

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07928

研究課題名(和文) 神経突起ガイダンスシグナルのインテグレーションにおけるG蛋白質の機能の解明

研究課題名(英文) Studies of roles of G proteins in integration of axon guidance signaling

研究代表者

根岸 学 (Negishi, Manabu)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：60201696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 神経突起形成に重要な役割を果たしている低分子量G蛋白質R-Rasサブファミリー、R-Ras、M-Ras、TC21の情報伝達機構を分子レベルで明らかにするため、R-Rasサブファミリーの下流のエフェクター分子の探索とその作用機構について研究を進めた。TC21の神経細胞の形態形成における機能を解析し、TC21がスパイン形成時に強く発現しており、スパイン形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。一方、R-Rasサブファミリーの上流の情報伝達経路について解析し、RasGRF1がBDNFの刺激でR-Rasを活性化し、神経軸索の伸長と分枝化の促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： R-Ras subfamily small GTPases have essential roles in multiple phases of developments of neurons. We have examined the roles of TC21, a member of R-Ras subfamily, and we found that TC21 was specifically expressed in spines and promoted spine maturation through afadin, a downstream effector of TC21. We also examined the upstream of R-Ras for R-Ras-mediated axon outgrowth, and we found that RasGRF1 was a GEF for R-Ras and BDNF activated R-Ras through RasGRF1, promoting axon outgrowth.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Ras Rho G protein 神経 軸索 樹状突起 スパイン ガイダンス

1. 研究開始当初の背景

記憶や学習など複雑な高次脳機能を可能にしているのは、神経細胞がその特徴的な構造である神経突起を伸ばし、互いに接着することにより形成される複雑な神経回路による。神経回路形成は、神経細胞が軸索と樹状突起を伸ばし、目的のターゲット細胞に到達してシナプスを形成して、複雑なネットワーク回路を形成して完成する。この複雑な神経回路網の基本構造は正確で厳密に作成されるが、それは神経細胞より伸長した軸索を正確にターゲット細胞に誘導する軸索ガイダンス分子の誘導作用による。近年、神経突起の伸長や退縮に低分子量 G 蛋白質 Ras ファミリーや Rho ファミリーが重要な役割を果たしていることがわかってきた。我々は、機能の不明であった Rho ファミリー、RhoG の特異的エフェクターとして Elmo を同定し、RhoG-Elmo-Dock180 という Rac を活性化する新しい経路を見だし、この経路が神経突起伸長を引き起こすことを明らかにした。しかし、軸索ガイダンス分子の作用に Rho ファミリーが関わることは示されてきたが、その詳細な分子機構はまだ不明である。我々は、Sema4D の受容体、Plexin-B1 の細胞内領域が Ras ファミリーの 1 つ、R-Ras に対する GAP を直接コードしており、細胞膜を進展させる R-Ras の活性を抑制することにより軸索の反発作用を引き起こすことを明らかにし、Plexin-B1 という受容体が G 蛋白質の GAP であるという今までに報告のない全く新しい情報伝達機構であることを発見した。また、M-Ras の新奇エフェクターとしてアクチン重合促進する Lamellipodin (Lpd) を同定し、Sema4D によるアクチン骨格系の制御機構を明らかにした。このように、様々なガイダンス分子による軸索ガイダンス、樹状突起形成に R-Ras サブファミリー、Rho ファミリー G 蛋白質が重要な役割を果たしていることが明らかにされてきたが、様々なガイダンスシグナルがどのように神経細胞内でインテグレートされ、シグナルの統合にこれら G 蛋白質がどのように関わるのか、その調節機構の詳細についてはまだまだ不明な点が多く残っている。

2. 研究の目的

本研究は、反発性の sema/plexin や ephrin/Eph、誘因性の netrin/DCC を代表とした、それぞれの神経突起ガイダンス分子のシグナル伝達における、R-Ras サブファミリー及び Rho ファミリーの個々の G 蛋白質の機能を解析し、それぞれのガイダンス分子のシグナルがどのような機構でインテグレートされ、R-Ras、Rho ファミリー G 蛋白質の活性制御に繋がり、さらに、それら G 蛋白質の密接なコミュニケーションの神経突起ガイダンスにおいて果たす役割を分子レベル細胞レベルで体系的に明らかにし、

ガイダンスにおける R-Ras 及び Rho ファミリーの機能を統合的に理解し、体系づけていくことを目的とし、期間内に明らかにしていく。そして、神経回路形成に必須な神経突起ガイダンス分子の受容体のガイダンス作用の情報伝達機構を分子レベルで解析し、ガイダンス分子により精密で正確に形成される機能的な神経回路網の成立過程の基本となる分子基盤の解明につなげていく。

3. 研究の方法

本研究では、R-Ras 及び Rho ファミリー G 蛋白質の神経突起形成における役割と、神経突起ガイダンスシグナルのインテグレーションにおけるこれら G 蛋白質の役割の解明を目指し、1) sema や netrin などの神経突起ガイダンスシグナルによる R-Ras ファミリーの活性制御と G 蛋白質による突起形成調節の分子シグナルカスケード経路の解析、2) ephrin/Eph による軸索ガイダンスにおける Rho ファミリーの活性制御と G 蛋白質による突起形成調節の分子シグナルカスケード経路の解析、3) R-Ras ファミリーによる Rho ファミリー活性調節とその突起形成調節の情報伝達経路の解析を行い、神経突起形成における様々なガイダンスシグナル伝達経路において、それらのシグナルのインテグレーションに関わる G 蛋白質の役割を統合的に解明する。

4. 研究成果

神経突起形成に重要な役割を果たしている R-Ras ファミリーの情報伝達機構を分子レベルで明らかにするため、R-Ras ファミリーの下流のエフェクター分子の探索とその作用機構について研究した。R-Ras は軸索の分枝化を促進するが、この作用は活性化型 R-Ras が結合するエフェクター分子、afadin を介することを明らかにしてきた。afadin には、選択的スプライシングにより生成される 2 種類のアイソフォーム、s-afadin と l-afadin が存在する。そこで、これら 2 種類のアイソフォームの R-Ras の下流での機能の役割について解析した。海馬初代培養神経細胞で、軸索の分枝化が盛んな培養初期では、l-afadin の発現が主であったが、3 日以降の軸索の分枝化が減弱する時期で s-afadin の発現が増加してきた。神経細胞で、s-afadin 過剰発現させると R-Ras による軸索の分枝化が抑制され、s-afadin の発現を特異的に抑制する shRNA を発現させると、R-Ras による分枝化が促進された。また、発現培養細胞で、s-afadin は R-Ras による l-afadin の細胞質から細胞膜への移行を阻害した。これらのことから、s-afadin は l-afadin のドミナントネガティブ体として働くアイソフォームで、R-Ras による l-afadin の細胞膜への移行を阻害することにより、R-Ras-l-afadin による軸索の分枝形成を抑

制的に制御していることが考えられる。また、神経細胞の軸索形成において、軸索の分枝化の時期と2つのafadinアイソフォームの発現パターンが一致しており、s-afadinの発現の変化で、分枝化が調節されていることが示唆される。神経突起形成に重要な役割を果たしている低分子量G蛋白質RasファミリーのサブグループであるR-Rasサブファミリー、R-Ras、M-Ras、TC21の情報伝達機構を分子レベルで明らかにするため、R-Rasサブファミリーの下流のエフェクター分子の探索とその作用機構について研究を進めた。これまでに、R-Rasは神経軸索に局在し、PI3キナーゼ経路を介して軸索の伸長、分枝化を促進すること、M-Rasは樹状突起に局在し、MAPキナーゼ経路を介して軸索の伸長を促進することを明らかにしてきた。一方、TC21に関しては、その神経細胞における機能はほとんど不明であった。その神経細胞の形態形成における機能を解析し、TC21がスパイン形成時に強く発現して着ることを発見した。また、TC21の強制発現や、ノックダウン実験により、TC21がスパイン形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、TC21によるスパイン形成促進作用における下流のエフェクター分子を解析した結果、Fアクチン結合蛋白質であるafadinにTC21活性型が特異的に結合し、TC21は活性化されると、afadinを細胞質から細胞膜に移行させ、細胞膜上でフィロポディア形成を促進し、最終的にスパイン形成を促進することがわかった。これらのことから、3つのR-RasサブファミリーG蛋白質、R-Ras、M-Ras、TC21はそれぞれ軸索、樹状突起、スパインと異なる領域に局在し、異なる神経突起形成に関わることを明らかにした。一方、R-Rasサブファミリーの上流の情報伝達経路については全く不明であった。そこで、R-Rasによる神経軸索の伸長作用の上流の経路を探索した。RasファミリーのGたんぱく質を活性化するGEFには様々な分子が知られているので、それらの分子で神経細胞に発現しているものをリストアップし、可能性のあるRasファミリーGEFの関与をスクリーニングした結果、R-Rasを活性化できるGEFの1つであるRasGRF1が神経軸索成長因子であるBDNFの刺激でR-Rasを活性化し、神経軸索の伸長と分枝化の促進を行なっていることを明らかにした。また、BDNFの受容体、TrkBはcAMPを上昇させて、RasGRF1のリン酸化により活性化することを明らかにした。これらのことから、R-Rasの上流と下流の伝達経路が明らかとなり、その全体像が明確になった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- Hamaoka, Y., Negishi, M., and Katoh, H. EphA2 is a key effector of the MEK/ERK/RSK pathway regulating glioblastoma cell proliferation. *Cell. Signal.* 28, 937-945 (2016) <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.04.009>
- Okuyama, Y., Umeda, K., Negishi, M., and Katoh, H. Tyrosine phosphorylation of SGEF regulates RhoG activity and cell migration. *PLOS ONE* 11, e159617 (2016) [doi:10.1371/journal.pone.0159617](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159617)
- Goji, T., Takahara, K., Negishi, M., and Katoh, H. Cystine uptake through xCT triggers glioblastoma cell death under glucose deprivation. *J. Biol. Chem.* 292, 19712-19732 (2017) DOI 10.1074/jbc.M117.814392
- Hamaoka, Y., Negishi, M., and Katoh, H. Tyrosine kinase activity of EphA2 promotes its S897 phosphorylation and glioblastoma cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 499, 920-926 (2018) <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.020>

[学会発表] (計10件)

- 濱岡裕穂、根岸学、加藤裕教
RSKによるEphA2のリン酸化とグリオブラストーマ細胞の増殖制御
第63回日本生化学会近畿支部例会
2016年5月21日 神戸薬科大学
濱岡裕穂、根岸学、加藤裕教
EphA2によるグリオブラストーマ細胞増殖制御に関わる分子の探索
第89回日本生化学会大会 2016年9月25日 仙台国際センター
郷司剛央、根岸学、加藤裕教
グルコース欠乏によるグリオブラストーマの細胞死誘導機構の解明
第89回日本生化学会大会 2016年9月26日 仙台国際センター
K. Umeda, H. Katoh, M. Negishi
BDNF promotes the formation of axonal morphology through Ras-GRF1-mediated R-Ras activation. *British Neuroscience Association* 2017, 2017 April 10-13, Birmingham UK
- 梅田健太郎、加藤裕教、根岸学
神経細胞の軸索の形態制御における、R-Rasの上流シグナルの解明

第 64 回日本生化学会近畿支部例会

2017 年 5 月 27 日 大阪大学

K. Umeda, H. Katoh, M. Negishi

Molecular mechanisms underlying
the regulation of R-Ras activation
and R-Ras-mediated axon branching
formation in primary cultured
cortical neurons.

Society for Neuroscience 2017, 2017

Nov 11-15, Washington, DC, U.S.A.

濱岡裕穂、根岸学、加藤裕教

EphA2 のチロシンキナーゼ活性によ
る S897 リン酸化の制御

2017 年度生命科学系学会合同年次大
会 2017 年 12 月 6 日 神戸国際展示
場

梅田健太郎、加藤裕教、根岸学

脳由来神経栄養因子 (BDNF) による
R-Ras の活性化と軸索形態制御の分
子機構

2017 年度生命科学系学会合同年次大
会 2017 年 12 月 7 日 神戸国際展示
場

遠山萌、濱岡裕穂、加藤裕教、根岸学
神経膠芽腫における EphA3 受容体の
機能解析

2017 年度生命科学系学会合同年次大
会 2017 年 12 月 8,9 日 神戸国際展
示場

山本佳央理、根岸学、加藤裕教

SGFF による細胞運動の制御と
Scribble の抑制作用

2017 年度生命科学系学会合同年次大
会 2017 年 12 月 8,9 日 神戸国際展
示場

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.negishi.lif.kyoto-u.ac.jp/j/toppu.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者 根岸学 (NEGISHI MANABU)
京都大学・生命科学研究所・教授 研究者番
号:60201696