

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390069

研究課題名(和文) ガイダンス因子セマフォリンの新しい細胞機能の解明：細胞内膜輸送の制御機構

研究課題名(英文) Novel regulatory mechanism of semaphorin in endosomal trafficking

研究代表者

豊福 利彦 (Toyofuku, Toshihiko)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・准教授

研究者番号：60322179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性症患者でSema4Aのアミノ酸変異を示す家系がある。Sema4A欠損マウスが視細胞欠損をしめすことから、Sema4Aが原因遺伝子であることを確認した。網膜色素上皮細胞は視細胞の生存と機能を制御するが、この細胞に発現するSema4Aが色素上皮細胞内での膜輸送経路の制御を行い、光刺激により視細胞に生じる酸化ストレスによる細胞死を抑制し、光刺激により位相転化したレチノイドを再生する。人の網膜色素変性症患者で認めたSema4Aの変異を導入した遺伝子改変マウスも視細胞の異常をしめす。このマウスに正常Sema4Aを色素上皮細胞に直接遺伝子導入することにより、視細胞の細胞死は抑制できた。

研究成果の概要(英文)：Sema4A was identified in a family suffering from retinitis pigmentosa (RP). We generated the Sema4A-deficient mice and found the degeneration of photoreceptors. This result supported the hypothesis that Sema4A is the one of the causative genes for the human retinitis pigmentosa. Retinal pigment epithelial cells (RPE), where Sema4A is expressed, prevent photoreceptors from light-induced apoptosis and support the retinoid recycling which regenerates the photo-converted retinoid to normal one. Sema4A was found to activate these processes through regulating the endosomal trafficking. We further generated the mice carrying the mutated Sema4A, which were identified in human RP and found that these mutations in Sema4A are responsible for the RP. The injection of retrovirus carrying wild-type Sema4A successfully rescued the defects in photoreceptors in mutated mice. This result provided the possibility that the RP can be improved by the gene-transfer of Sema4A into RPE.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：セマフォリン 網膜色素変性症 網膜色素上皮

1. 研究開始当初の背景

セマフォリンは神経ガイダンス因子の代表的な分子群であり、神経回路形成時の神経突起の方向性に重要な役割を示す。申請者らはセマフォリン分子が神経ガイダンス作用以外に心血管系の発生及び免疫系における調節作用を有することを発見し報告してきた(**Genes & Dev.** 18: 435, 2004, **Nat Cell Biol** 6:1204, 2004, **Immunity** 22: 305, 2005, **Nat Cell Biol.** 8: 615, 2006, **EMBO J**, 26:1373, 2007, **Dev. Biol.** 321: 251, 2008, **Nat Immunol.** 11: 594, 2010)。特に Sema4A は血管発生において抑制作用を有し(**EMBO J**, 26:1373, 2007)、免疫系において Th1-Th2 分化決定に重要な役割を果たしている(**Immunity** 22: 305, 2005)。セマフォリンは膜蛋白質であるプレキシンと結合し、低分子量 G 蛋白質を介する細胞骨格制御を行うが、申請者らはこのシグナル伝達系の新たな調節因子を同定し (**Nat Neurosci**, 8:1712, 2005) 構造解析よりセマフォリンとプレキシンの結合様式を報告した(**Nature** 2010, in press)。さらに免疫細胞遊走時の方向性を時空間的に解析することに成功している (**Nat Immunol.** 11: 594, 2010)。以上のごとく申請者らはセマフォリン研究で先駆的業績をあげてきた。最近申請者らは Sema4A 欠損マウスにおいて視細胞が光刺激により、アポトーシスを生じ生後一ヶ月以内にほぼ全ての網膜視細胞が欠損することを見出した。視覚障害の3大疾患である網膜色素変性症の主因は網膜視細胞の変性疾患であり、Sema4A の遺伝子変異を示す家系の報告もある(**J. Med. Genetics**, 2006)。視細胞は Sema4A を発現する網膜色素上皮細胞によるレチノイド代謝及び過剰な光刺激による細胞死を抑制するシグナル伝達経路により維持されている。したがっていずれの経路の障害においても視細胞の変性が生じる (**Annu.**

Rev. Neurosci. 2003)。このように、従来考えられてきたセマフォリンによる細胞骨格制御機構とは異なるシグナル伝達経路が網膜における Sema4A 機能であると考えられる。

2. 研究の目的

神経細胞間の複雑なネットワーク回路は神経線維の正確なターゲット細胞への誘導により確立されるが、この際神経軸索の反発及び誘引を決定するのがセマフォリンに代表されるガイダンス因子である。近年セマフォリンが神経発生以外に心血管発生及び免疫調節機能を有することが明らかとなっている。これまでの申請者の解析によって網膜色素変性症の原因遺伝子の一つである Sema4A の遺伝子欠損マウスは視細胞層の欠落を示すことが明らかになっている。予備実験より Sema4A が従来考えられたガイダンス機能とは別に細胞内膜輸送制御機構を有する結果を得た。本研究では、Sema4A により膜輸送される分子群のうち視細胞の生存を決定する分子を同定するとともに、Sema4A による細胞内分子群の輸送を可視化技術により時空間的に解明する。

3. 研究の方法

本研究は、ガイダンス因子としてのセマフォリンの従来のシグナル伝達機構では予想できなかった細胞内輸送の制御機構を、生化学的・逆遺伝学的手法に加え蛍光顕微鏡を駆使したタイムラップス・イメージング法を用いた解析によって時空間的に明らかにする。具体的には以下の4つの方面から解析を行った。

Sema4A のレチノイド代謝調節の分子群の同定 酸化ストレス下での Sema4A 結合蛋白質の同定 Sema4A の膜輸送制御の時空間的解析 Sema4A 遺伝子異常を導入したノックイン・マウスの解析

4. 研究成果

□Sema4A のレチノイド代謝調節の分子群の同定：Sema4A はレチノイド結合タンパク質と結合し、色素上皮細胞内でのレチノイド再生経路を維持していた。

□酸化ストレス下での Sema4A 結合蛋白質の同定：Sema4A は酸化ストレス下で、視細胞保護作用を有するプロサポシンの細胞内輸送と細胞外放出を制御していることを見出した。

□Sema4A の膜輸送制御の時空間的解析：Sema4A とレチノイド結合タンパク質が色素上皮細胞内での移動を 3 次元的に時間経過を追って撮影した。両者は結合した状態で同心円状に移動することが明らかとなった。これまでのセマフォリン研究は、神経ガイダンス因子としての機能解析が中心であり、低分子量 G 蛋白質の活性、細胞内骨格の再構築に焦点が当てられてきた。しかし、本研究で申請者は膜型セマフォリン Sema4A が細胞内膜輸送制御を介する細胞内代謝調節に関わることを実証した。

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 2 件)

Nojima S, Toyofuku T, Kamao H, Ishigami C, Kaneko J, Okuno T, Takamatsu H, Ito D, Kang S, Kimura T, Yoshida Y, Morimoto K, Maeda Y, Ogata A, Ikawa M, Morii E, Aozasa K, Takagi J, Takahashi M, Kumanogoh A. 2013 A point mutation in Semaphorin 4A associates with defective Endosomal sorting and causes retinal degenerative diseases. **Nat Commun.** 4:1406.

Toyofuku T, Nojima S, Ishikawa T, Takamatsu H, Tsujimura T, Uemura A, Matsuda J, Seki T, Kumanogoh A. 2012 Endosomal sorting by Semaphorin 4A in retinal pigment epithelium supports photoreceptor survival. **Genes Dev.**

26(8): 816-29

[学会発表](計 2 件)

豊福利彦 Semaphorin 4A による網膜色素上皮細胞内の膜輸送制御は光受容体維持に重要である
84 回日本生化学会大会(シンポジウム)

Toshihiko Toyofuku Endosomal sorting by Semaphorin 4A in retinal pigment epithelium supports photoreceptor survival

34 日本分子生物学会(ワークショップ)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

なし

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

豊福 利彦 (トヨフク トシヒコ)

研究者番号：60322179

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：