

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700392

研究課題名(和文) Dock familyの分子制御機構と神経系における機能解明

研究課題名(英文) The analysis of molecular mechanism of Dock family protein in neurons

研究代表者

渡邊 快記(WATANABE, Hayaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・研究員

研究者番号：70595587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Dock3分子が網膜神経節細胞の保護や視神経軸索の再生に与える影響を調べることで、国内での失明原因1位の緑内障や視神経炎の発症抑制ならびに治療へと応用することを目的としている。申請者はRho family GTPaseの1つであるRac1を制御する Dock3の分子機能について培養細胞を用いた遺伝子発現実験を利用して調べた。その結果、Dock3はリン酸化修飾によってGEF活性が制御されていることが明らかとなった。また、Dock3の活性はシグナル上流のRhoGによって制御されており、TrkB-RhoG-Dock3シグナル経路が軸索伸長に寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Dock3, a new member of the guanine nucleotide exchange factor family, causes cellular morphological changes by activating the small GTPase Rac1. Overexpression of Dock3 in neural cells promotes neurite outgrowth through the formation of a protein complex with Fyn and WAVE downstream of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signaling. We found a novel Dock3-mediated BDNF pathway for neurite outgrowth. Dock3 forms a complex with Elmo and activated RhoG downstream of BDNF-TrkB signaling and induces neurite outgrowth via Rac1 activation in PC12 cells. In addition, Dock3 phosphorylation in Rac1 activation is important. We found that two key events that are necessary for efficient Dock3 phosphorylation, membrane recruitment of Dock3 and interaction of Dock3 with Elmo. These results suggest that Dock3 plays important roles downstream of BDNF signaling in the central nervous system where it stimulates actin polymerization by multiple pathways.

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：Dock3 緑内障 アクチン

1. 研究開始当初の背景

グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) は Rho ファミリー (Rac1, Cdc42, RhoA) の活性を制御することにより、細胞骨格の1つであるアクチン繊維の再構築を調節している。GEF には Dbl- homology (DH) domain と呼ばれる共通の触媒領域が存在すると考えられてきた。しかし近年になって DH domain を欠く新たな GEF として Dock family が発見され、現在までに知られている 11 分子 (Dock1-11) はいずれも DHR1 および DHR2 という特徴的な領域を持っている。その中でも Dock1 はアポトーシス細胞の食作用、筋芽細胞の融合などに重要な役割を持ち、そのシグナルネットワークに関しては国内外の研究者によって比較的多くの研究がなされている (Laurin *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008 他)。また Dock2 はリンパ球の走化性に、Dock4 の変異は様々な癌の発生や転移に関与することが報告されており、Dock family の生理活性は多岐に渡ることが予想される (Côté and Vuori, *Trends Cell Biol*, 2007)。このような Dock family のうち、本研究では特に精神・神経疾患との関わりが注目される Dock3 を中心に研究を進める。

Dock3 はアルツハイマー病の原因遺伝子産物である presenilin に結合する新規タンパク質として発見され、アミロイド前駆体タンパク (APP) の分解を促進することや、アルツハイマー病患者の脳で減少することが報告されたが、病態との関係は不明のままである (Chen *et al.*, *J Cell Biol*, 2002)。その後 Dock3 は中枢神経系に分布し、Rac1 を特異的に活性化する GEF であることが当研究グループから報告された (Namekata *et al.*, *J Biol Chem*, 2004)。この結果から Dock3 はアクチン繊維の再構築を促進することにより、神経軸索の形成に関与することが推測される。しかしながら Dock3 欠損マウスの軸索変性は極めて軽微であるという報告がなされたことから (Chen *et al.*, *J Neurosci*, 2009) より詳細な機能解析が必要となった。その後の研究により Dock3 を含む Dock1-4 の DHR2 領域にはほぼ共通のアミノ酸配列を持つ活性中心が存在することが解明され (Namekata *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010)、Dock3 欠損マウスの軸索変性が軽度である理由を説明することが可能となった。また Dock3 は神経栄養因子 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の下流で軸索伸長に寄与するが、その際に Dock3 のリン酸化修飾が重要な役割を担う可能性を見出し

ている。そこで本研究ではリン酸化による Dock3 の活性調節機構の解明を進めるとともに、アルツハイマー病等で生じる神経細胞死や軸索変性に対する神経保護および再生療法に Dock3 が有用であるかを検討する。

2. 研究の目的

本研究ではアクチン繊維の再構築を制御するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) のうち、近年注目される Dock family 分子に関する機能研究を行う。中でも精神・神経疾患の原因となる Dock3 と Dock8 に着目し、両者のシグナル伝達機構の解析を通して、神経発生および神経変性疾患に与える影響を解明する。この目的を達成するためにリン酸化 Dock3 抗体、Dock3 過剰発現 (Tg) マウスを活用する。これらの遺伝子改変動物を利用した疾患モデル動物を解析することにより、最終的にはアルツハイマー病や脱髄疾患などに対する神経保護・軸索再生療法において、Dock family 分子の機能を活用することを目的とする。

Rac1 の下流ではアクチンの重合を促進する WAVE (WASP family verprolin-homologous protein) が活性化され、成長円錐の葉状仮足形成を引き起こす。申請者らは Dock3 が細胞質中で WAVE と複合体を形成し、自らの移動に伴って WAVE を細胞膜近傍まで輸送することを見出している。つまり Dock3 は単に Rac1 活性を高めるだけでなく、WAVE の膜輸送によって効率良くアクチン重合を促進するものと予想されるが、細胞膜上でリン酸化修飾を受けた際には WAVE を解離する。そこで申請者はこの Dock3 リン酸化機構を詳細に検討する目的で、すでに約 400 カ所のリン酸化候補部位に関するスクリーニング解析を行い、2カ所のリン酸化部位を同定した。さらに現在までに各々のリン酸化 Dock3 抗体の作製を進めている。アフリカミドリザル腎線維芽細胞で WT Dock3 とリン酸化部位に変異を入れた非リン酸化型 Dock3 を発現させてウエスタンブロッティング法を行ったところ、それぞれの抗体がリン酸化を特異的に認識することを確認した。さらに、Dock3 の主要な結合分子である Elmo よってリン酸化が増強されることを見いだしている。Dock3 のシグナル伝達にリン酸化がどのように関与しているのかを解明する。

3. 研究の方法

マウス初代神経細胞を利用して、軸索先端の成長円錐における Dock3 と GSK-3 の局在変化を調べることににより、軸索伸長効果との関連について検討した。また、GSK-3 の活性は APC や CRMP-2 のリン酸化状態を解析することにより間接的に測定する。リン酸化 adenomatous polyposis coli (APC) よび collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) を特異的に認識する抗体による細胞染色を行い、Dock3 が GSK-3 の活性に与える影響を検討した。

また、これまでの我々の解析から、Dock3 のリン酸化は Elmo によって制御されている可能性が示唆された。そこで、培養 Cos7 細胞に Dock3 および Elmo を共発現させて、Dock3 のリン酸化状態をウェスタンブロットで解析を行った。さらに、リン酸化された Dock3 において GEF 活性を測定することによって、Dock3 の機能がリン酸化で制御されていることを明らかにした。

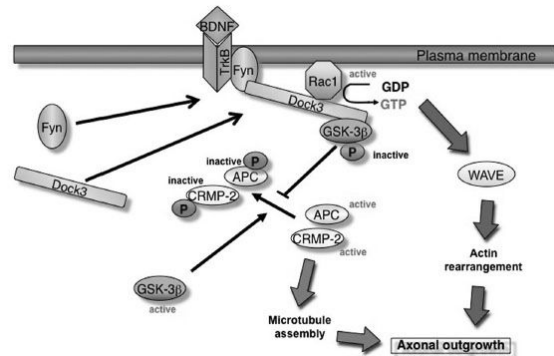
4. 研究成果

Rac1 の下流ではアクチンの重合を促進する WAVE と呼ばれる蛋白が活性化され、葉状仮足形成を引き起こすことが知られている。研究の過程で我々は Dock3 が細胞質中で WAVE と複合体を形成し、しかもその結合部位はこれまで十分に機能が解明されていない DHR1 領域であることを見出した。Dock3 と WAVE 蛋白の複合体は BDNF の刺激によって成長円錐の細胞膜に輸送され、また Dock3 は細胞膜上でリン酸化を受ける。リン酸化 Dock3 は Rac1 の活性を高める一方で、WAVE との結合能は大きく低下していた。WAVE が細胞膜上で Rac1 と結合してアクチン繊維を活性化することを考慮すると、Dock3 は自ら Rac1 活性を高めるだけでなく、細胞膜近傍に WAVE を供給するというダブル作用で効率良くアクチン繊維の重合と軸索伸長を促進している可能性がある。

一方、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3

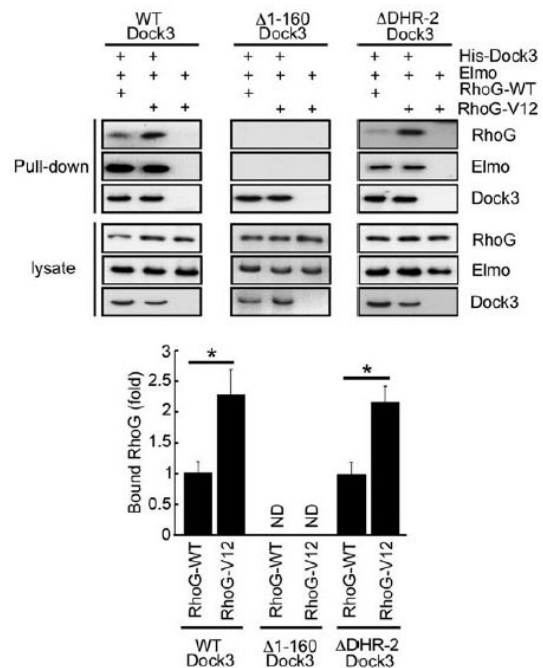
(glycogen synthase kinase-3, GSK-3) は β -catenin やタウ蛋白などを含む広範囲にわたるタンパク質をリン酸化するセリン/スレオニンキナーゼであり、糖尿病やアルツハイマー病などへの関与が知られている。しかし GSK-3 は下流の CRMP-2 のリン酸化を介して神経極性を制御することが明らかになっており、軸索伸長メカニズムにも寄与することが推定される。我々は Dock3 が DHR2 領域の近傍で GSK-3 と結合し、リン酸化(不活化)を誘導することを明らかにした。リン

酸化 GSK-3 は CRMP-2 に加えて APC を活性化し、その結果として微小管の重合を促進したが、Rac1 活性には変化を与えなかった(図1)。以上から Dock3 は GEF 活性非依存的な経路によっても、細胞骨格の制御が可能であることが示された (Journal of Neuroscience, 2012)。



(図1) Dock3による微小管重合制御

また、Dock3 は BDNF によって活性化される RhoG および Elmo と細胞膜上で三量体を形成することによって(図2)、効率よく Rac1 活性を高めることも確認した (Genes to Cells, 2012)。



(図2) Dock3-Elmo-RhoGによる3量体形成. Dock3のN末端領域がElmoと結合する。

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 3件)

1. Namekata K, Watanabe H, Guo X, Kittaka D, Kawamura K, Kimura A, Harada C, Harada T.
Dock3 regulates BDNF-TrkB signaling for neurite outgrowth by forming a ternary complex with Elmo and RhoG. Genes Cells. 17 (8): 688-97, 2012
査読有り
2. Namekata K, Harada C, Guo X, Kimura H, Kittaka D, Watanabe H, and Harada T.
Dock3 stimulates axonal outgrowth via GSK-3 β -mediated microtubule assembly. Journal of Neuroscience 32 (1): 264-274, 2012
査読有り
3. 行方和彦、原田知加子、郭 暁麗、木村敦子、橋高大二、渡邊快記、原田高幸.
Dock3 はグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 (GSK-3 β) による微小管重合を介して軸索伸長を促進する.
日本眼科学会誌 116(5), 527, 2012.
査読有り

[その他]

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 快記 (WATANABE, Hayaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・

運動・感覚システム研究分野・

研究員

研究者番号：70595587

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし