

平成 21年 4月 27日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007 ～ 2008  
 課題番号：19770174  
 研究課題名 (和文) セマフォリンシグナル多様性獲得の分子メカニズムの解明  
 研究課題名 (英文) Investigation of molecular mechanisms of semaphorin signaling  
 研究代表者  
 竹ヶ原 宜子 (TAKEGAHARA NORIKO)  
 大阪大学・微生物病研究所・助教  
 研究者番号：10444522

研究成果の概要:神経ガイダンス因子であるセマフォリン分子群は、近年、生体内において多彩な活性を有することが明らかとなっている。本研究ではセマフォリン分子群の主要な受容体分子 Plexin-A1 に着目し、その下流のシグナル伝達分子の機能解析を行うことにより、セマフォリン分子の有する多様な生物活性の機序の解明を試みた。細胞骨格の制御に関わる分子・Rac の活性化因子である FARP2 が plexin-A1 に会合し、破骨細胞の分化に関与することが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野:生物学

科研費の分科・細目:細胞生物学・細胞生物学

キーワード:細胞内・細胞間情報伝達、セマフォリン、破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

セマフォリンファミリーは従来神経ガイダンス因子として同定されてきた分子群であるが、近年、

器官形成や血管新生、脈管形成、癌の進行、免疫応答などへの関与も報告され、生体内において多彩な活性を有することが明らかとなっている。

これまでに申請者はセマフォリン分子群の主要な受容体分子である plexin-A1 が心臓の初期発生に関与することや、樹状細胞や破骨細胞に高発現し、免疫応答や骨形成・骨代謝に関与することを報告している。

Plexin-A1 の下流のシグナル伝達経路については、これまで神経細胞を用いた実験系により small G protein である Rac および Rac の活性化因子 (GEF) である FARP2 の Plexin-A1 細胞内領域への会合や、活性酸素種 (ROS) の産生に関与する flavoprotein monooxygenase である MICAL の会合などが報告されている。しかしながら、それぞれのシグナル伝達分子がセマフォリンの生物活性にどのように関与しているかについては明らかではなく、セマフォリン分子の有する多彩な生物活性の機序は不明なままであった。

## 2. 研究の目的

本研究では plexin-A1 の樹状細胞および破骨細胞における活性に注目し、生体内での免疫応答および骨形成における plexin-A1 の役割を解析すると共に、樹状細胞や破骨細胞における plexin-A1 下流のシグナル伝達経路への FARP2 および MICAL の関与を検討し、セマフォリンの活性を担う plexin-A1 下流のシグナル伝達機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) Plexin-A1 シグナル伝達経路への FARP2 および MICAL の関与の検討

① Plexin-A1 と FARP2 および MICAL の分子会合の検討: Plexin-A1 と FARP2 および MICAL の会合をマクロファージ株化細胞・RAW264.7 およびマウス骨髄由来樹状細胞の細胞溶解液を用いて免疫沈降法およびウエスタンブロット法にて検討する。

② 樹状細胞活性化における FARP2 および

MICAL の関与の検討: FARP2 に対する siRNA を導入した FARP2 ノックダウン樹状細胞を調整し、ケモカインに対する走化性反応を migration assay によって検討する。また FARP2 ノックダウン樹状細胞におけるインテグリンの活性化を検討する。次に MICAL に対する siRNA を導入した MICAL ノックダウン樹状細胞を調整し、炎症性サイトカインの産生を ELISA にて測定する。また Monooxygenase の阻害剤および ROS の阻害剤で処理した樹状細胞からの炎症性サイトカインの産生を検討する。さらに、FARP2 および MICAL のノックダウン細胞への Sema6D の効果をリコンビナントタンパクを用いて検討する。

③ 破骨細胞分化・機能における FARP2 および MICAL の関与の検討: 骨髄細胞を用いて FARP2 あるいは MICAL のノックダウン細胞を調整し、破骨細胞分化・骨吸収能を検討する。インテグリンの局在および actin ring の形成を免疫染色によって検討する。破骨細胞の motility を共焦点顕微鏡を用いた time lapse 撮影によって検討する。さらに、FARP2 および MICAL のノックダウン細胞への Sema6D の効果をリコンビナントタンパクを用いて検討する。

(2) Plexin-A1 のリガンド・Sema6D の樹状細胞および破骨細胞における機能解析

① Sema6D 欠損マウスを用いて樹状細胞分化、活性化への Sema6D の役割を検討する。またケモカインに対する走化性反応も検討する。

② Sema6D 欠損マウスを用いて破骨細胞分化・骨吸収能における Sema6D の機能を検討する。また motility および遊走能を共焦点顕微鏡を用いた time lapse 撮影によって検討する。

