

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：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689005

研究課題名(和文) ガイダンスシグナルにおいて普遍的に駆動される情報伝達機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the universal signal transductions of axonal guidance factors

研究代表者

生沼 泉(Oinuma, Izumi)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：40452297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円、(間接経費) 5,520,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量G蛋白質R-Rasは細胞接着因子受容体、インテグリン活性化におけるポジティブフィードバックを担う。一方、反発性ガイダンス因子semaphorin受容体、Plexinは自身のもつR-Ras GAP活性によりR-Rasを不活性化し、このポジティブフィードバックループを抑制する。本研究は、R-Rasの上流・下流の分子要素の同定を分子・細胞生物学的手法で行った。

研究成果の概要(英文)：R-Ras is a member of the Ras family of small GTPases, and it mediates inside-out activation of integrins and plays a central role in positive-feedback between cell adhesion and integrin activation. On the other hand, the repulsive guidance molecule semaphorin receptor, Plexin functions as a GTPase-activating protein for R-Ras, inducing inactivation of R-Ras. The sema-Plex pathway blocks the positive-feedback, inducing efficient integrin inactivation and loss of cell adhesion. However, precise molecular mechanism remain unclear. In this project, we identified some molecules which function upstream and downstream of R-Ras.

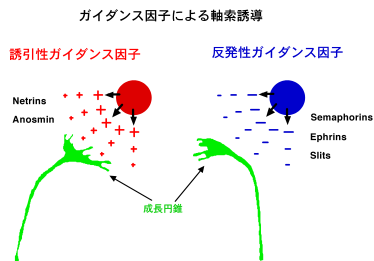
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：低分子量G蛋白質 軸索ガイダンス semaphorin Plexin R-Ras アクチン細胞骨格 integrin

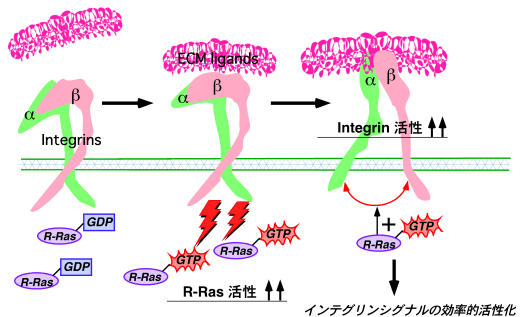
1. 研究開始当初の背景

(1) 神経細胞が高次脳機能を発現させるためには、神経細胞が標的細胞を認識して様々なガイダンス因子に応答し、突起を伸長させ、正確な神経回路を構築する必要がある。高次脳機能の発現のメカニズム解明は、神経系のダイナミズム、ひいては神経変性疾患の解明につながり、とても重要な課題である。これまで、発生学的、および神経生理学的手法などによる多くの研究により、視覚や聴覚などの脳機能に関わる神経回路がわかってきた。しかし、神経回路形成については古くから形態学的検討がなされてきたものの、これらの現象を司るガイダンス因子やシナプス形成機構に関する、分子レベルの研究は最近始まったばかりである。特に、ガイダンス因子の細胞内情報伝達機構やその調節因子などについては、数あるガイダンス因子(例えば semaphorin, ephrin, slit, netrin, NGL-1 など)に関して、各々に特化し、細分化された断片的な情報が散在しており、それらの情報は『ガイダンス』という共通の現象からの視点では有機的に考察されていないのが現状である。この散漫な状況を案じて、申請者は、ガイダンスシグナルにおいて普遍的に駆動される情報伝達機構の発見を目的として本研究提案する。



(2) 低分子量 G 蛋白質 R-Ras は細胞外マトリックスへの接着刺激により細胞内で活性化され、さらに逆にこの活性化された R-Ras が細胞内から (inside-out に) 細胞接着因子受容体、インテグリンを物理的に活性化構造にし、細胞外マトリックスへの親和性を上昇させることで、細胞接着におけるポジティブフィードバックを担う。一方、反発性ガイダンス因子 semaphorin 受容体、Plexin はそれ自身のもつ R-Ras GAP 活性により R-Ras を不活性化し、このポジティブフィードバックループの一点を抑制することで、インテグリンの活性化を抑制し、細胞接着を抑制する。最も基本的で普遍的な細胞機能の 1 つである細胞接着において R-Ras を介した増幅機構が存在すると考えられるが、その分子機構は不明である。

R-Ras 活性化を介した細胞接着のポジティブフィードバック機構



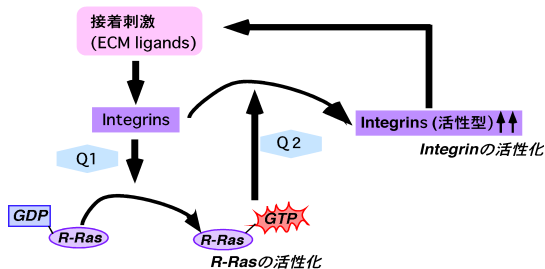
2. 研究の目的

本研究はまず、R-Ras 活性化・不活性化の個々の分子要素の同定を分子・細胞生物学的手法で行い、最終的には活性制御の全体像を把握することを目的に、様々な異種のガイダンス因子シグナルにおいて普遍的に適用、そして実際に駆動される情報伝達機構の発見へとつなげることを目的としている。

3. 研究の方法

われわれは、これまでに、R-Ras は細胞外マトリックスへの接着刺激により細胞内で活性化され、さらに逆にこの活性化された R-Ras が、細胞内から (inside-out に) 細胞接着因子受容体、インテグリンを物理的に活性化分子構造にし、細胞外マトリックスへの親和性を上昇されることで、細胞接着におけるポジティブフィードバックループを担うこと、また、R-Ras の過剰発現により、神経軸索の伸長や枝分かれが見られることを見いだしているが、さらに、R-Ras がどのような分子機構でそれらの現象を担っているのかを、各種生化学的手法、細胞生物学手法で解析した。

R-Ras による 細胞接着ポジティブフィードバック機構の分子要素の解明



具体的には、上の図の Q2 に相当する分子を同定すべく、活性型 R-Ras に結合する分子を酵母の two-hybrid 法や免疫沈降法などを用いてスクリーニングして同定し、R-Ras がどのようなエフェクターと結合して、実際にインテグリンの活性化を引き起こすのかを明らかにした。また、細胞に接着刺激が入ると R-Ras が活性化されるが、これまでに R-Ras に特異的な活性化因子、GEF は同定されていなかったため、既知の Ras に対する

GEFの中で、R-Rasに対しGEFとして働くものを、神経細胞を用いたshRNAによるノックダウン法により、スクリーニングした。

神経軸索成長過程において、その先端の成長円錐は外界の様々なガイダンス因子を受容し、標的細胞に到達するためのセンサーとして働いている重要な構造体である。成長円錐は極めて運動性が高い部分で、細胞骨格の再構築をくり返すことで細胞外基質との接着を変化させつつ、細胞外基質の中を進む。これまで、申請者や他のグループの研究により、海馬や大脳皮質の初代培養神経細胞を用いた系において、反発性ガイダンス因子のsemaphorinやephrinを培地中にbath applicationすることにより神経細胞全体に作用させると、R-Rasが不活性化され、成長円錐の崩壊が引き起こされることが明らかになっている。それらの形態変化は、細胞骨格系のダイナミックな再構成を伴うものであるが、その分子機構は明らかになっていない。そこで、R-Rasのエフェクターとなりうるアクチン骨格制御分子を同定するために、RAドメイン(Ras-associationドメイン)を持つ蛋白質を対象にしぼり、スクリーニングを行った。

#### 4. 研究成果

##### (1)軸索の分枝化のエフェクターの同定

これまでの研究で、R-Rasは神経軸索の形成に必要であることが明らかになっていた。しかしながら、どのような分子機構で軸索の形態を制御するかは不明であったので、われわれはR-Rasによる軸索の形態制御に必要な下流のエフェクター分子の同定を試みた。酵母のツーハイブリッドシステムを用いた結合蛋白のスクリーニングにより、活性型R-Rasの結合蛋白質として、アクチン細胞骨格に連結した足場蛋白質であるAfadinを得た。AfadinはN末端側にRas蛋白ドメインを有する蛋白質で、*in vitro*での結合実験により、R-Rasは活性依存的にAfadinのRAドメインに結合することが明らかになった。

また、初代培養神経細胞における内在性Afadin蛋白の発現を調べたところ、大脳皮質および海馬由来の神経細胞のいずれにおいても、Afadinは培養初期の軸索の形成時期に多く発現していることがわかった。また、培養2日目の初代培養大脳皮質神経細胞を用いた免疫沈降実験によって、内在性のR-RasとAfadinの結合が確認された。次に、初代培養大脳皮質神経細胞の軸索形態におけるR-RasおよびAfadinの役割を検討した。活性型のR-Rasを大脳皮質神経細胞に発現させると、神経軸索の分枝化が引き起こされ、この分枝化は内在性Afadinのノックダウンにより阻害されることがわかった。

以上の結果から、神経細胞においてR-RasはAfadinを介して軸索の分枝化を制御することが示唆された。この成果は米国細胞生物学会誌(*Molecular Biology of the Cell*)に掲載

され、その刊の表紙を飾った。

(2)樹状突起形態制御のエフェクターの同定 R-RasサブファミリーにはR-Ras(R-Ras1)、TC21(R-Ras2)、およびM-Ras(R-Ras3)があり、われわれは過去に、M-Rasが樹状突起の形態制御を行っているという研究結果を報告している。しかしながら、どのような分子機構で樹状突起の形態を制御するかは不明であったので、M-Rasによる樹状突起形成に必要な下流のエフェクターの同定を試みた。データベースを用いた結合蛋白のスクリーニングにより、M-Rasの新奇結合蛋白質として、アクチン細胞骨格系制御因子Ena/VASP蛋白質の結合蛋白質であるLamellipodin(Lpd)を得た。

LpdはN末端側にRas蛋白ドメインを有する蛋白質であり、*in vitro*での結合実験により、M-Rasは活性依存的にLpdに結合することが明らかになった。また、大脳皮質初代培養神経細胞において、M-RasとLpdの内在性の結合が確認された。

次に、樹状突起形成におけるLpdの役割を検討した。われわれは以前の報告で、活性型のM-Ras(M-RasQL)を過剰発現させると、大脳皮質神経細胞において樹状突起伸長が引き起こされることを明らかにしている<sup>2)</sup>。この条件において、内在性のLpdをshRNAを用いてノックダウンしたところ、M-RasQLによる樹状突起伸長が抑制された。以上の結果から、LpdはM-Rasによる樹状突起伸長作用に必須であることが明らかになった。

さらに、ガイダンス因子のさらなる普遍的役割を解明することができた。われわれは以前の報告で、反発性ガイダンス因子Sema受容体、Plexinはそれ自身の持つR-RasGAP活性により直接的にR-Rasを不活性化し、神経細胞の軸索に対して反発作用を示すことを明らかにしているが、Sema刺激によって軸索に加え、樹状突起が退縮し、それに伴ってアクチン骨格が樹状突起の先から消えて無くなっていることがわかった。さらに、これらの樹状突起の分枝の退縮やアクチン骨格の消失は、M-RasQLを導入しておいてやることで、阻止され、Semaによる樹状突起の分枝の退縮には受容体のPlexinがM-Rasに対するGAP活性を発揮してM-Rasの活性を抑制することで、アクチン骨格の崩壊を引き起こすことが必要であることが明らかになった。

さらに、分子メカニズムを詳細に検討したところ、活性型であるM-RasQLはLpdに結合してそれを細胞膜へ運ぶ作用があることが生化学的な分画実験により明らかになった。一方で、不活性型であるM-RasSNにはそのような作用はなかった。このことから、LpdはM-Rasの活性依存的に細胞膜へ運ばれると考えられる。大脳皮質神経細胞にSema刺激を加えると、膜画分に存在する

Lpdの量が減少していた。Lpdを強制的に細胞膜に移行させる CAAX シグナルを付加した Lpd-CAAX を大脳皮質神経細胞に発現させておいた神経細胞では、Sema によって引き起こされる樹状突起の退縮が阻止された。

これらの結果から、Sema が無い状態では受容体のプレキシンが活性化されていないため、樹状突起内の M-Ras の活性が高いため、Lpdが樹状突起の先端の細胞膜へ運ばれ、アクチン骨格系の伸長が起こるが、Sema が存在すると、受容体の Plexin の GAP 活性が活性化され、樹状突起内の M-Ras が不活性化状態に変換されることによって、ラメリポジンが樹状突起の先端の細胞膜へ運ばれなくなり、アクチン骨格系の伸長が抑制されるということが示唆された。また、今回の成果により、Plexin による R-Ras GAP 活性を介した退縮応答は、軸索、樹状突起に共通のシグナル機構であることが示された。

なお、今回の成果は米国神経科学会誌(*The Journal of Neuroscience*)に掲載され、その内容は6月13日(京都新聞(夕刊6面))および8月6日(読売新聞の科学 MONDAY(朝刊31面))において新聞報道された。

#### 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3件)

Iwasawa N., Negishi M. and Oinuma I.  
R-Ras controls axon branching through Afadin in cortical neurons.  
*Mol. Biol. Cell*, 23:2793-2804, 2012.  
doi: 10.1091/mbc.E12-02-0103.

Tasaka G., Negishi M. and Oinuma I.  
Semaphorin 4D/Plexin-B1-mediated M-Ras GAP activity regulates actin-based dendrite remodeling through Lamellipodin.  
*J. Neurosci.*, 32:8293-8305, 2012.  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.0799-12.

Oinuma I., Kawada K., Tsukagoshi K. and Negishi M.  
Rnd1 and Rnd3 targeting to lipid raft is required for p190 RhoGAP activation.  
*Mol. Biol. Cell*, 23:1593-1604, 2012.  
doi: 10.1091/mbc.E11-11-0900.

[学会発表](計6件)

生沼泉  
軸索形態調節における R-Ras の役割  
第7回神経発生討論会(招待講演)  
大阪大学(大阪府)  
2014年3月14日

生沼泉

軸索形態調節における R-Ras シグナル  
第86回日本生化学会大会(招待講演)  
2013年9月11日~13日  
パシフィコ横浜(神奈川県)

生沼泉  
神経回路形成における低分子量 G タンパク質シグナリング  
熊本シンポジウム 2013- 神経発生を多角的に討論する会(招待講演)  
2013年6月25日~26日  
熊本大学(熊本県)

Izumi Oinuma  
R-Ras family GTPases in semaphorin signaling  
日米脳科学情報交換セミナー “Growth cones and axon regeneration: Entering the age of informatics” (招待講演)  
2012年10月10日~12日  
ニューオリンズ(米国)

生沼泉  
神経回路形成における R-Ras サブファミリーの役割  
第35回日本神経科学会大会、サテライトシンポジウム「次世代の担い手による最先端脳科学」(招待講演)  
2012年9月18日~21日  
名古屋国際会議場(愛知県)

生沼泉、根岸学  
神経突起形成における R-Ras サブファミリーの役割  
第84回日本生化学会大会(招待講演)  
2011年9月21日

[その他]

研究室ホームページ  
<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/negishi/j/toppu.html>

研究者個人ページ  
<http://sakura.canvas.ne.jp/>

報道関係情報

2012年6月13日(京都新聞(夕刊6面))  
**The Journal of Neuroscience**に掲載された論文の内容に関して、京都新聞(夕刊6面)に、「神経細胞の成長制御-再生応用に期待」というタイトルの記事として報道された。

2012年8月6日(読売新聞の科学 MONDAY(朝刊31面))  
われわれの近年の semaphorin による神経軸索の伸長阻害作用の分子メカニズムに関する研究内容について、当該分野の他の日本人研究者の研究成果とともに、新聞報道された。

アウトリーチ活動情報

生沼泉

第44回滋賀県立成人病センター、公開講座、  
2012年11月（滋賀県立成人病センター）  
標題：セマフォリンによるナビゲーションシ  
ステム

6．研究組織

(1)研究代表者

生沼 泉 (OINUMA, Izumi)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：4045297