞に miRNA と RFP-synaptophysin を導入し、培養 72 時間後の神経細胞の軸索における RFP-synaptophysin の動態を解析した。この解析では図 9A の左図の点線枠で示すように、細胞体から 200 μm 以内の軸索内に存在する RFP-synaptophysin の挙動を 20 秒間 Time lapse 観察した。その結果、コントロールの細胞では、観察した領域あたり 20 ± 0.89 個 ($n=4$, 454 vesicles, 23 cells) の小胞が観察されたのに対して、Rab33a を発現抑制させた神経細胞#1 では、 11 ± 1.0 個 ($n=4$, 318 vesicles, 27 cells)、#2 では 14 ± 1.4 個 ($n=4$, 320 vesicles, 22 cells) と、観察される小胞の数が有意に減少していた(図 9B, Rab33a miRNA#1; $p < 0.005$, Rab33a miRNA#2; $p < 0.05$)。次に、取得したイメージから Kymograph を作成し(図 9A, Kymograph)、観察された RFP-synaptophysin の動きを以下のように 3 つに分類し、各小胞数や輸送速度を比較した。

- ①最終的に順行性に輸送された小胞 (Anterograde vesicles)
- ②最終的に逆行性に輸送された小胞 (Retrograde vesicles)
- ③最終的に移動が確認できなかった小胞 (Immobile vesicles)。

その結果、コントロールの細胞と比較し、Rab33a を発現抑制させた神経細胞では、Anterograde vesicles と Immobile vesicles の数が有意に減少した(図 9C, $p < 0.05$, $p < 0.005$)。また、各小胞の輸送速度の分布を解析したところ、Rab33a を発現抑制させた神経細胞において Anterograde vesicles(図 9D 右, ヒストグラム)も Retrograde vesicles(図 9E 右, ヒストグラム)も輸送速度 0~2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ の小胞の割合がコントロール細胞よりも高かった。しかし、コントロールと比べると、Rab33a を発現抑制させた細胞において、Anterograde vesicles の輸送速度 0~2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ の小胞の割合が顕著に高くなっていた。つまり、コントロール細胞と比べて、Rab33a を発現抑制させた細胞では、RFP-synaptophysin の順行性輸送の平均速度が有意に遅くなることが分かった(図 9D, $p < 0.005$)。以上の結果より、Rab33a が synaptophysin 陽性の小胞の順行性輸送に関与する可能性が示唆された。

6. Rab33a の発現抑制によって軸索先端における内在性 synaptophysin の局在が減少する

上記のように Rab33a は順行性輸送に関わる可能性が示唆された。そこで、Rab33a を発現抑制させた神経細胞における、内在性 synaptophysin の局在を検証した。コントロール miRNA および Rab33a に対する miRNA を遺伝子導入した神経細胞は、培養 72 時間後に抗 Rab33a 抗体と抗 synaptophysin 抗体を用いて免疫染色を行い、GFP 陽性細胞の内、Rab33a が発現抑制されかつ極性形成が完了している細胞において、内在性 synaptophysin の蛍光像を観察した。その結果、コントロールの神経細胞では、これまでの報告と同じように(41)細胞体と軸索の遠位に内在性 synaptophysin の蛍光が観察された(図 10A 上)。一方で Rab33a を

発現抑制させた神経細胞では、細胞体の蛍光は認められるものの軸索遠位の蛍光はほとんど認められなかった（図 10A 下）。そこで、神経細胞の軸索（軸索先端より 20 μm ）における内在性 synaptophysin の染色強度を測定し比較を行った。その結果、神経細胞の軸索先端における内在性 synaptophysin の染色強度の相対比は、コントロール細胞を 1 ($n=3$, 108 cells) とすると、Rab33a を発現抑制させた細胞 miRNA #1 では、 0.49 ± 0.033 ($n=3$, 104 cells)、Rab33a miRNA #2 は 0.40 ± 0.068 ($n=3$, 89 cells) となり、有意に減少していた（図 10B, Rab33a miRNA#1; $p < 0.005$, Rab33a miRNA#2; $p < 0.05$ ）。この時、コントロールの神経細胞と Rab33a を発現抑制させた神経細胞とで内在性 synaptophysin の発現量に差がないことをウェスタンブロットによって確認した（図 10C）。以上の結果より、Rab33a が synaptophysin を含む小胞の輸送に関与する可能性が内在性 synaptophysin においても示唆された。

7. Rab33a の発現抑制によって軸索先端における synaptophysin 陽性の小胞の膜融合頻度が減少する

これまでの結果から、Rab33a が synaptophysin を含む小胞の順行性輸送に関わる可能性が示唆された。そこで、次に軸索先端における膜供給への影響を検証した。本解析には pHluorin（中性の pH 条件下で蛍光を発するように改変させた GFP(46)）を細胞外ドメインに付加した synaptophysin（sypHy）をマーカーとして使用した（図 11A）。sypHy は小胞内の pH が酸性条件下だと GFP の蛍光は消光され、小胞が細胞膜に挿入され中性条件の培養液に接する GFP の蛍光を発する。このため、全反射照明蛍光顕微鏡(Total internal reflection fluorescent; TIRF)によって膜近傍（約数百 nm）における蛍光イメージを観察することにより、細胞膜に挿入された小胞の挙動を知ることができる(34)（図 11B）。培養海馬神経細胞にコントロール miRNA（RFP も発現する）および Rab33a に対する miRNA（RFP も発現する）と pSypHy を同時に遺伝子導入し、培養 72 時間後の神経細胞において sypHy の蛍光イメージの観察を行った（図 12A）。神経細胞における sypHy の蛍光イメージは主に細胞体と軸索遠位と成長円錐で観察された。これまでの報告より(5,6,47)、膜小胞は突起先端の成長円錐において供給されると考えられるため、本実験では軸索の成長円錐に注目し、解析を行った。RFP の蛍光により成長円錐の形を認識することができる（図 12A）。軸索の成長円錐における sypHy の蛍光は、filopodia の先端にも観察されたが、主に C ドメインで認められた。観察された輝点には、膜融合した際に突然出現するものだけでなく、成長円錐内を移動しているものも観察され、輝点の観察される時間も短いものから長いものまで観察された（図 12B）。輝点の観察される時間が 1 秒以下のものは、膜に融合されるのではなく、kiss-and-run ですぐに endocytosis される小胞

であると考えられる(48)。このため、本解析では、sypHy の蛍光が見え始めてから 2 秒以上維持された輝点を、細胞膜に融合した sypHy を含む小胞とし、その輝点の数を評価した。その結果、コントロール細胞の成長円錐では、1 分あたり 9.2 ± 2.2 回/ $100 \mu\text{m}^2$ (227 vesicles, 12 cells) の膜融合イベントが観察され、Rab33a に対する miRNA を遺伝子導入した細胞の成長円錐では、1 分あたり、 2.9 ± 0.68 回/ $100 \mu\text{m}^2$ (111 vesicles, 11 cells) の膜融合イベントが観察された (図 12C, グラフ, $p < 0.05$)。以上の結果より、コントロールの細胞と比較して Rab33a を発現抑制させた細胞では、軸索の成長円錐における膜融合の頻度が低くなることが分かった。

8. Rab33a の発現抑制によって軸索形成と伸長が阻害される

次に神経極性形成における Rab33a の機能解析として、Rab33a を発現抑制させた神経細胞の表現型解析を行った。コントロール miRNA および Rab33a に対する miRNA を遺伝子導入した神経細胞を、24 時間の浮遊培養を行った後、極性形成直後の培養 36 時間後に、抗 Rab33a 抗体を用いて免疫染色を行った。Rab33a に対する miRNA を遺伝子導入した神経細胞において、GFP 陽性であり、かつ Rab33a が発現抑制されている神経細胞について形態の解析を行った (図 13A)。その結果、コントロールの miRNA を遺伝子導入した神経細胞では、 37 ± 3.6 % ($n=6$, 386 cells) の細胞が極性形成を完了していたのに対し、Rab33a に対する miRNA を遺伝子導入した神経細胞では、 18 ± 3.1 % ($n=6$, 322 cells) に減少していた (図 13B, $p < 0.01$)。また、図 13A で示したように Rab33a を発現抑制させた細胞では、短い突起をもつ神経細胞が多く観察されたため、神経細胞の各突起と全神経突起の長さ、および神経突起の本数について定量的な評価を行った。コントロールの細胞では、長い突起から順に平均 144.4、61.17、33.4、22.3 μm であったのに対し、Rab33a を発現抑制させた細胞では、平均 87.1、44.8、29.0、19.4 μm となり、有意差検定の結果、4 番目に長い突起以外のすべての神経突起において、有意な差が認められた (図 13C, $p < 0.05$, $p < 0.005$)。この時の全神経突起の長さの総和を比較すると、コントロール細胞では、 $252.5 \pm 13.9 \mu\text{m}$ 、Rab33a を発現抑制させた細胞では $175.0 \pm 7.1 \mu\text{m}$ と有意に減少していた (図 13D, $p < 0.01$)。一方で、神経突起の本数に有意な差は認められなかった (図 13E)。同様の実験を、違う配列を標的にした miRNA #2 を用いて行ったところ、同じ結果が得られた (図 14)。また、さらに培養 24 時間経過した神経細胞 (浮遊培養 24 時間 + 培養 24 時間) において、極性形成を完了した細胞の割合を統計解析したところ、コントロールの神経細胞では、 80 ± 0.23 % ($n=3$, 150 cells) の細胞が極性形成を完了していたのに対し、Rab33a に対する miRNA #1 を遺伝子導入した神経細胞では、 63 ± 2.8 % ($n=3$, 198 cells) と有意に減少していた ($p < 0.05$)。以上の結果よ

り、Rab33a を発現抑制させた細胞では、極性形成を完了した細胞の割合が低く、各突起の伸長も抑制されており、特に一番長い神経突起の長さは、コントロールの細胞と比較して顕著に伸長が抑制されていることが分かった。

9. Rab33a の過剰発現によって過剰な軸索形成が誘導される

Rab33a は、低分子量 GTP 結合タンパク質であり、GTP/GDP 結合と GTPase 活性に関与する領域をもつ(49,50)。このため、GDP を結合した不活性化型と GTP を結合した活性化型をサイクリングすることで、細胞内の小胞輸送を制御すると考えられる。そこで神経細胞における Rab33a の活性化型および不活性化型による機能を明らかにするために、恒常活性化型変異体 Rab33a Q95L と不活性化型変異体 Rab33a T50R の 2 つの変異体を神経細胞に遺伝子導入し、表現型の解析を行った。それに先立ち、HEK293T 細胞を用いて Rab33a WT、Q95L、T50R に結合している GDP/GTP を評価した。その結果、HEK293T 細胞に発現している Rab33aWT と Q95L のほとんどの、GTP が結合していることが分かった。一方で、Rab33a T50R は GDP も GTP も結合がみられなかった。このことから、細胞内に発現している Rab33a Q95L は、GTP が加水分解されず、GTP 結合状態が保持された恒常活性化型変異体として、Rab33a T50R は、GTP および GDP と結合していないヌクレオチドフリーの不活性化型変異体として存在すると考えられる(図 15B)。

続いて、Rab33a の神経細胞の極性形成における分子機能を調べるために、Rab33a を過剰発現した神経細胞の表現型解析を行った。本実験では、pCAGGS-Myc ベクターを用いて、培養海馬神経細胞におけるタンパク質の過剰発現を行った。その後、培養 7 日目に Anti-myc 抗体による免疫染色を行い、細胞の形態変化を調べた。コントロールには、pCAGGS-myc-GST を用いた。まず初めに、恒常活性化型変異体 Rab33a Q95L と恒常不活性化型変異体 Rab33a T50R を過剰発現させた神経細胞の形態を観察した。その結果、Rab33a Q95L を過剰発現させた神経細胞は、軸索マーカーの Tau-1 陽性の長い神経突起を 2 本以上もつ細胞が $17.4 \pm 2.4\%$ ($n=3$, 76 cells) みられた(図 16A)。この長い神経突起樹状突起マーカーである MAP2 陰性(図 16B)であることから、軸索であると考えられる(佐田修論データ(27))。一方で、恒常不活性化型変異体 Myc-Rab33a T50R を過剰発現させた細胞では、 $8.0 \pm 1.1\%$ ($n=3$, 83 cells) の細胞が、過剰な軸索を形成していた。実験系のコントロールとして用いた Myc-GST を過剰発現させた神経細胞では、 $7.4 \pm 1.3\%$ ($n=3$, 74 cells) の細胞において、過剰な軸索形成が認められた(図 16A, B and C, $p < 0.05$)。以上の結果から、活性化変異体 Rab33a Q95L の過剰発現によって、過剰な軸索形成が誘導されたが、不活性化型変異体 Rab33a T50R の過剰発現では、コントロール細胞と比べて顕著な違いが認められ

ないことが分かった。

次に、Rab33a の wild-type (WT) を過剰発現させた神経細胞の培養 7 日後の形態を観察した。コントロールとして Myc-GST を過剰発現させた神経細胞では、 $4.5 \pm 2.2\%$ ($n=3$, 127 cells) の細胞が、過剰な軸索を形成していたのに対し、Rab33a WT を過剰発現させた細胞では、 $14 \pm 9.0\%$ ($n=3$, 120 cells) の細胞において過剰な軸索形成が認められた (図 16C)。そして、過剰発現によって過剰な軸索形成が観察された Rab33a Q95L と WT において、それぞれを過剰発現させた際の全神経突起の長さの総和を、コントロール細胞と比較した。コントロール細胞では、全神経突起の総和が 1.3 ± 0.076 mm に対し、Rab33a Q95L を過剰発現させた細胞では 1.5 ± 0.089 mm となり、有意な差はみられなかった。また、コントロール細胞が、 1.4 ± 0.071 mm であったのに対し、Rab33a WT を過剰発現させた細胞では 1.4 ± 0.078 mm であり (図 16D)、有意な差はみられなかった。以上の結果、恒常活性化型変異体 Rab33a Q95L と WT の過剰発現によって、過剰な軸索形成の誘導が認められたが、全神経突起の総和には有意な差が認められないことが分かった。

10. Rab33a の過剰発現によって内在性 synaptophysin の異所的な局在が増加する

7 日間培養を行った神経細胞では、Rab33a Q95L の過剰発現によって、複数の軸索が形成され、抗 synaptophysin 抗体による免疫染色の結果、その長い神経突起において内在性 synaptophysin の染色が認められていた (図 17, 佐田修論データ (27))。そこで、Rab33a を過剰発現させた神経細胞における、内在性の synaptophysin の局在解析を次のように行った。本解析では、神経細胞に Myc-Rab33a WT、Q95L、コントロールとして Myc-GST を過剰発現させ、極性形成が完了した神経細胞の神経突起 (神経突起先端より 20 μ m) における内在性 synaptophysin の染色強度を測定し比較を行った。その結果、軸索における染色強度の相対比は、コントロール細胞を 1 ($n=3$, 61 cells) とすると、Rab33a WT は 1.1 ± 0.18 ($n=3$, 70 cells)、Rab33a Q95L は 0.97 ± 0.14 ($n=3$, 66 cells) となり、有意な差は認められなかった。それに対して Minor process (図 18A 右, 長さ 100 μ m 以下の神経突起) における染色強度の相対比は、コントロール細胞を 1 とすると、Rab33a WT は 1.5 ± 0.0077 、Rab33a Q95L は 1.5 ± 0.10 となり、有意な差が認められた (図 18B, $p < 0.05$, $p < 0.005$)。この時、コントロールの神経細胞と Rab33a を過剰発現させた神経細胞とで内在性 synaptophysin の発現量に差がないことをウェスタンブロットによって確認した (図 18C)。以上の結果から、Rab33a の恒常活性化型変異体 Q95L と Rab33a WT の過剰発現によって、内在性 synaptophysin の異所的な局在の増加が認められた。

< 考察 >

本研究では、Rab33a の神経細胞内における機能の解析を行った結果、Rab33a がゴルジ装置から軸索先端への順行性の小胞輸送に関わること、さらに、Rab33a が軸索の伸長に関与することを見出した。この結果は、これまで分かっていた、ゴルジ装置から軸索先端への新たな膜成分の輸送に Rab33a が関与し、軸索の伸長を引き起こす可能性を示唆している。

神経細胞の極性形成時期における Rab33a の発現

生体ラットの各組織における Rab33a の発現分布を解析した結果、Rab33a は脳に多く発現しており、各発達段階の脳における Rab33a の発現分布は、神経突起伸長が盛んな E18 をピークに、生後から成体にかけて緩やかに低下することが分かった。また、培養海馬神経細胞における Rab33a の発現量推移は、極性形成時期において上昇が認められ、神経突起が伸長する時期には一定の発現量が保たれるが、神経細胞がシナプスを形成し始める培養 14 日目 (Stage5) の神経細胞では発現が低くなった。序論でも述べたよう Rab33a はこれまでに、リンパ球やメラニン細胞において発現していることが報告されている(24)。それだけでなく、Zheng (25)や Cheng (24)らの報告や本実験の結果より、脳にも多く発現していることがわかる。さらに Lee (26)らの報告より、マウス脳における Rab33a の発現量推移もラット脳と同様に胎生 13 日目をピークにその後緩やかに低下することが報告されている。つまり、Rab33a は脳においても発現が認められ、その発現量は神経細胞の極性形成の初期段階において最大になることから、軸索形成時期において機能する可能性が示唆された。

Rab33a はゴルジ装置から軸索への小胞輸送に関与する

synaptophysin は、これまでにシナプス小胞内のチャンネル蛋白質として機能すること、またシナプス小胞の放出に関与すると考えられていたが、ノックアウトマウスの解析結果、脳構造やシナプス小胞の放出に変化がみられなかったことから(51,52)、明確な機能は不明である。synaptophysin は、神経細胞のシナプス小胞に豊富に局在する 38kDa の膜タンパク質として同定され、成熟した神経細胞の軸索マーカーとして用いられている(39,40)。しかし、シナプス形成前の神経細胞においても synaptophysin の発現は認められており、軸索形成に伴い発現が上昇し、ゴルジ装置から輸送され、伸長する軸索への局在が多くなることが報告されている(41,53)。また、神経細胞において synaptophysin はゴルジ装置から輸送され、細胞膜に挿入された後 endocytosis によって early endosome へと

回収されることがわかっている(45,54)。そこで本研究の解析では、神経細胞内で輸送される小胞のマーカーとして使用した。

本研究の実験結果から、培養海馬神経細胞を用いた免疫染色により、Rab33a は上記の膜タンパク質である synaptophysin とゴルジ装置マーカーとそれぞれ共局在することが分かった。一方、early endosome 上に局在する Rab4、Rab5 や Rab10(55-58)、late endosome 上に局在する Rab7 や Rab9(57,59)、および recycling endosome 上に局在する Rab8 や Rab11(56,60-63)といった endosome 上に局在するどの Rab タンパク質とも共局在は認められなかった。このことから、Rab33a は synaptophysin を含む小胞のうち、上記の Rab (Rab4、Rab5、Rab7、Rab8、Rab9、Rab10、Rab11) とは違った小胞輸送に Rab33a が関わる可能性が示唆された。つまり、synaptophysin 陽性の小胞のうち、endocytosis 後の小胞輸送ではなく、ゴルジ装置から細胞膜への小胞輸送に Rab33a が関与する可能性が示唆された。また、Rab27 や Rab11 が、Trk 受容体の軸索への輸送に関わること(15,16)が報告されていたので、Trk 受容体と Rab33a との免疫染色を行った。その結果、Trk 受容体と Rab33a との共局在も認められなかった。このことから、Rab33a はカーゴ特異的な小胞輸送に関わることが予測される。また、図 5 に示すように synaptophysin との共局在が認められない Rab33a も多く存在することや、Rab11 が Trk 受容体やインテグリンといった複数の分子の軸索への輸送に関わる(16,22)ことから、Rab33a が制御する小胞上に synaptophysin 以外の分子が複数存在することが予測される。今後、Rab33a が存在する小胞画分を単離し、その小胞上の分子を同定することで、Rab33a が関わる小胞輸送について、さらなる解析が期待できる。

Rab33a は順行性輸送に関与する

これまでの報告から、synaptophysin は神経細胞内において、軸索内を両方向に輸送されることが報告されている(42,43)。本研究の実験結果からも、これまでと同様に、培養海馬神経細胞の軸索において RFP-synaptophysin が両方向に輸送される様子が観察された。また、本解析で観察された RFP-synaptophysin の平均順行性輸送速度は、これまで報告されたもの ($0.69 \pm 0.33 \mu\text{m/s}$: (42)) と比べると、かなり速い ($4.1 \pm 0.38 \mu\text{m/s}$) が、これは撮影のインターバルの時間を短くすることによって速い輸送も検出できたからだと考えられる (各フレームのインターバル : 3.45 s (42) $\rightarrow 0.1 \text{ s}$)。

本研究では、細胞内を両方向に移動する RFP-synaptophysin の挙動を、Rab33a を発現抑制させた神経細胞とコントロールの細胞において評価した。その結果、Rab33a を発現抑制させた神経細胞では、軸索内を輸送させる RFP-synaptophysin の数が減少し、順行性輸送においてのみに有意な差が認められた。また、Rab33a

を発現抑制させた神経細胞の軸索における内在性 synaptophysin の局在量を、synaptophysin の染色強度で評価した。その結果、Rab33a を発現抑制させた神経細胞の軸索先端における内在性 synaptophysin の染色強度は、コントロール神経細胞と比較して、半分以下に減少することが分かった。一方で、Rab33a WT および恒常活性化型変異体を過剰発現させた神経細胞の神経突起先端（先端から 20 μm ）における synaptophysin の局在量を、その染色強度で評価したところ、Minor process（図 18A 右、長さ 100 μm 以下の神経突起）における染色強度がコントロールの細胞よりも有意に高くなった。以上の結果から、Rab33a は synaptophysin 陽性の小胞のゴルジ装置から神経突起への順行輸送に関与し、神経突起先端への膜小胞を供給する可能性が示唆された。

Rab33a は突起先端での膜供給に関与する

序論でも述べたように、神経細胞が神経突起を伸長させるには、1 時間あたりおよそ細胞体の表面積の 1/5～1/2 量に匹敵するほど、膨大な量の表面積を拡大する必要がある(7,8)。膜成分は軸索の成長円錐において exocytosis されと考えられている(5,7,47)。これまでに、exocytosis を制御する分子が、神経突起伸長に関わることがいくつか報告されている(8)。例えば、PC12 細胞において、膜融合に関わる exocyto 複合体を形成する sec10 の欠損変異体を用いて exocyto 複合体の形成を阻害すると、NGF 刺激によって誘導される突起形成が阻害された(64)。また、膜融合に関わる SNAP-25 を PC12 細胞に過剰発現させると、NGF 刺激によって形成された突起の数が増加し、突起の長さも長くなることが報告されている(65)。また、exocytosis に関与する Rho ファミリーの TC10 が、突起先端における膜小胞の融合と軸索の形成に関与することが報告されている(65)。以上のことから、軸索先端における膜融合が、突起の伸長に関わる可能性が示唆される。

本研究の解析より、Rab33a を発現抑制させた神経細胞において、軸索先端における膜融合頻度が低くなること、そして神経突起の伸長が抑制されることが分かった。このことは、Rab33a が軸索先端における膜成分の供給に関わる可能性を示唆している。しかし、Rab33a を発現抑制させた神経細胞では、軸索への synaptophysin 陽性の小胞の輸送が減少しているため、Rab33a が軸索先端における exocytosis の制御に直接関与するかは分からない。また、PC12 細胞において Rab3 や Rab27 は分泌小胞の膜融合に関与するが、Rab33a は膜融合に関与する可能性が低いことが報告されている(31)。本研究の実験結果からは、神経細胞の軸索内において Rab33a は synaptophysin 陽性な小胞との共局在が認められたが、軸索の成長円錐では、軸索ほど共局在が認められなかった（図 5B and C）。このことから、神経細胞において Rab33a が膜融合の制御に直接関与する可能性は低い

ものの、否定はできない。そのため、今後 Rab33a の成長円錐の膜表面における局在および膜融合に関与する sec6/8 といった分子との局在を免疫染色により観察する、もしくは Rab33a と相互作用する分子の探索し解析することで、Rab33a の分子作用メカニズムを解析することが望まれる。

Rab33a は軸索形成と伸長に関与する

これまでの解析から、Rab33a を発現抑制させた細胞では、神経突起の伸長が有意に抑制され、極性の形成に遅れが生じる結果が得られた。各神経突起の長さの定量的な解析からは、Rab33a を発現抑制させた細胞の一番長い神経突起において突起伸長が顕著に抑制されており、これは本来 Rab33a によって輸送される小胞が、発現抑制によって輸送されなかったためだと予測される。特に Rab33a は軸索に多く存在することから、一番長い神経突起において顕著な差がみられたと考えられる。そして、恒常活性化型変異体 Rab33a Q95L および Rab33a WT の過剰発現によって、過剰軸索を形成した細胞の割合が有意に増加した。これは Rab33a の過剰発現によって、synaptophysin 陽性の小胞の異所的な局在が増加したことからも、Rab33a の過剰発現によって、神経突起への膜小胞の供給が増加したためだと予測される。このことから、Rab33a が軸索の形成に関与する可能性が考えられる。

また、恒常活性化型変異体 Rab33a Q95L の過剰発現では、過剰軸索を形成した細胞が有意に増加したが、Rab33a 恒常不活性化型変異体の過剰発現では、軸索の形成に対しコントロール細胞と比較し、顕著な影響は認められなかった。これまでに、分子作用機構は明らかではないが、early endosome に局在する Rab10 の活性化や、recycling endosome に局在する Rab11 の活性化型によって軸索の伸長が促進されることが報告されている(16,22,23)。また、活性化型 Rab3 が不活性化型の Rab3 よりも優先的に KIF1A と KIF1B β によって軸索へ輸送されること(66)や、活性型の Rab27 が複合体を形成して、KIF5 によって軸索へと輸送されること(15)が報告されている。このため、Rab33a の活性化が軸索形成影響を与える可能性も考えられる。

興味深いことに、神経細胞において Rab33a WT を過剰発現させると、恒常活性化型変異体 Rab33a Q95L の過剰発現と同様に、過剰な軸索形成が誘導され、残りの Minor process における synaptophysin の存在量が増加するなど似た表現型を示した。また、HEK293T 細胞を用いて Rab33a に結合している GDP/GTP を評価した結果から、細胞内において Rab33a WT は恒常活性化型変異体 Rab33a Q95L とほぼ同程度、GTP 型として存在することを示唆する結果が得られた。以上のことから、Rab33a の活性化が軸索形成に重要である可能性と、細胞内で活性化型である GTP 型が優位に存在する可能性が見出された。細胞内において GTP 型

が優位に存在する G タンパク質は、いくつか報告があり、Rab では血小板顆粒の放出を制御する Rab27 の報告がある。血小板内において Rab27 の 70% は GTP 型として存在し、血小板顆粒放出後、不活性化型の GDP 型 Rab27 になることが分かった。このことから、Rab27 が細胞内で GTP 型が有意に存在することで、刺激によって誘導される顆粒小胞の放出に備えている可能性があるという報告している(67)。

以上の結果から、神経細胞において、Rab33a が突起伸長と軸索形成に関与し、Rab33a の活性化は軸索形成に重要である可能性も見出した。しかし、いかにして Rab33a の活性化が調節されているのか、また Rab33a と特異的なエフェクターとの相互作用による小胞輸送制御といった分子メカニズムは、今後のさらなる解析が期待される。

結論

これまで、endosome を介した膜成分のリサイクリングによる選択的な小胞輸送によって、軸索が形成されることが報告されていた。しかし、新たに合成された膜成分を、ゴルジ装置から神経突起の先端に輸送し、軸索の伸長に関与する Rab については、まだよくわかっていなかった。

本研究では、これまで機能未知であった Rab33a の神経細胞内における機能の解析の結果、Rab33a が神経細胞内において新たに合成された膜成分のゴルジ装置から軸索先端への順行性の小胞輸送を制御し、その結果、軸索先端における膜小胞の融合と軸索の伸長に関与する可能性を見出した (図 19)。そして、これまでに突起伸長に関与することが報告されている Rab8 や Rab10、Rab11 と Rab33a との共局在が認められなかったことから、Rab33a は神経突起形成に関わる新たな膜輸送経路の制御に関与する可能性があるといえる。

＜謝辞＞

5年間に渡る奈良先端科学技術大学院大学での経験と、関わってきた全ての方々に感謝申し上げます。特に、神経形態形成学研究室の稲垣直之准教授には5年間に渡り、実験技術や研究の進め方、研究者としての姿勢と研究に携わるものとしての責任感を御指導いただき、研究の機会も与えて頂きました。

分子情報薬理学研究室の伊東広教授には、アドバイザー委員としてだけでなく、同じ研究室として学ばせて頂いた際には、論理的な考え方といった研究を進めるにあたり必要となる要素だけでなく、貴重なご助言、指導をいただきました。分子情報薬理学研究室の水野憲一助教、多胡憲治助教には、研究を進める上での貴重な御助言、御討論、そして多くの励ましをいただきました。多胡憲治助教には、実験を行う上での技術的なサポートも頂き、研究に関することの多くを学ばせて頂きました。また、アドバイザー委員として塩坂貞夫教授、別所康全教授、川市正史教授には、鋭い御指摘や適切な御助言をいただき、これまで研究を進めていくことができました。この場を借りてお礼申し上げます。

神経形態形成学研究室の鳥山道則博士は、私が研究室に配属されてから今に至るまでの間、何もできなかった私に一から指導して下さいましたこと、感謝いたします。そして、稲垣研同期の柴田浩孝さん、久保祐亮さんと前野貴則さんをはじめとする後輩の皆さま、また融合棟2階におられる皆さまには、研究のディスカッションだけでなく、日々の生活を楽しく過ごさせて頂いたことに深く感謝します。

東北大学大学院生命科学研究科の福田光則教授には、Rab33a のコンストラクトと抗体を供与いただき、研究に対する助言も頂きました。生体機能計測学研究室の杉浦忠男准教授と松本将宜さんには、全反射顕微鏡による膜融合の観察に関して、ご指導とご協力いただきました。これらの先生方に、心からの感謝とお礼を申し上げます。

最後に、長期間の学生生活を励まし、支え続けてくれた家族、および楽しいこともつらいことも共に感じ、共に乗り越えてきた友人たちに心から感謝いたします。

< 参考論文 >

1. Winckler, B., and Mellman, I. (1999) *Neuron* **23**, 637-640
2. Craig, A. M., and Banker, G. (1994) *Annu Rev Neurosci* **17**, 267-310
3. Dotti, C. G., Sullivan, C. A., and Banker, G. A. (1988) *J. Neurosci.* **8**, 1454-1468
4. Goslin, K., and Banker, G. (1989) *J. Cell Biol.* **108**, 1507-1516
5. Pfenninger, K. H. (2009) *Nat Rev Neurosci* **10**, 251-261
6. Ye, B., Zhang, Y. W., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2006) *J Neurosci* **26**, 10631-10632
7. Futerman, A. H., and Banker, G. A. (1996) *Trends Neurosci.* **19**, 144-149
8. Tang, B. L. (2001) *J Neurochem* **79**, 923-930
9. Pfeffer, S. R. (2001) *Trends Cell Biol.* **11**, 487-491
10. Zerial, M., and McBride, H. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 107-117
11. Stenmark, H. (2009) *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 513-525
12. Ng, E. L., and Tang, B. L. (2008) *Brain Res Rev* **58**, 236-246
13. Huber, L. A., Dupree, P., and Dotti, C. G. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 918-924
14. Gerges, N. Z., Backos, D. S., and Esteban, J. A. (2004) *J Biol Chem* **279**,

15. Arimura, N., Kimura, T., Nakamuta, S., Taya, S., Funahashi, Y., Hattori, A., Shimada, A., Menager, C., Kawabata, S., Fujii, K., Iwamatsu, A., Segal, R. A., Fukuda, M., and Kaibuchi, K. (2009) *Dev Cell* **16**, 675-686
16. Ascano, M., Richmond, A., Borden, P., and Kuruvilla, R. (2009) *J Neurosci* **29**, 11674-11685
17. Huang, E. J., and Reichardt, L. F. (2003) *Annu Rev Biochem* **72**, 609-642
18. Zhang, Y., Moheban, D. B., Conway, B. R., Bhattacharyya, A., and Segal, R. A. (2000) *J Neurosci* **20**, 5671-5678
19. Grimes, M. L., Zhou, J., Beattie, E. C., Yuen, E. C., Hall, D. E., Valletta, J. S., Topp, K. S., LaVail, J. H., Bunnett, N. W., and Mobley, W. C. (1996) *J Neurosci* **16**, 7950-7964
20. Liu, J., Lamb, D., Chou, M. M., Liu, Y. J., and Li, G. (2007) *Molecular biology of the cell* **18**, 1375-1384
21. Saxena, S., Bucci, C., Weis, J., and Kruttgen, A. (2005) *J Neurosci* **25**, 10930-10940
22. Eva, R., Dassie, E., Caswell, P. T., Dick, G., ffrench-Constant, C., Norman, J. C., and Fawcett, J. W. (2010) *J Neurosci* **30**, 11654-11669
23. Wang, T., Liu, Y., Xu, X. H., Deng, C. Y., Wu, K. Y., Zhu, J., Fu, X. Q., He, M., and Luo, Z. G. (2011) *Dev Cell* **21**, 431-444
24. Cheng, E., Trombetta, S. E., Kovacs, D., Beech, R. D., Ariyan, S., Reyes-Mugica, M., McNiff, J. M., Narayan, D., Kluger, H. M., Picardo, M., and Halaban, R. (2006) *J Invest Dermatol* **126**, 2257-2271

25. Zheng, J. Y., Koda, T., Arimura, Y., Kishi, M., and Kakinuma, M. (1997) *Biochim Biophys Acta* **1351**, 47-50
26. Lee, M. S., Jun, D. H., Hwang, C. I., Park, S. S., Kang, J. J., Park, H. S., Kim, J., Kim, J. H., Seo, J. S., and Park, W. Y. (2006) *Stem Cells* **24**, 1946-1955
27. 佐田 忠行 (2008) 神経極性形成関連タンパク質 Singar1 と相互作用する分子の探索および機能解析, 修士論文
28. Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., and Price, P. J. (1993) *J Neurosci Res* **35**, 567-576
29. Fukuda, M. (2003) *J Biol Chem* **278**, 15373-15380
30. Kobayashi, T., Hori, Y., Ueda, N., Kajiho, H., Muraoka, S., Shima, F., Kataoka, T., Kontani, K., and Katada, T. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381**, 439-442
31. Tsuboi, T., and Fukuda, M. (2006) *J. Cell Sci.* **119**, 2196-2203
32. Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M., and Kaibuchi, K. (2001) *Nat. Neurosci.* **4**, 781-782
33. Fukuda, M. (2004) *Biochem J* **380**, 875-879
34. Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S. J., and Lagnado, L. (2006) *Neuron* **51**, 773-786
35. Linstedt, A. D., and Hauri, H. P. (1993) *Mol Biol Cell* **4**, 679-693
36. Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., Kreis, T. E., and Warren, G. (1995) *J Cell Biol* **131**, 1715-1726

37. Robinson, M. S. (1990) *J Cell Biol* **111**, 2319-2326
38. Luzio, J. P., Brake, B., Banting, G., Howell, K. E., Braghetta, P., and Stanley, K. K. (1990) *Biochem J* **270**, 97-102
39. Jahn, R., Schiebler, W., Ouimet, C., and Greengard, P. (1985) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 4137-4141
40. Wiedenmann, B., and Franke, W. W. (1985) *Cell* **41**, 1017-1028
41. Fletcher, T. L., Cameron, P., De Camilli, P., and Banker, G. (1991) *J Neurosci* **11**, 1617-1626
42. Nakata, T., Terada, S., and Hirokawa, N. (1998) *J Cell Biol* **140**, 659-674
43. Kaether, C., Skehel, P., and Dotti, C. G. (2000) *Mol Biol Cell* **11**, 1213-1224
44. Kelly, R. B. (1991) *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 654-660
45. Regnier-Vigouroux, A., Tooze, S. A., and Huttner, W. B. (1991) *EMBO J* **10**, 3589-3601
46. Miesenbock, G., De Angelis, D. A., and Rothman, J. E. (1998) *Nature* **394**, 192-195
47. Craig, A. M., Wyborski, R. J., and Banker, G. (1995) *Nature* **375**, 592-594
48. Tsuboi, T., and Rutter, G. A. (2003) *Curr Biol* **13**, 563-567
49. Zheng, J. Y., Koda, T., Fujiwara, T., Kishi, M., Ikehara, Y., and Kakinuma, M. (1998) *J Cell Sci* **111** (Pt 8), 1061-1069

50. Sanders, D. A. (1990) *Cell Growth Differ* **1**, 251-258
51. Thomas, L., Hartung, K., Langosch, D., Rehm, H., Bamberg, E., Franke, W. W., and Betz, H. (1988) *Science* **242**, 1050-1053
52. McMahon, H. T., Bolshakov, V. Y., Janz, R., Hammer, R. E., Siegelbaum, S. A., and Sudhof, T. C. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4760-4764
53. Phelan, P., and Gordon-Weeks, P. R. (1992) *The European journal of neuroscience* **4**, 1180-1190
54. De Camilli, P., and Jahn, R. (1990) *Annual review of physiology* **52**, 625-645
55. Van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B., and Mellman, I. (1992) *Cell* **70**, 729-740
56. Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., and Zerial, M. (2000) *J Cell Biol* **149**, 901-914
57. Deinhardt, K., Salinas, S., Verastegui, C., Watson, R., Worth, D., Hanrahan, S., Bucci, C., and Schiavo, G. (2006) *Neuron* **52**, 293-305
58. Babbey, C. M., Ahktar, N., Wang, E., Chen, C. C., Grant, B. D., and Dunn, K. W. (2006) *Molecular biology of the cell* **17**, 3156-3175
59. Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M. A., Goda, Y., Zerial, M., and Pfeffer, S. R. (1993) *The EMBO journal* **12**, 677-682
60. Hattula, K., Furuholm, J., Tikkanen, J., Tanhuanpaa, K., Laakkonen, P., and Peranen, J. (2006) *J. Cell Sci.* **119**, 4866-4877
61. Roland, J. T., Kenworthy, A. K., Peranen, J., Caplan, S., and Goldenring, J. R. (2007) *Mol Biol Cell* **18**, 2828-2837

- 62. Henry, L., and Sheff, D. R. (2008) *Mol Biol Cell* **19**, 2059-2068
- 63. Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M., and Parton, R. G. (1996) *J Cell Biol* **135**, 913-924
- 64. Vega, I. E., and Hsu, S. C. (2001) *J Neurosci* **21**, 3839-3848
- 65. Shirasu, M., Kimura, K., Kataoka, M., Takahashi, M., Okajima, S., Kawaguchi, S., Hirasawa, Y., Ide, C., and Mizoguchi, A. (2000) *Neurosci Res* **37**, 265-275
- 66. Niwa, S., Tanaka, Y., and Hirokawa, N. (2008) *Nat Cell Biol* **10**, 1269-1279
- 67. Kondo, H., Shirakawa, R., Higashi, T., Kawato, M., Fukuda, M., Kita, T., and Horiuchi, H. (2006) *J Biol Chem* **281**, 28657-28665

図表

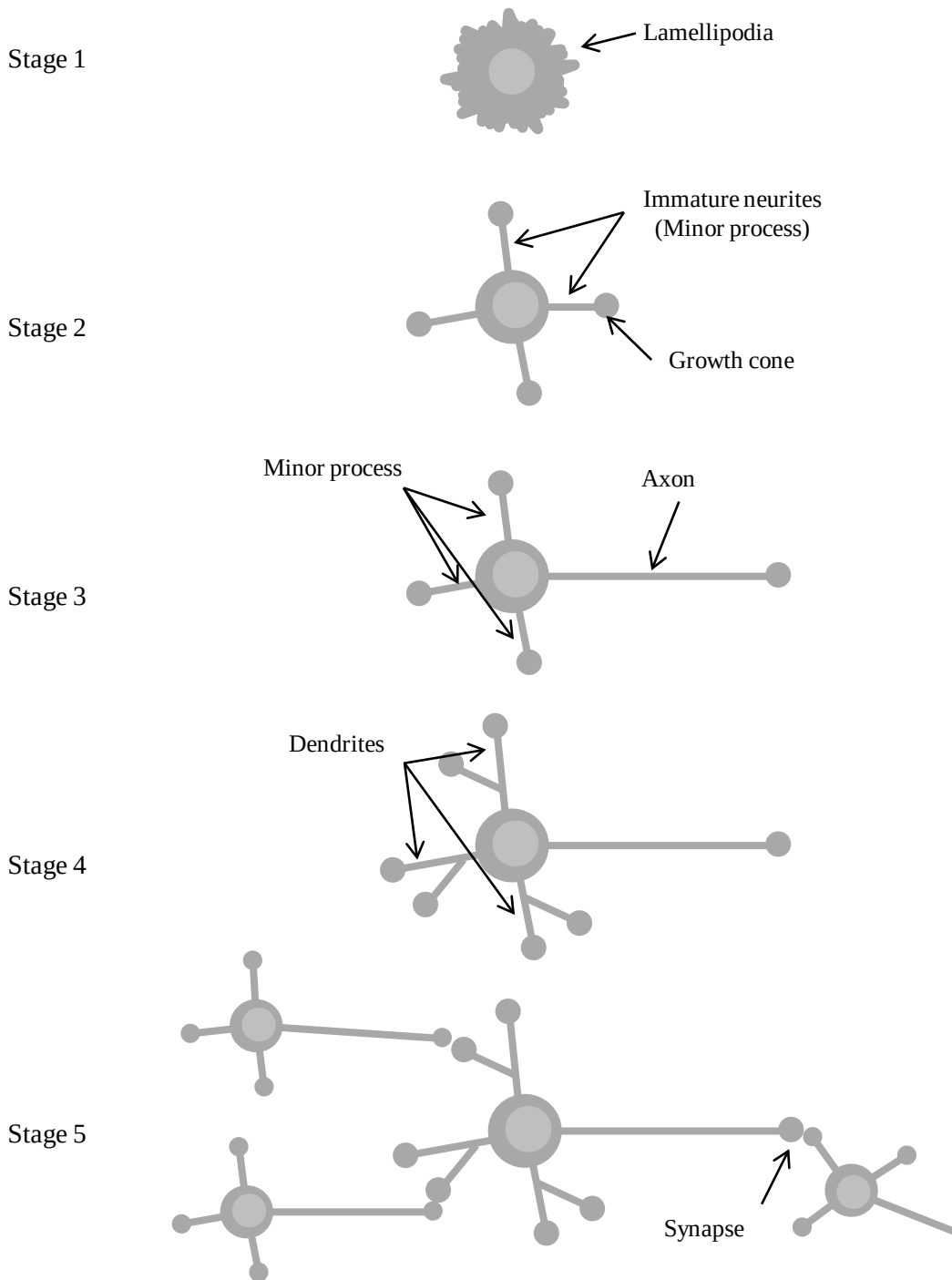


図1. 神経細胞の形態形成の過程

神経細胞は最初Lammillipodiaを形成し(Stage 1)、その後未分化なMinor processを形成する(Stage 2)。しばらくすると残りのMinor processの中の1本が急速に伸長し軸索へと分化する(Stage 3)。時間経過とともにMinor processは樹状突起へと分化し(Stage 4)、他の神経突起とシナプスを形成し成熟する(Stage 5)。

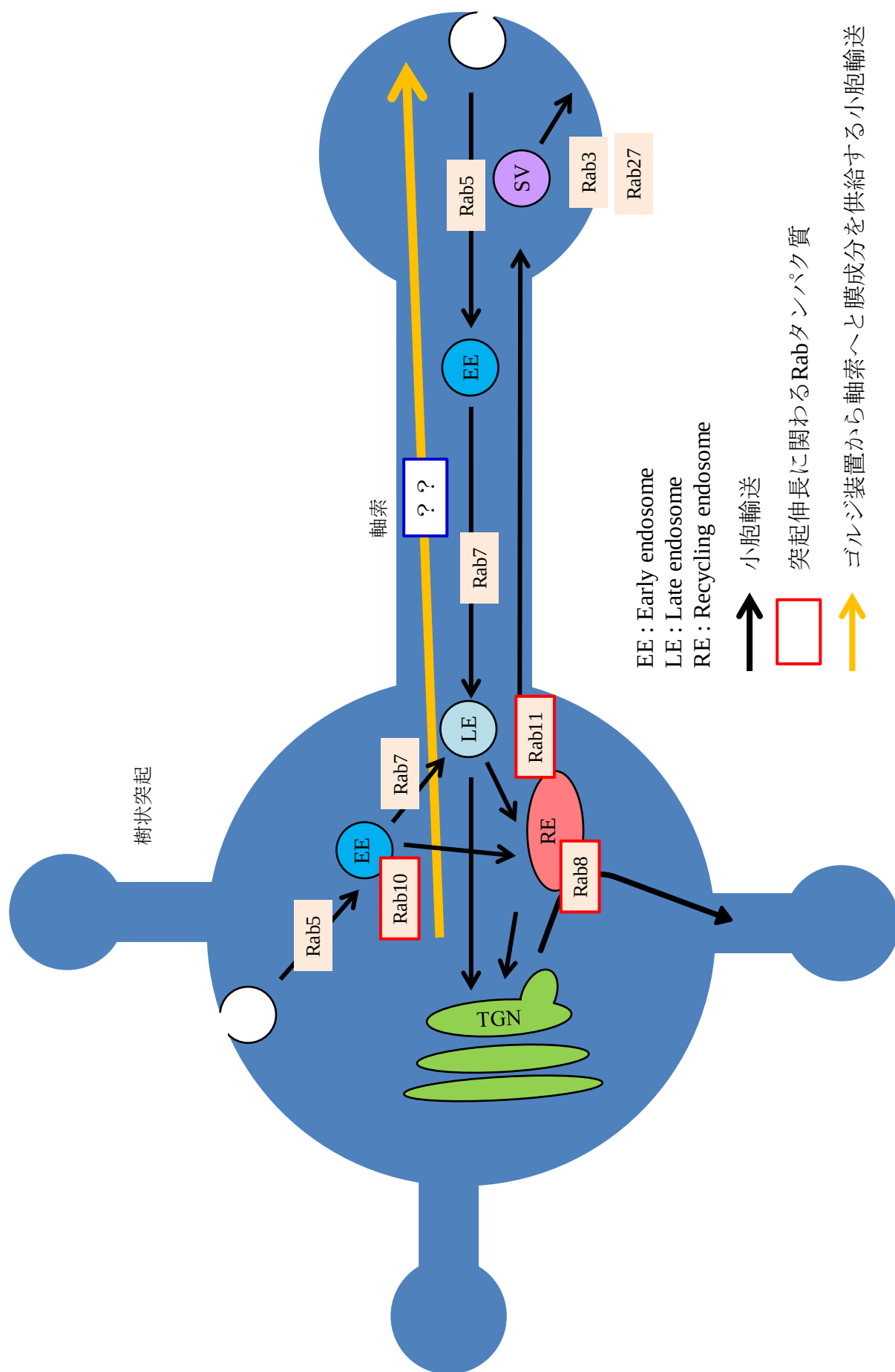


図2 神経細胞内におけるRab蛋白質が制御する小胞輸送

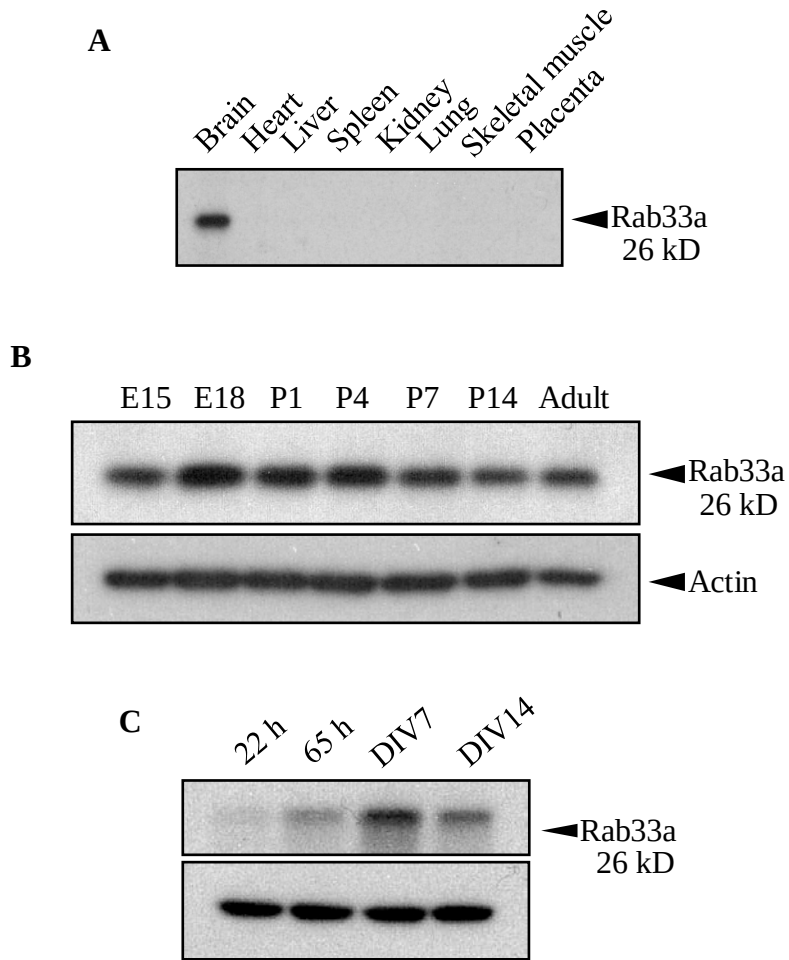


図3. Rab33aの発現解析

- (A) 成体ラット各臓器抽出タンパク質の抗Rab33aによるウェスタンブロット。
 (B) ラット脳における、発生に伴うRab33aの発現量の推移。
 (C) 培養時間に伴った、培養海馬神経細胞におけるRab33aの発現量の推移。

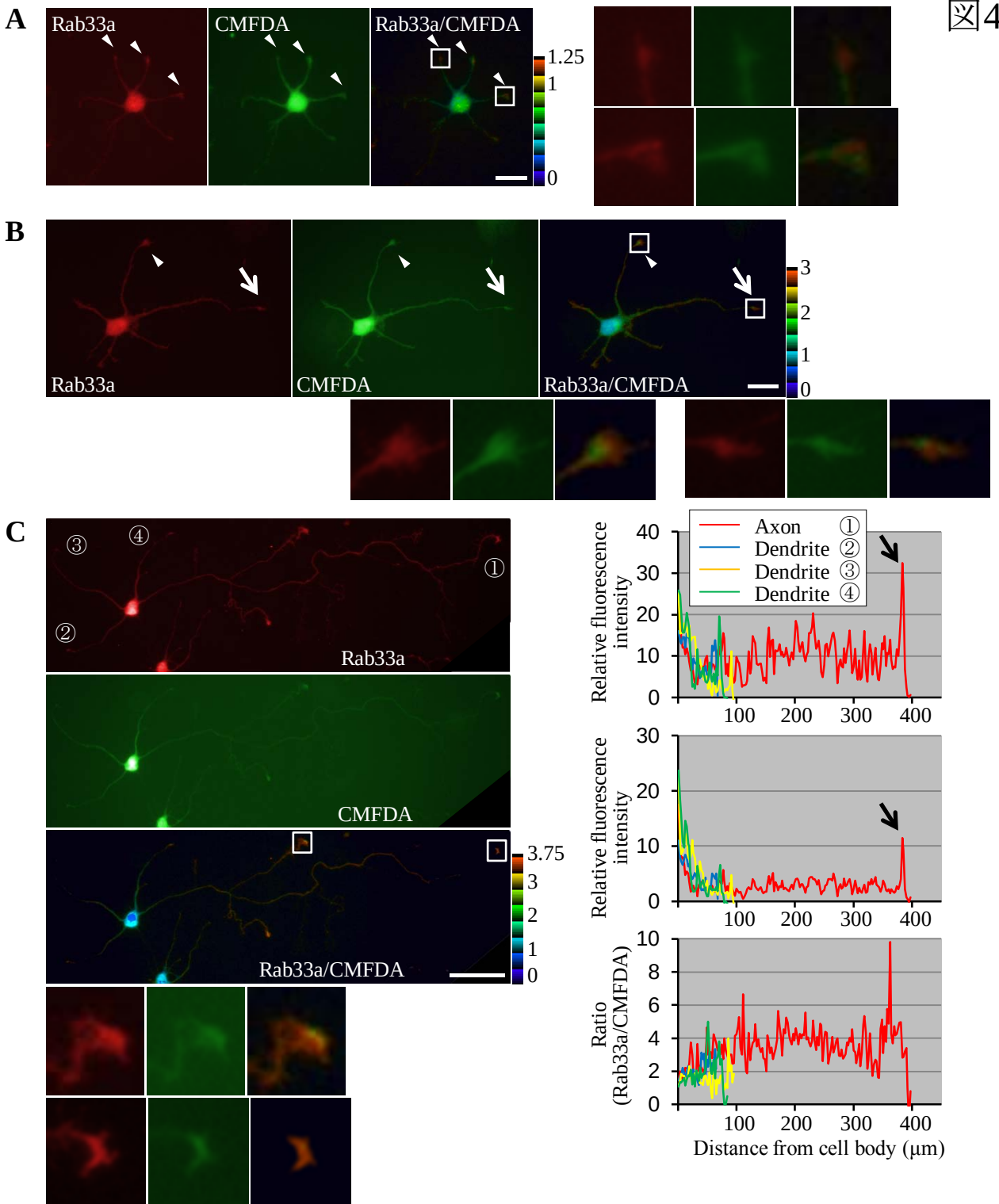


図4 培養海馬神経細胞におけるRab33aの細胞内分布

(A, B) Stage 2 (A) およびStage 3 (B) の培養海馬神経細胞におけるRab33aの細胞内分布 (赤) とvolume marker CMFDA (緑) による染色。Rab33aの相対的な濃度勾配 (抗Rab33a染色強度/CMFDA染色強度) を疑似カラーイメージで示した (左)。

(C) Stage 4の培養海馬神経細胞におけるRab33aの細胞内分布 (赤) とvolume marker CMFDA (緑) による染色。細胞体から神経突起先端 (番号で示す) までの染色強度を、各染色像の左にグラフとして示す。グラフの横軸には細胞体からの距離を、縦軸には各部位の染色強度を示した。下段では神経細胞内におけるRab33aの相対的な濃度勾配 (抗Rab33a抗体の染色強度/CMFDAの染色強度) を疑似カラーイメージとグラフで示した。矢印は軸索の成長円錐、矢頭はMinor procesの成長円錐を示す。Bars: (A and B) 20 μm; (C) 50 μm

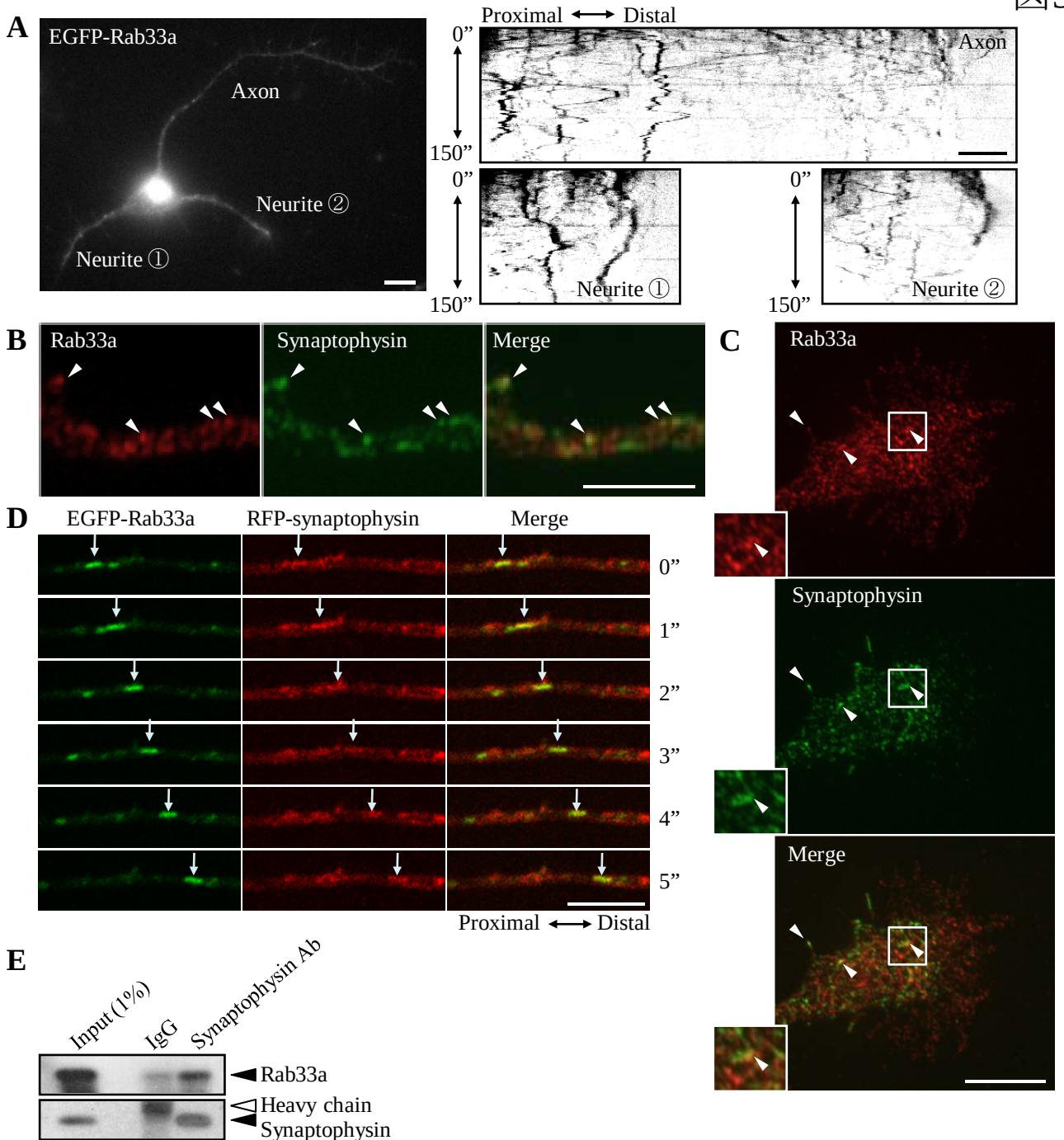


図5 培養海馬神経細胞におけるRab33aの細胞内挙動と細胞内局在

(A) Stage 3の培養海馬神経細胞におけるEGFP-Rab33aの細胞内挙動。細胞体から神経突起先端（番号で示す）までのタイムラプスイメージからキモグラフを作成した（左）。キモグラフの横軸は、細胞体（左側）から突起先端（右側）を示し、縦軸は時間経過（秒）を示している。タイムラプスイメージは1秒間おきに150秒間撮影した。

(B, C) 培養海馬神経細胞の軸索シャフト内（B）と成長円錐（C）におけるRab33a（赤）とsynaptophysin（緑）による染色。synaptophysinと抗Rab33a抗体の染色イメージをMergeしたものを左に示した。

(D) 共焦点顕微鏡を用いた、培養海馬神経細胞の軸索におけるEGFP-Rab33a（緑）とRFP-synaptophysin（赤）のタイムラプスイメージ。写真の横軸は、細胞体（左側）から突起先端（右側）を示し、縦軸は時間経過（秒）を示す。

(E) 培養海馬神経細胞を用いたオルガネラIPによって、Rab33aとsynaptophysinが同じ小胞上に存在するかを評価。Bars: (A) 10 μ m; (B, C and D) 5 μ m

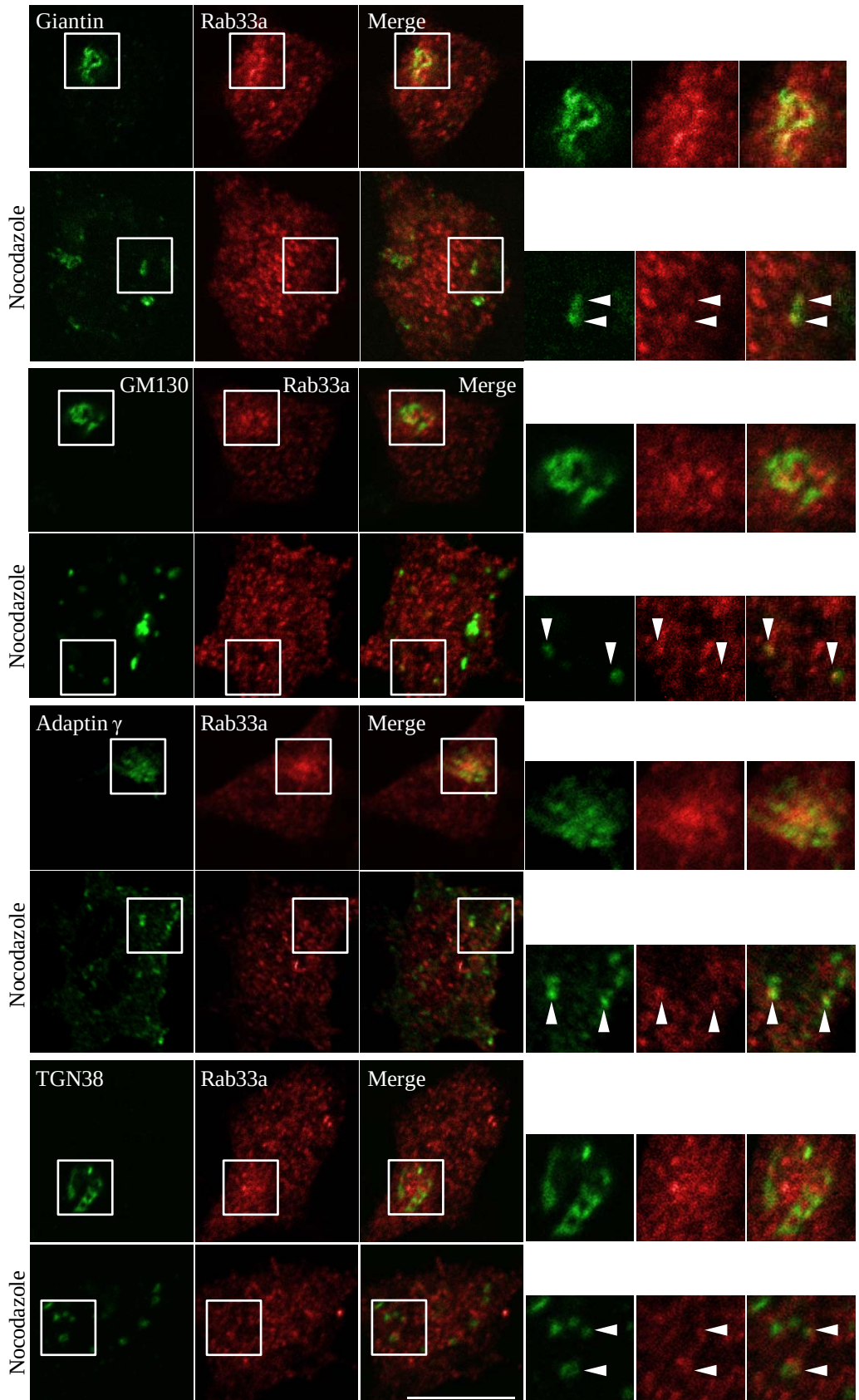


図6 培養海馬神経細胞におけるRab33aの細胞内局在
 培養海馬神経細胞をRab33a（赤）とゴルジ装置のマーカ（緑）による染色。
 DMSO（Control）および7 μM Nocodazole処理下での共局在を解析。ゴルジ装置の
 マーカと抗Rab33a抗体の染色イメージをMergeしたものを左に示した。白枠部分
 を拡大し、右図に示した。Bar: 5 μm

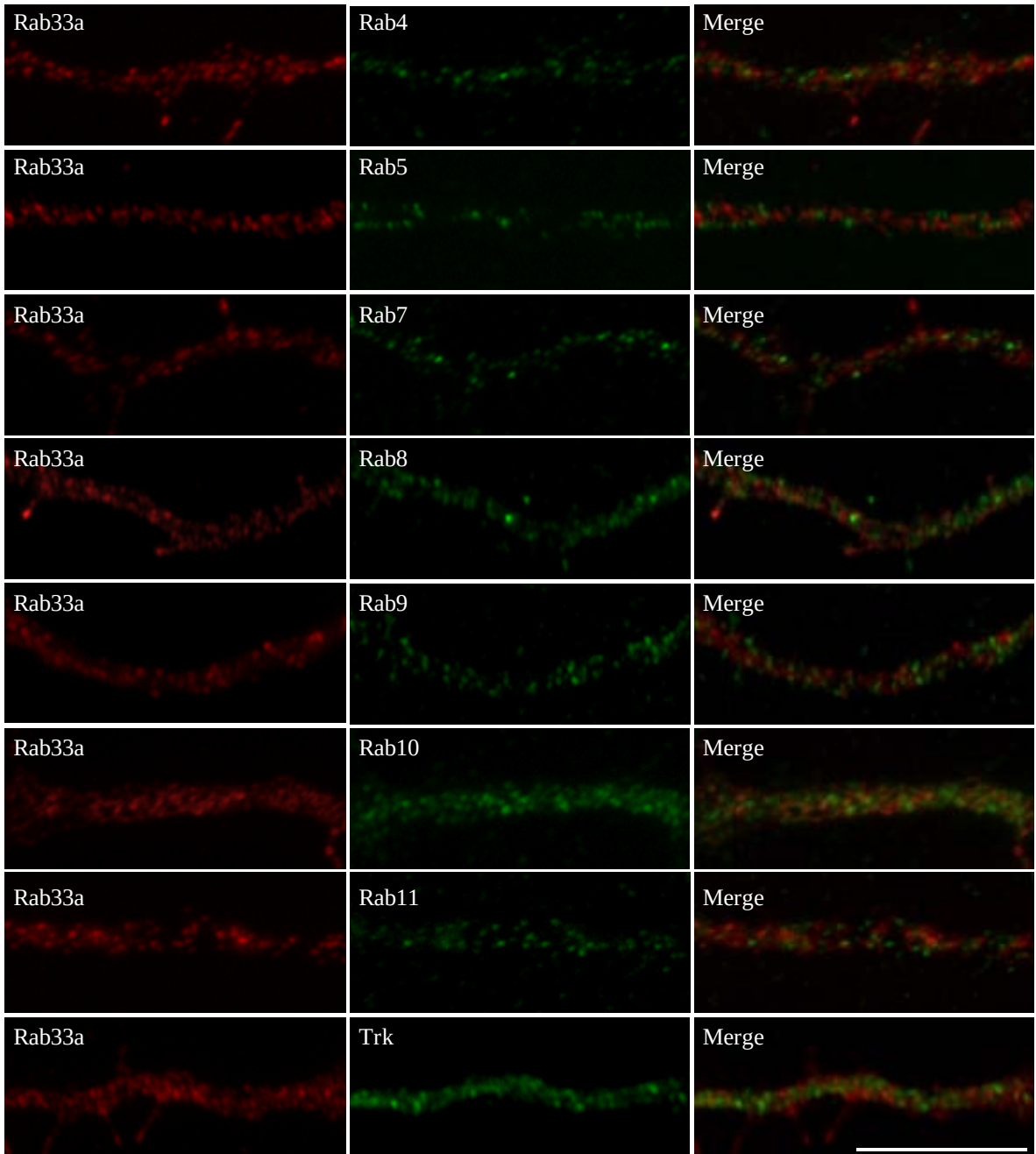


図7 培養海馬神経細胞の軸索シャフト内におけるRab33a細胞内局在
 培養海馬神経細胞におけるRab33a（赤）とearly endosome のマーカーとして
 Rab4とRab5、Rab10（緑）、late endosomeのマーカーとしてRab7とRab9、
 recycling endosomeのマーカーとしてRab8とRab11、そしてTrkによる染色。抗
 Rab33a抗体（赤）とそれぞれのRabおよびTrk（緑）の染色イメージをMergeし
 たものを左に示した。Bar: 10 μ m

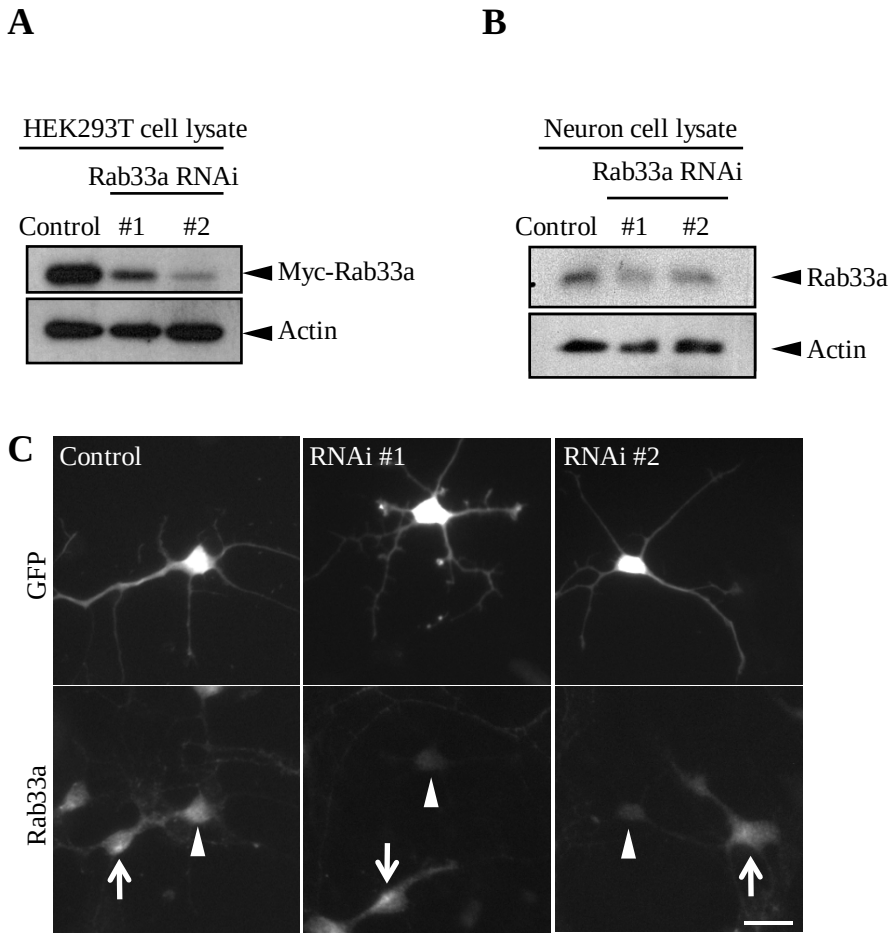


図8 Rab33aのmiRNAによる発現抑制

(A) HEK293T細胞にMyc-Rab33aとmiRNAを遺伝子導入し、Rab33aに対する発現抑制効果をウェスタンブロットによって評価。

(B) 神経細胞における、内在性Rab33aに対する発現抑制効果をウェスタンブロットによって評価。

(C) miRNAを遺伝子導入した培養海馬神経細胞における抗Rab33a抗体による免疫染色。

写真上：miRNAを遺伝子導入した細胞（GFP陽性）

写真下：抗Rab33a抗体による免疫染色像

矢頭は miRNAを遺伝子導入した細胞（矢頭）を、矢印は遺伝子導入されていない細胞を示す。Bar: 20 μ m

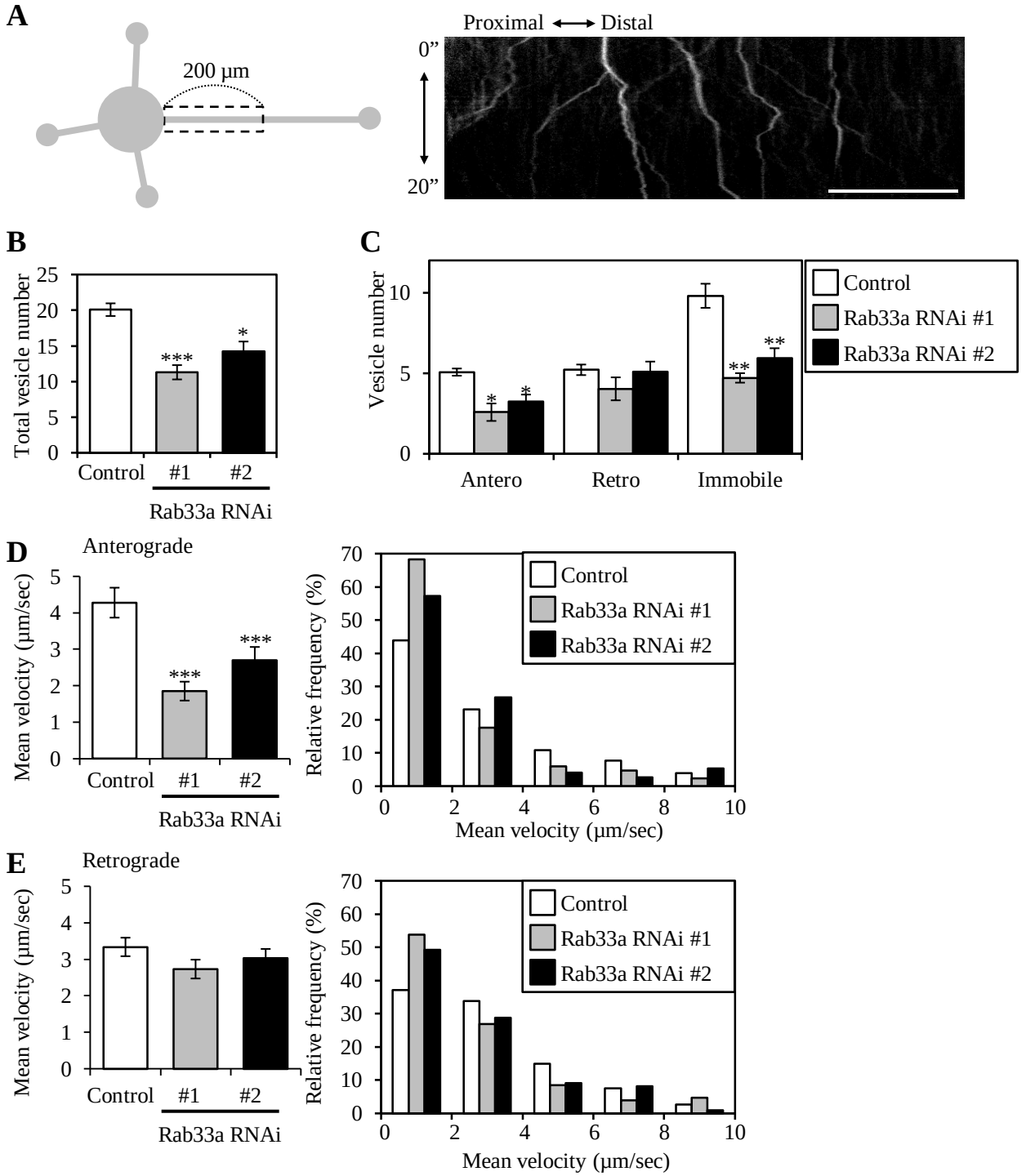


図9 Rab33a発現抑制によるRFP-synaptophysinの挙動解析

(A) RFP-synaptophysinを観察した領域を点線枠で示した(左)。左に示した領域(点線枠)におけるタイムラプスイメージからキモグラフを作成し(右)、RFP-synaptophysinの挙動解析を行った。キモグラフの横軸は、細胞体(左側)から突起先端側(右側)を示し、縦軸は時間経過(秒)を示している。タイムラプスイメージは0.1秒間おきに20秒間撮影した。Bar: 50 μm

(B) コントロール細胞とRab33aを発現抑制させた神経細胞の、Aで示した領域内で観察されたRFP-synaptophysinの数(1細胞あたりの数)。(* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$).

(C) コントロール細胞とRab33aを発現抑制させた神経細胞の、Aで観察された順行性、逆行性もしくは動かないRFP-synaptophysinの数(1細胞あたり)。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

(D) コントロール細胞とRab33aを発現抑制させた神経細胞において、順行性輸送されたRFP-synaptophysinの平均速度(左グラフ)とその分布(右ヒストグラム)。(*** $p < 0.005$)

(E) コントロール細胞とRab33aを発現抑制させた神経細胞において、逆行性輸送されたRFP-synaptophysinの平均速度(左グラフ)とその分布(右ヒストグラム)。

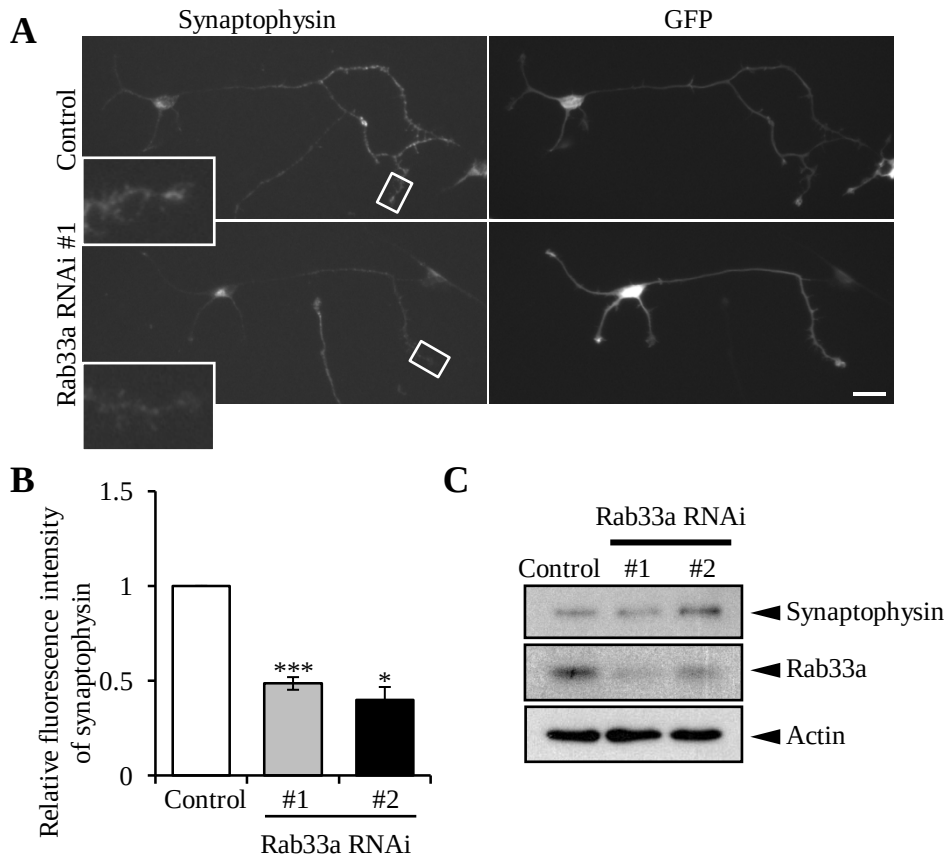


図10 Rab33a発現抑制による内在性synaptophysinの局在解析

(A) コントロール細胞とRab33aを発現抑制させた神経細胞の抗synaptophysin抗体による免疫染色。Bar: 20 μ m

写真右：miRNAを遺伝子導入した細胞（GFP陽性）。

写真左：抗synaptophysin抗体による免疫染色像。白枠部分を拡大し、図の左下に示した。

(B) コントロール細胞とRab33aを発現抑制させた神経細胞の軸索（Aで示す白四角内：軸索先端から20 μ mの領域）における、内在性synaptophysinの染色強度を定量し、コントロール細胞を1としてグラフに示した。（* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ ）

(C) Rab33aを発現抑制させた神経細胞において、synaptophysinの発現をウェスタンブロットにより検出。

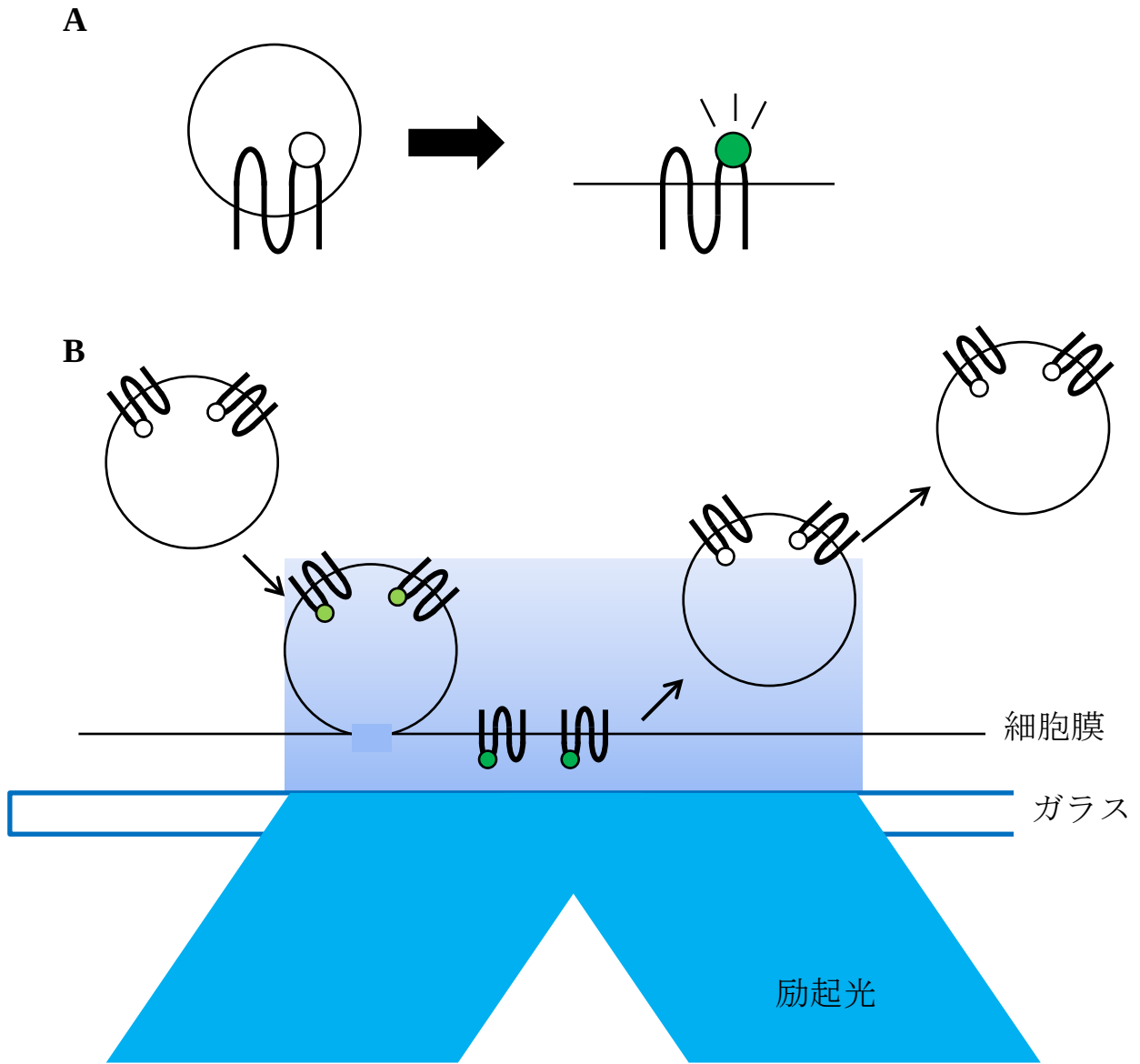


図11 pSypHyを用いた膜融合頻度の解析

(A) 細胞外ドメインにpHluorinを付加したsynaptophysin (sypHy)。細胞内では小胞内が、酸性条件下のため、GFPの蛍光は消光されるが、培養Medium等の中性条件下では、GFPの蛍光を発する。

(B) 細胞内でsypHyを含む小胞が、細胞膜へと融合すると、sypHyの蛍光が観察される。その後、細胞内へ移行すると、その蛍光は消光する。また、全反射顕微鏡(Total internal reflection fluorescent; TIRF)によって、膜近傍(約数百nm)の蛍光イメージのみを観察することができる。

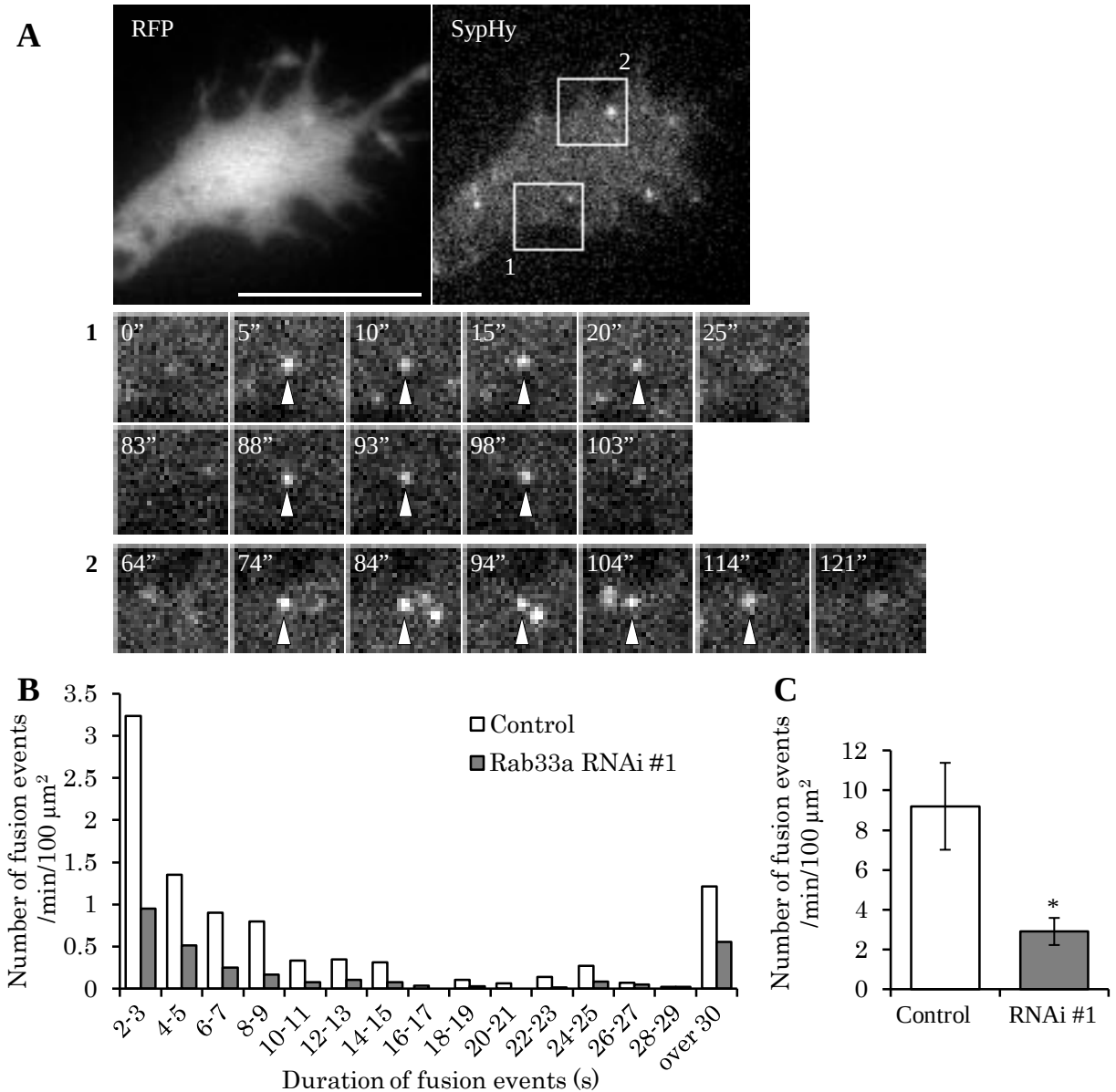


図12 synaptophysin陽性小胞の、神経細胞の軸索先端における膜融合頻度の解析

(A) RFPとsypHyを遺伝子導入した神経細胞の軸索の成長円錐におけるタイムラプスイメージ。全反射顕微鏡を用いたタイムラプスイメージは、1秒間おきに撮影した。左上の数字は時間経過を示す(秒)。Bar: 10 μm

(B) コントロール細胞とRab33aを発現抑制させた神経細胞の成長円錐において輝点が観察された時間とその数の分布。

(C) コントロール細胞とRab33aを発現抑制させた神経細胞の成長円錐における膜融合頻度(2秒以上観察できた輝点)を定量し、グラフに示した。

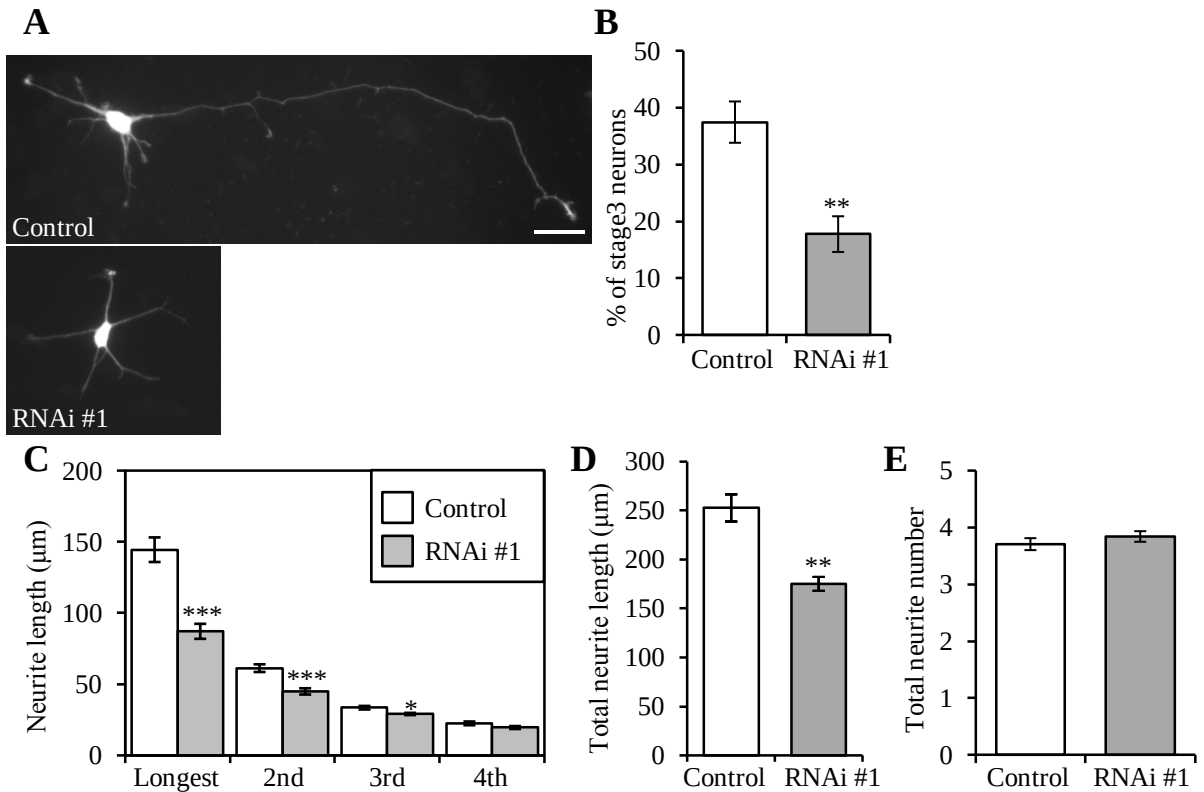


図13 Rab33a発現抑制による神経極性形成への影響

(A) コントロールのmiRNA (写真上) およびRab33aに対するmiRNA #1 (写真下) を遺伝子導入した神経細胞の形態。培養36時間後に固定し、抗Rab33a抗体を用いて免疫染色を行い、発現抑制がみとめられた細胞において解析を行った。

Bar: 20 μm

(B-E) コントロール細胞とRab33aを発現抑制させた神経細胞の定量的な形態の評価。

- (B) 極性形成を完了した細胞の割合
- (C) 1細胞あたりの各神経突起の長さ
- (D) 1細胞あたりの全神経突起の長さ
- (E) 1細胞あたりの神経突起の本数

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$)

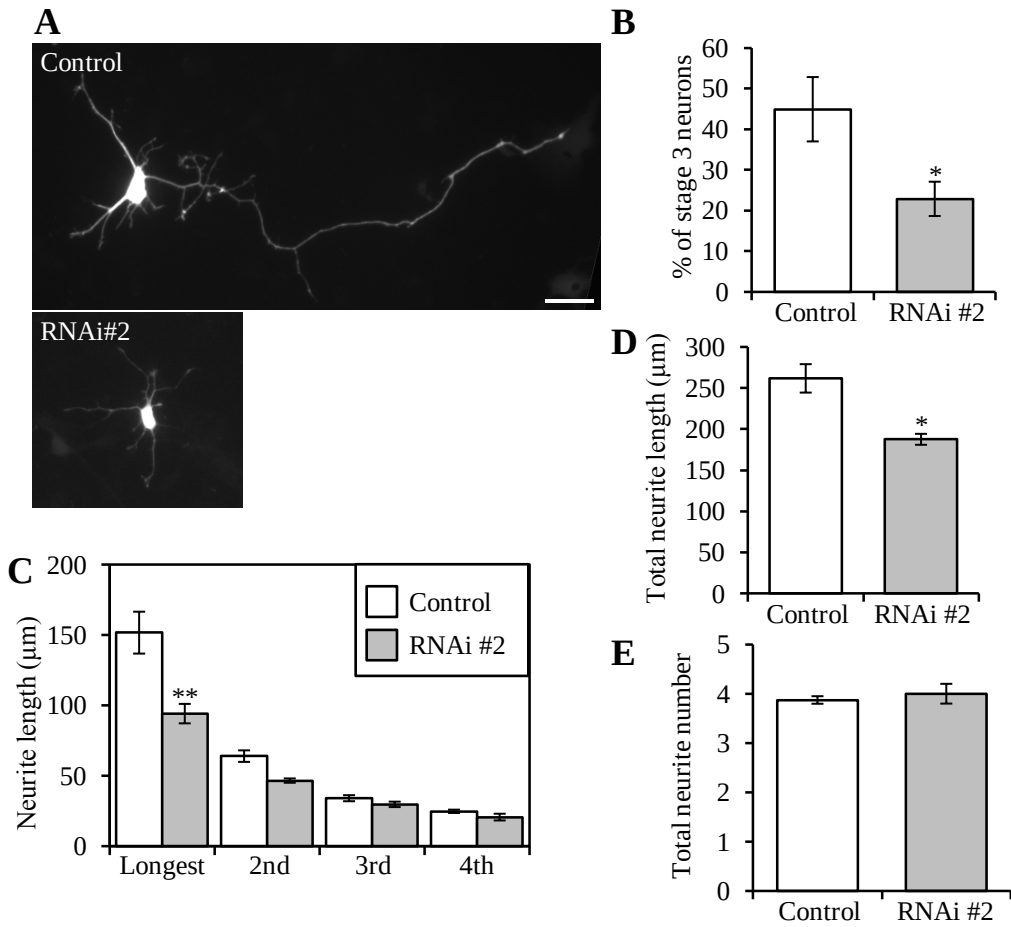


図14 Rab33a発現抑制による神経極性形成への影響（標的配列が異なる）

(A) コントロールのmiRNA（写真上）およびRab33aに対するmiRNA #2（写真下）を遺伝子導入した神経細胞の形態。培養36時間後に固定し、抗Rab33a抗体を用いて免疫染色を行い、発現抑制がみとめられた細胞において解析を行った。

Bar: 20 μ m

(B-E) コントロール細胞とRab33aを発現抑制させた神経細胞の定量的な形態の評価。

(B) 極性形成を完了した細胞の割合をグラフ化したものを示す。

(C) 1細胞あたりの各神経突起の長さ

(D) 1細胞あたりの全神経突起の長さ

(E) 1細胞あたりの神経突起の本数

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

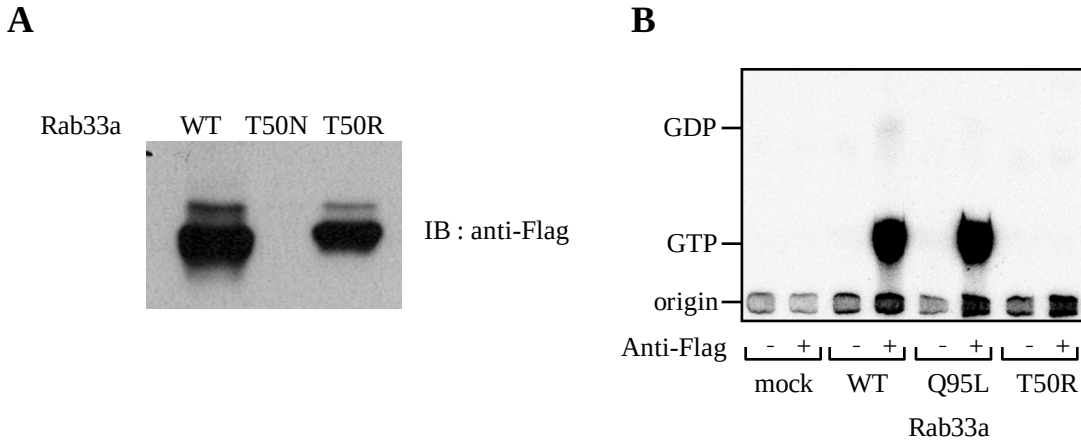


図15 Rab33aの変異体の評価

(A) HEK293T細胞にpCMV-Flag-Rab33a WT、T50N、T50Rを遺伝子導入し、その発現をウェスタンブロットによって検出。

T50Nの変異体は、ウェスタンによって発現が確認できなかった。

(B) HEK293T細胞にpCMV-Flag-Rab33a WT、活性化型変異体Rab33a Q95L、不活性化型変異体Rab33a T50Rを遺伝子導入し、結合しているGDP/GTPを検出。

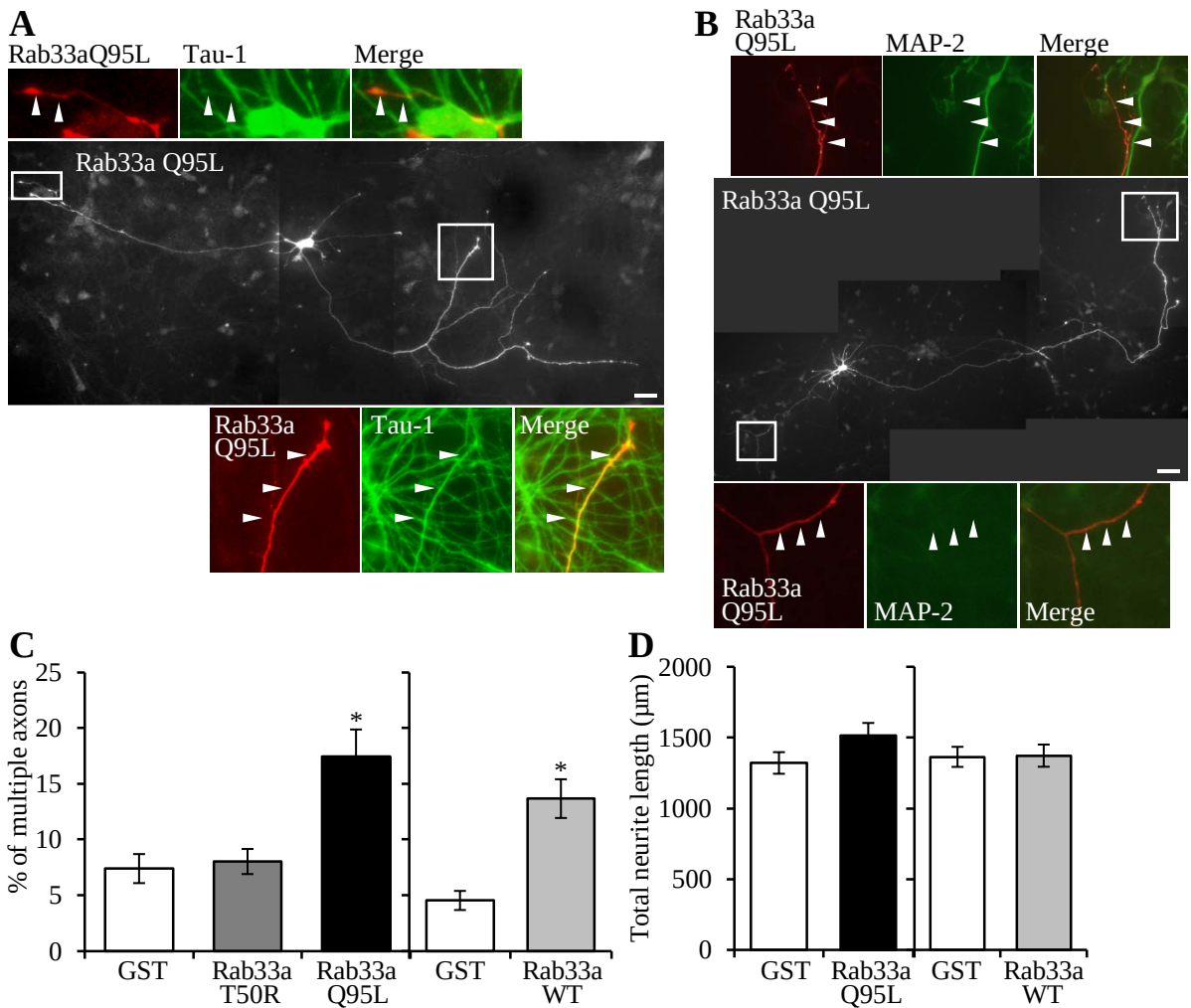


図16 Rab33aを過剰発現させた神経細胞の形態解析

(A) 恒常活性化型変異体Myc-Rab33a Q95Lを過剰発現させ、培養6日目に抗Myc抗体（赤）、軸索マーカであるTau-1抗体（緑）で免疫染色した。矢頭はTau-1によって染色された神経突起を示した。中央は抗Myc抗体染色像（モノクロ）。その中の白枠部分を拡大し、図の上下に示した。

(B) 恒常活性化型変異体Myc-Rab33a Q95Lを過剰発現させ、培養6日目に抗Myc抗体（赤）、樹状突起マーカである抗MAP-2抗体（緑）で免疫染色した。矢頭はMAP-2によって染色されなかった神経突起を示した。中央は抗Myc抗体染色像（モノクロ）。その中の白枠部分を拡大し、図の上下に示した。

（佐田修士論文データ）

(C) Myc-Rab33aもしくはコントロールとしてMyc-GSTの過剰発現により、過剰軸索を形成した神経細胞の割合。（* $p < 0.05$ ）

(D) Myc-Rab33aもしくはコントロールとしてMyc-GSTを過剰発現させた神経細胞の1細胞あたりの全神経突起の総和。Bars: (A and B) 50 μ m

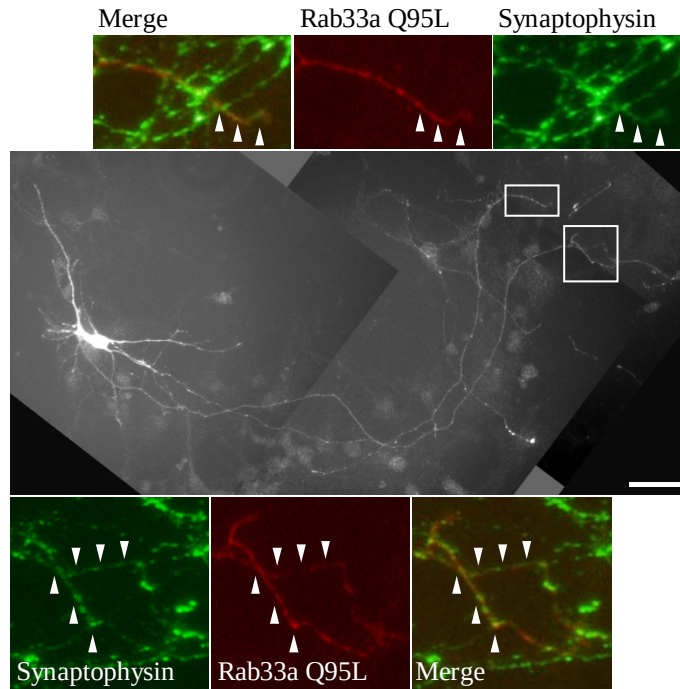


図17 Rab33a過剰発現による過剰軸索の形成と内在性synaptophysinの局在解析
恒常活性化型変異体Myc-Rab33a Q95Lを過剰発現させ、培養6日目に抗Myc抗体（赤）、抗synaptophysin抗体（緑）で免疫染色した。矢頭はsynaptophysinによって染色された神経突起を示した。中央は抗Myc抗体染色像（モノクロ）。その中の白枠部分を拡大し、図の上下に示した。Bar: 50 μ m
(佐田修士論文データ)

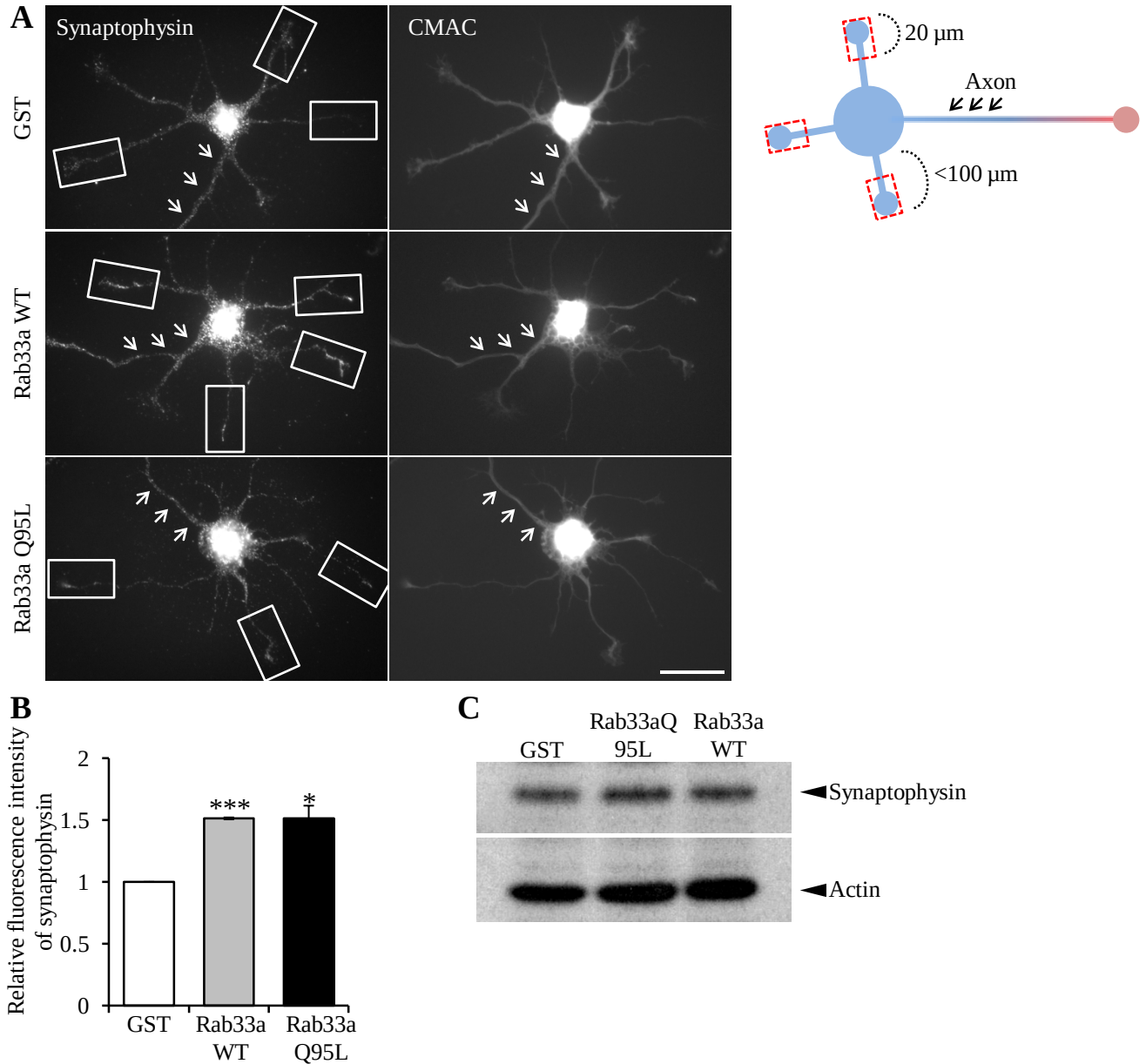


図18 Rab33aを過剰発現させた神経細胞における内在性synaptophysinの局在解析

(A) 恒常活性化型変異体Myc-Rab33a Q95LとMyc-Rab33a WTと、コントロールとしてMyc-GSTを過剰発現させ、培養3日目に免疫染色した。Bar: 20 μ m

写真右：抗Myc抗体染色陽性細胞におけるvolume marker CMAC染色像

写真左：抗synaptophysin抗体による免疫染色像

矢印は軸索を示し、白枠は内在性synaptophysinの染色強度を測定した領域を示す。

(B) 恒常活性化型変異体Myc-Rab33a Q95LとMyc-Rab33a WTと、コントロールとしてMyc-GSTを過剰発現させた神経細胞の、右図で示すような100 μ m以下の短い神経突起の先端 20 μ m（左：白枠内、右：赤枠内）の領域における内在性synaptophysinの染色強度を定量した。

染色強度は、コントロール細胞を1としてグラフに示した。(* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$)

(C) Rab33aを過剰発現させた神経細胞における、synaptophysinの発現をウェスタンブロットにより検出。

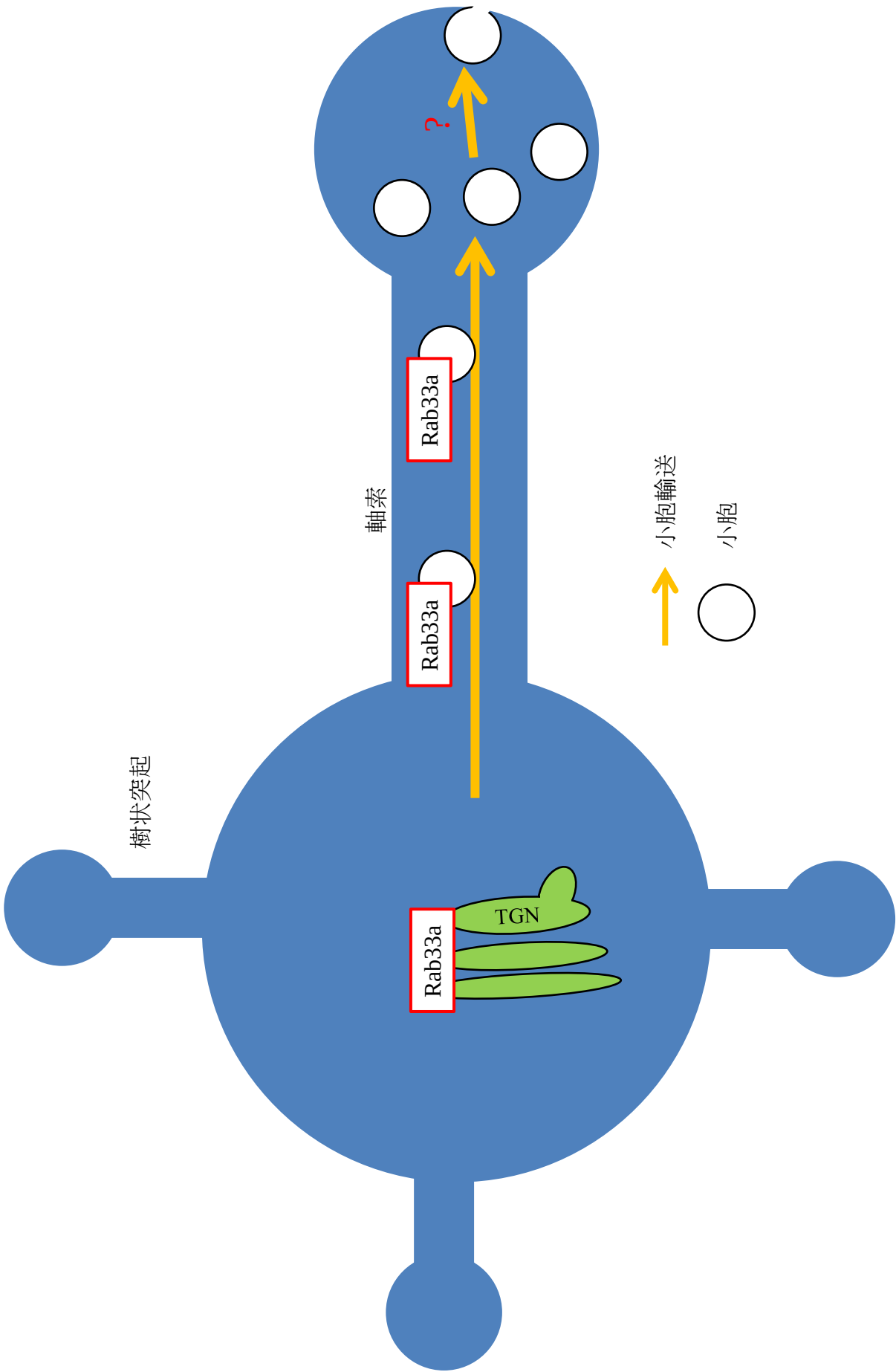


図19 神経細胞内におけるRab33aが制御する小胞輸送