(3) plexin-A1 下流のシグナル伝達経路の解明

(1) および (2) によって得られた知見を総括し、Plexin-A1 のシグナル伝達経路の解明を試みる。

## 4. 研究成果

(1) Plexin-A1 と FARP2 および MICAL の会合の

検討: COS7細胞に plexin-A1 と FARP2 あるいは MICAL の発現ベクターを導入し、これら分子の会合を検討した。その結果、これら分子の会合が認められた。

#### (2) FARP2 の機能解析

① FARP2 発現 RAW クローン の樹立: FARP2 発現ベクター (full length および Dominant negative) をマクロファージ株化細胞 RAW264.7 に導入し、Stable 発現 clone の樹立をした。

② 炎症性サイトカイン産生における FARP2 の関与の検討: 樹立した Full length (Control) clone および Dominant negative (DN) clone からの炎症性サイトカインの産生を検討したところ、親株細胞と同程度の TNF- $\alpha$  の産生が認められ、炎症性サイトカインの産生に FARP2 は関与しないことが示された。

③ 破骨細胞における FARP2 の機能検討: 樹立した clone を用いて破骨細胞分化実験を行った。細胞を RANKL 存在下で 96 時間培養し、その後 TRAP 染色を行った。その結果、親株細胞および control clone は巨大な多核細胞へと分化した。一方、DN clone ではそのような多核巨細胞への分化が認められなかった。

④ 破骨細胞分化過程における FARP2 の役割の検討: FARP2 が破骨細胞分化過程のうち、1) 細胞増殖、2) 細胞融合、3) 成熟、のどのステップにするのか検討したところ、いずれの clone も同様に細胞増殖し、また破骨細胞分化マーカーの発現が認められた。これらの結果から、DN clone は破骨細胞分化過程のうち細胞増殖および分化は正常である一方、細胞融合の過程に障害を有することが示唆され、FARP2 が破骨細胞分化の比較的后期に関与することが示された。

⑤ 細胞接着への FARP2 の関与の検討: 細胞接着における FARP2 の機能を検討するため、樹立した clone を用いて細胞接着分子の発現を Flow cytometry によって解析した。インテグリン分子の発現に顕著な差は認められず、DN clone の

細胞接着は正常である可能性が示された。

これらの結果から、FARP2 は免疫細胞からの炎症性サイトカインの産生には関与しない一方、破骨細胞分化に関与する可能性が示唆された。特に、破骨細胞分化の過程のうち細胞融合のステップに障害を有する可能性が示唆された。これらの結果は plexin-A1 が FARP2 を介して細胞融合のステップに関与している可能性を強く示唆するものである。

#### (3) MICAL の機能解析

① Sema6D の炎症性サイトカイン産生作用への MICAL の関与の検討: MICAL 分子には ROS の産生に関与する flavoprotein monooxygenase domain が存在する。そこで、Sema6D 刺激による炎症性サイトカインの産生に ROS が関与するかどうかを検討した。ROS の阻害剤である NAC で処理した RAW 細胞をリコンビナント Sema6D タンパクで刺激し、炎症性サイトカインの産生を ELISA にて測定したところ、リコンビナント Sema6D タンパクによって誘導される炎症性サイトカインの産生が NAC の濃度依存的に抑制された。この結果から、Sema6D の下流のシグナル伝達経路に ROS の活性化を誘導する分子/経路が存在することが強く示唆された。

ここまでの結果から、plexin-A1 に ROS の産生に関与する分子 MICAL が会合すること、さらに Sema6D-plexin-A1 下流のシグナル伝達経路に ROS を産生する分子/経路が存在することが示された。これらの結果は、monooxygenase domain を有する MICAL が Sema6D によって誘導される炎症性サイトカインの産生を ROS の産生を介して制御する可能性を示唆するものである。

#### 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)

Makino N, Toyofuku T, Takegahara N, (以下 8 名). Involvement of Sema4A in the progression of experimental autoimmune myocarditis. *FEBS Lett.* 582:3935-40.2008 (査読有り)

Toyofuku T, Yoshida J, Sugimoto T, Yamamoto M, Makino N, Takamatsu H, Takegahara N, (以下 5 名) Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the navigation of cardiac neural crest cells. *Dev Biol.* 321:251-62.2008 (査読有り)

Yamamoto M, Suzuki K, Okuno T, Ogata T, Takegahara N, (以下 8 名) Plexin-A4 negatively regulates T lymphocyte responses. *Int Immunol.* 20:413-20.2008 (査読有り)

Suzuki K, Okuno T, Yamamoto M, Pasterkamp RJ, Takegahara N, (以下 7 名) Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin. *Nature.* 446:680-4. 2007 (査読有り)

〔学会発表〕(計1件)

Takegahara Noriko, Involvement of a guanine nucleotide exchange factor, FARP2, in osteoclastogenesis. 日本分子生物学会・2008年12月10日・神戸ポートアイランド

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

竹ヶ原 宜子 (TAKEGAHARA NORIKO)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号: 10444522

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし