

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500349

研究課題名(和文)

MOCA 遺伝子改変マウスにおける神経細胞の形態形成と軸索再生の機序解明

研究課題名(英文)

Effect of MOCA overexpression on axonal regeneration in vivo.

研究代表者 行方 和彦 (NAMEKATA KAZUHIKO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

研究者番号：70392355

研究成果の概要(和文)：

Dock3 は WAVE 分子複合体を細胞膜へ移行させることによって軸索伸長を促進する

研究成果の概要(英文)：

Dock3 induces axonal outgrowth by stimulating membrane recruitment of the WAVE complex.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2009 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：脳神経疾患、発現制御

1. 研究開始当初の背景

Modifier of cell adhesion protein (MOCA)

は別名 Dock3 と呼ばれ、アルツハイマー病の原因遺伝子産物であるプレセニリンに結合する新規タンパク質として 2000 年に発見された。その後の研究により MOCA はアルツハイマー病の他の原因遺伝子産物であるアミロイド前駆体タンパクの分解を促進していることが明らかにされた (Chen et al., J Cell Biol, 2002)。またアルツハイマー病患者脳では MOCA が減少していること

(Kawashima et al., J Neurochem, 2000)から、MOCA がアルツハイマー病の発症に影響を及ぼす可能性が推測される。これまで MOCA の細胞内での機能の詳細は不明であったが、研究代表者は MOCA の発現が神経細胞に特異的であり、Rho family 低分子量 G タンパク質である Rac1 を活性化することにより細胞骨格の再編を制御していることを明らかにした (J Neurochem, 2002; J Biol Chem, 2004)。また MOCA の強制発現により、海馬や網膜神経節細胞などの神経細胞

の軸索伸長が促進することを発見した（特許申請済）。さらに MOCA トランスジェニックマウスでは実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）による視機能の低下が抑制されていることや、視神経切断後の軸索再生が促進していることも見出している。これらの結果から MOCA の機能が神経細胞やミエリンの再生に大きく関与している可能性が推測される。

2. 研究の目的

本研究では神経細胞における Modifier of cell adhesion protein (MOCA)の機能を探索する。特に神経細胞の形態形成、軸索伸長、軸索再生における MOCA の役割を遺伝子工学的手法によって検討することで、神経発生・変性・再生に渡る MOCA の機能を明らかにし、神経変性疾患の発症メカニズム解明や治療法の開発に応用することを目的とする。研究代表者はこれまでに独自の検討を行い、MOCA が中枢神経組織に特異的に発現し、神経細胞の細胞骨格の再編を制御することを明らかにした（J Biol Chem, 2004 に発表済）。そして最近 MOCA を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、同マウスでは軸索切断後の軸索再生能が高いことを見出した。また多発性硬化症に類似したモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE）を同マウスに発症させると重症度が軽減することも確認しており、MOCA は神経細胞やミエリンの再生促進に関与する可能性があると思定される。そこで本研究では特に MOCA のリン酸化による修飾が神経発生・変性・再生等に与える影響を、疾患モデル動物などを交えて、*in vivo*および *in vitro*の両面から詳細に検討する。

3. 研究の方法

MOCAトランスジェニックマウスを用いた疾患モデル動物の解析を通して、MOCAの機能解析と治療への応用を検討した。特に新規MOCA結合分子を検索するとともに、その複合体形成が軸索伸長にどのような影響を与えるのかを検討を行うとともに、MOCAのリン酸化修飾が複合体形成をどのように制御しているのかを生化学的および分子生物学的手法によって解析を行った。一方、MOCAの活性中心となるアミノ酸を検索するため、多数のポイントミュータントを作製してGEF活性を測定した。マウス視神経の軸索損傷などに対する障害耐性や再生促進におけるMOCAの影響について重点的に解析を進めた。

4. 研究成果

別名で Modifier of cell adhesion protein (MOCA) と呼ばれる Dock3 はアルツハイマー病の原因物質である presenilin に結合する新規の蛋白質として発見された。これまでに申請者は Dock3 が中枢神経系に特異的に発現し、細胞骨格の構築を制御する Rac1 特異的な guanine nucleotide exchange factor (GEF)であることを明らかにしてきた。本研究では Dock3 の神経細胞内における機能解析を進め、Dock3 が神経栄養因子 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の下流で軸索伸長や酸化ストレス耐性に寄与することを明らかにした。また Dock3 の活性中心となる5カ所のアミノ酸を同定したが、この活性中心は Dock3 のホモログである Dock1, Dock2, Dock4 にも共通していることが判明した。Dock3 は細胞膜上で Fyn や WAVE など細胞骨格を制御するタンパク質と複合体を形成して、アクチン繊維の再構成を制御することによって軸索伸張を促進していることを明らかとした。

Dock3-WAVE の結合は、Dock3 が細胞膜上でリン酸化することによって阻害されることが判明し、細胞内での複合体形成は精密な制御を受けていることが明らかとなった。さらに新規に作成した Dock3 を過剰発現するトランスジェニックマウスにおいては、野生型マウスと比較して視神経外傷後の軸索再生が顕著に亢進することを発見し報告した (図 1 ; Namekata et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010)。これらの研究成果は新聞

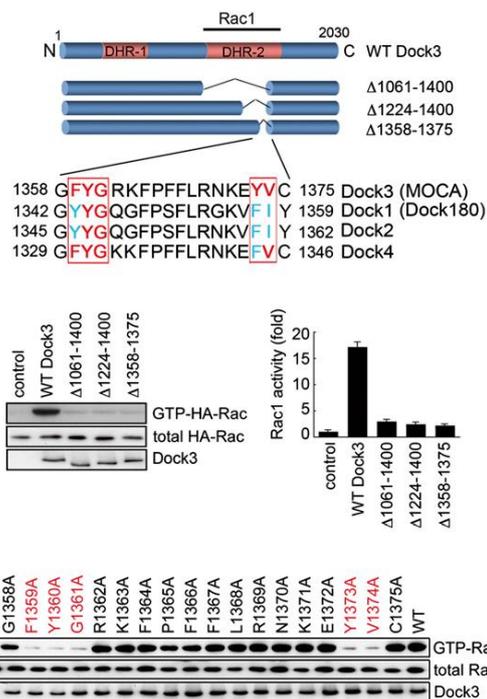


図 1 MOCA の活性中心アミノ酸。変異体を用いた GEF 活性測定によって 5つのアミノ酸が GEF 活性には必要であることがわかる。

でも報道された。

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 11 件)

1. Harada C, Guo X, Namekata K, Kimura A, Nakamura K, Tanaka K, Parada LF, Harada, T. Glia- and neuron-specific

functions of TrkB signaling during retinal degeneration and regeneration. *Nature Communications* 2:189, 2011

2. Guo X, Harada C, Namekata K, Kimura A., Mitamura Y., Yoshida H., Matsumoto Y., Harada T. Spermidine alleviates severity of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 12, 2011
3. Guo X, Harada C, Namekata K, Matsuzawa A, Camps M, Ji H, Swinnen D, Jorand-Lebrun C, Muzerelle M, Vitte PA, Rückle T, Kimura A, Kohyama K, Matsumoto Y, Ichijo H, Harada T. Regulation of the severity of neuroinflammation and demyelination by TLR-ASK1-p38 pathway. *EMBO Mol Med.* 2 (12): 504-515, 2010
4. Guo, X., Harada, C., Namekata, K., Mitamura, Y., Yoshida, H., Matsumoto, Y., Harada, T. Delayed onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in Olig1 deficient mice. *PLoS ONE* 5 (9). pii: e13083, 2010
5. Harada C, Namekata K, Guo X, Yoshida H, Mitamura Y, Matsumoto Y, Tanaka K, Ichijo H, Harada T. ASK1 deficiency attenuates neural cell death in GLAST deficient mice, a model of normal tension glaucoma. *Cell Death Differ.* 17 (11): 1751-9, 2010
6. Namekata K, Harada C, Taya C, Guo X, Kimura H, Parada LF, Harada T. Dock3 induces axonal outgrowth by stimulating membrane recruitment of the WAVE complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107 (16): 7586-91, 2010
7. Yoshida T, Guo X, Namekata K, Mitamura Y, Kume S, HARADA T. Expression of Epiplakin1 in the developing and adult mouse retina. *Jpn J Ophthalmol.* 54 (1): 85-88, 2010

8. Yoshida-Hata N, Mitamura Y, Oshitari T, **Namekata K**, Harada C, Harada T, Yamamoto S. Transcription factor, SP1, in epiretinal membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 87 (3): e26-8, 2010
 9. **Namekata K**, Harada C, Guo X, Kikushima K, Kimura A, Fuse N, Mitamura Y, Kohyama K, Matsumoto Y, Tanaka K, Harada T. Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAAC1-deficient mice. *Neurosci Lett.* 465 (2): 160-4, 2009
 10. Guo X, Harada C, **Namekata K**, Kikushima K, Mitamura Y, Yoshida H, Matsumoto Y, Harada T. Effect of geranylgeranylacetone on optic neuritis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Lett.* 462 (3): 281-5, 2009
 11. **Namekata K**, Harada C, Kohyama K, Matsumoto Y, Harada T. Interleukin-1 stimulates glutamate uptake in glial cells by accelerating membrane trafficking of Na⁺/K⁺-ATPase via actin depolymerization. *Mol Cell Biol.* 28 (10): 3273-3280, 2008
- [学会発表] (計6件)
1. Guo X., Harada C., **Namekata K.**, Kimura A., Ichijo H. & Harada T. ASK1 inhibition ameliorates optic neuritis by modulating glial innate immunity. 26th Asia Pacific Academy of Ophthalmology (APAO) Congress, 2011.3.22., Sydney.
 2. Harada T., **Namekata K.**, Guo X., Tanaka K., Ichijo H. & Harada C. ASK1 deficiency attenuates neural cell death in a mouse model of normal tension glaucoma. 26th Asia Pacific Academy of Ophthalmology (APAO) Congress, 2011.3.22., Sydney.
 3. **Namekata K.**, Harada C., Guo X. & Harada T. Optic Nerve Regeneration is Enhanced in Dock3 Overexpressing Transgenic Mice. 26th Asia Pacific Academy of Ophthalmology (APAO) Congress, 2011.3.22., Sydney.
 4. **行方和彦**、原田知加子、郭曉麗、原田高幸
軸索伸長における Dock3 と WAVE の機能解析
BMB2010 (第33回日本分子生物学会大会・第83回日本生化学会大会)、2010年12月
 5. **行方和彦**、原田知加子、郭曉麗、原田高幸
軸索伸長における Dock3 と WAVE の機能解析
Neuro2010 (第33回日本神経科学大会・第53回日本神経科学学会大会・第20回日本神経回路学会大会)、2010年9月
 6. 木村敦子、**行方和彦**、田中光一、原田高幸
グルタミン酸毒性と酸化ストレスに対しての Dock3 による網膜神経細胞
Neuro2010 (第33回日本神経科学大会・第53回日本神経科学学会大会・第20回日本神経回路学会大会)、2010年9月
- [図書] (計0件)
[産業財産権]
○出願状況 (計0件)
- 名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://tmin.ac.jp/topics/harada.html>

<http://tmin.ac.jp/topics/harada2.html>

<http://tmin.ac.jp/topics/harada3.html>

<http://tmin.ac.jp/topics/harada4.html>

新聞掲載

平成 22 年 5 月 2 日の毎日新聞（朝刊）
に掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

行方 和彦 (NAMEKATA KAZUHIKO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神

経科学総合研究所・研究員

研究者番号：70392355

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし