

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17079003
 研究課題名（和文） 低分子量 G 蛋白質間のコミュニケーションを介する神経回路形成の機構解析
 研究課題名（英文） A role of interactive actions of small GTPases in the formation of neural network
 研究代表者
 根岸 学（NEGISHI MANABU）
 京都大学・生命科学研究所・教授
 研究者番号：60201696

研究成果の概要（和文）：神経回路形成の基本的な過程である軸索ガイダンスに、低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーや Ras ファミリーが重要な役割を果たしている。我々は、代表的な反発性の軸索ガイダンス分子、Sema4D の受容体、Plexin-B1 が R-Ras GAP を直接コードし、R-Ras の活性を抑制することにより、軸索の反発作用を発揮することを明らかにしてきた。我々は、R-Ras GAP の下流の情報伝達機構を解析し、Sema4D/Plexin-B1 が R-Ras によるインテグリン活性化を抑制することにより、反発作用を発揮することを明らかにした。また、R-Ras によるインテグリンの活性化は、R-Ras が Myo7 に結合し、モーター活性を促進し、インテグリンを細胞膜先端に運ぶことにより引き起こされることを明らかにした。一方、Sema4D/Plexin-B1 は R-Ras GAP の下流で、PTEN の活性化、Akt の不活性化、GSK3b の活性化、CRMP-2 のリン酸化による微小管重合作用の阻害により、軸索の反発作用を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Small GTPases play important roles in the formation of neural network, especially axon guidance. We recently reported that the Sema4D receptor, Plexin-B1, suppresses PI3 kinase signaling through R-Ras GAP activity, inducing growth cone collapse. We then revealed that Sema4D/Plexin-B1 suppresses PI3 kinase activity but stimulates PTEN activity, leading to Akt activity suppression, GSK3b activation and CRMP-2 phosphorylation and then promotes growth cone collapse in hippocampal neurons. Sema4D/Plexin-B1 suppresses the ECM-dependent R-Ras activation and R-Ras-mediated integrin activation through R-Ras GAP activity. We also revealed that R-Ras binds to Myo7a and stimulates its motor activity, promoting trafficking integrin to the leading edge of plasma membrane and then induces resultant integrin activation. We here propose that Sema4D/Plexin-B1 suppresses R-Ras-mediated Myo7a stimulation and trafficking integrin to the plasma membrane, leading to integrin inactivation and subsequent axon repulsion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,400,000	0	9,400,000
2006年度	18,800,000	0	18,800,000
2007年度	16,900,000	0	16,900,000
2008年度	16,900,000	0	16,900,000
2009年度	16,900,000	0	16,900,000
総計	78,900,000	0	78,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：plexin、semaphorin、R-Ras、Rho、軸索ガイダンス、ephrin

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は特異的な極性を有する細胞で、その特徴的な構造である神経突起を介して互いに接着し、複雑な神経回路を形成し、高次脳機能の発現を可能にしている。神経突起の成長発達は、神経発生や神経再生、神経可塑性の過程で、極めて重要なステップである。近年、神経突起の伸長や退縮を調節する機構が少しずつ明らかにされ、低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーや Ras ファミリーが神経突起形成に深く関与していることが示唆され、その機能の障害は精神遅滞など様々な神経疾患を引き起こすことがわかってきた。Rho ファミリーの中で全身に発現しており、比較的よく研究が進んでいるのは、Rho、Rac1、Cdc42 で、Rho は神経突起の退縮を、Rac1 と Cdc42 は突起伸長に関与することが知られている。Rho ファミリーには多くの種類が存在するが、Rho、Rac1、Cdc42 以外の Rho ファミリーの神経機能はほとんど不明である。我々は、別の Rho ファミリー、RhoG が Rac1、Cdc42 の上流で働き、これらの G 蛋白質を活性化して神経突起を伸長させること、また、RhoG の特異的なエフェクターとして Elmo を同定し、RhoG-Elmo-Dock180 が Rac1 を活性化して神経突起伸長に関与することを明らかにした。一方、代表的な反発性の軸索ガイダンス因子、Sema4D の受容体、Plexin-B1 の細胞内領域が R-Ras に対する GAP を直接コードし、Sema4D/Plexin-B1 が R-Ras の活性を抑制し、神経軸索の反発を引き起こすことを明らかにした。さらに、この R-Ras GAP 活性の発現には、Rho ファミリーの中の Rnd サブファミリーに含まれる Rnd1 が Plexin-B1 の細胞内領域に結合することが必須であることがわかった。

2. 研究の目的

本研究は、Rho ファミリーや Ras ファミリーの個々の G 蛋白質の機能の解析の上に、それらの密接なコミュニケーションが神経回路形成において果たす役割を明らかにし、神経回路形成における低分子量 G 蛋白質群の機能を統合的に理解し、体系づけていくことを目的とする。

3. 研究の方法

Sema4D/Plexin-B1 による反発作用は、R-Ras

によるインテグリン活性化の抑制を介して発揮されるが、R-Ras によるインテグリン活性化機構は全く不明である。そこで、R-Ras のインテグリン活性化のエフェクターをクローニングするため、酵母 two-hybrid 法、アフィニティーカラム法やホモロジースクリーニング法などを用いてスクリーニングを行った。

Rho ファミリー、Ras ファミリーや Sema/Plexin のシグナル伝達経路に関わる分子の神経軸索ガイダンスにおける機能を解析するため、胎生 18 日のラット胎児の脳より海馬および大脳皮質を取り出し、採取した神経細胞を初代培養し、様々な cDNA をリポフェクトアミン法や nucleofection 法を用いてトランスフェクションし、発現させて機能解析を行った。

4. 研究成果

我々は、これまでに Sema4D の受容体、plexin-B1 の細部内領域が R-Ras に対する GAP を直接コードし、R-Ras の活性を抑制し、R-Ras による軸索伸展作用を抑制することにより、成長円錐の消失を引き起こすことを明らかにしてきた。そこで、この反発作用の分子機構をさらに解析し、細胞が細胞外マトリックスに結合すると、R-Ras を活性化し、活性化された R-Ras がインテグリンを活性化することにより細胞膜が伸展すること、そして、Sema4D/Plexin-B1 は R-Ras GAP 活性により R-Ras によるインテグリンの活性化を抑制し、細胞の運動を抑制することを見だし、このことにより、軸索の反発作用を発揮することを明らかにした。また、この活性には Rnd1 の Plexin-B1 への結合が必要であった。

ところで、R-Ras はインテグリンを活性化して軸索を伸展させるが、R-Ras がどのような機構でインテグリンを活性化するのは全く不明であった。そこで、R-Ras のインテグリン活性化機構を明らかにするため、活性型 R-Ras に結合する分子をスクリーニングした結果、ミオシンファミリーの 1 つ、Myo7 に活性型 R-Ras が特異的に結合することがわかった。Myo7 は 2 つの FERM ドメインを持ち、活性型 R-Ras は 1st-FERM ドメインに結合し、Myo7 のモーター活性を促進した。また、Myo7 の 2nd-FERM ドメインにはインテグリンが結合し、活性型 R-Ras-Myo7-インテグリンの 3

者複合体を形成し、R-Ras はインテグリンを細胞先端に運搬し、インテグリンを活性化することがわかった。このように、R-Ras は全く新しい分子機構でインテグリンを活性化することがわかった。

一方、軸索の反発作用には、微小管の脱重合が必要であることがわかっていて。そこで、まず、Sema4D/Plexin-B1 による R-Ras GAP 活性の下流でどのようなシグナル伝達機構で微小管脱重合の制御がなされているのかを解析した。神経軸索内での微小管の重合促進作用を有する CRMP-2 は GSK3b によりリン酸化され、その微小管重合促進作用は抑制される。GSK3b は常時活性型のリン酸化酵素であり、Akt によりリン酸化されてその活性が抑制される。Sema4D/Plexin-B1 による R-Ras GAP 活性が、R-Ras の活性を抑制し、R-Ras による PI3 キナーゼの活性化の抑制、Akt の活性を抑制し、GSK3b を活性化して CRMP-2 のリン酸化を促進し、CRMP-2 による微小管重合の促進作用を阻害することにより軸索の反発作用を發揮していることがわかった。さらに、R-Ras GAP 活性は Plexin-B1 を含む全ての Plexin に共通の分子機構であることが推定され、Sema3A/Plexin-A1 においても同様に R-Ras GAP 活性により Akt の活性抑制、GSK3b の活性化が引き起こされることを明らかにし、インテグリン活性の抑制と連携したこの機能が semaphorin の反発作用の重要な分子機構であることを明らかにした。

Ephrin は semaphorin と共に代表的な反発性の神経軸索ガイダンス因子である。Ephrin はその特異的な受容体、Eph 受容体に結合し、反発作用を發揮する。我々は、ephrin による神経軸索の反発作用の分子機構を明らかにするため、Ephrin B3-EphA4 の細胞内シグナル伝達における Rho ファミリーの役割を解析し、Ephrin B3 が EphA4 に結合して活性化すると、Rac1 の特異的な GAP である a-chimerin が EphA4 に結合し、Rac1 の活性を抑制し、Ephrin B3 による運動神経の軸索反発作用を發揮することを見いだした。また、a-chimerin の発現を抑制したマウスでは、運動神経の軸索ガイダンスが乱れ、正常な歩行ができなくなった。EphA は Ephexin-1 により RhoA を活性化するので、RhoA を活性する一方で、a-chimerin によって Rac1 の活性を抑制し、Rho ファミリーの正負の制御により軸索ガイダンスを行っていることが明らかになった。

脳神経系に主要に発現している Rho ファミリーの G 蛋白質の Rnd サブファミリーの一員である Rnd2 の特異的なエフェクターとして新奇な分子を酵母の two-hybrid 法によりスクリーニングし、Plagmin と命名した新奇の分子をクローニングした。Pragmin は Rnd2 の結合により RhoA を活性化し、RhoA-Rho キナ

ーゼの活性化により神経突起の退縮を引き起こした。一方で、Rnd1 は RhoA を抑制することが知られているので、Rnd1 と Rnd2 はお互いにアンタゴニスティックに働くことにより、RhoA の活性を制御することにより神経細胞の形態調節を行っているものと思われる。

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 24 件)

- ① Fujimoto, S., Negishi, M., and Katoh, H. RhoG promotes neural progenitor cell proliferation in mouse cerebral cortex. *Mol. Biol. Cell* (査読有), 20, 4941-4950 (2009)
- ② Saito, Y., Oinuma, I., Fujimoto, S., and Negishi, M. Plexin-B1 is a GTPase activating protein for M-Ras, remodeling dendrite morphology. *EMBO Rep.* (査読有), 10, 614-621 (2009)
- ③ Takeuchi, S., Yamaki, N., Iwasato, T., Negishi, M., and Katoh, H. β 2-Chimaerin binds to EphA receptors and regulates cell migration. *FEBS Lett.* (査読有), 583, 1237-1242 (2009)
- ④ Uesugi, K., Oinuma, I., Katoh, H., and Negishi, M. Different requirement of Rnd GTPases for R-Ras GAP activity of Plexin-C1 and Plexin-D1. *J. Biol. Chem.* (査読有), 284, 6743-6751. (2009)
- ⑤ Kuramoto, K., Negishi, M., and Katoh, H. Regulation of dendrite growth by the Cdc42 activator Zizimin1/Dock9 in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* (査読有), 87(16), 1794-1805 (2009)
- ⑥ Yamazaki, J., Katoh, H., and Negishi, M. Lysophosphatidic acid and thrombin receptors require both $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ to regulate axonal morphology in hippocampal neurons. *Biol. Pharm. Bull.* (査読有), 31(12), 2216-2222 (2008)
- ⑦ Ueda, S., Fujimoto, S., Hiramoto, K., Negishi, M., and Katoh, H. Dock4 regulates dendritic development in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* (査読有), 86(16), 3052-3061 (2008)
- ⑧ Iwasato, T., Katoh, H., Nishimaru, H., Ishikawa, Y., Inoue, H., Saito, Y., Ando, R., Iwama, M., Takahashi, R., Negishi, M., and Itohara, S. Rac-GAP a-chimerin regulates motor-circuit formation as a key mediator of Ephrin B3/EphA4 forward signaling. *Cell* (査読有), 130, 742-753 (2007)
- ⑨ Yamaki, N., Negishi, M., and Katoh, H. RhoG regulates anoikis through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent

- mechanism. *Exp. Cell Res.* (査読有), 313, 2821-2832 (2007)
- ⑩ Oinuma, I., Katoh, H., and Negishi, M. R-Ras controls axon specification upstream of GSK-3 β through integrin-linked kinase. *J. Biol. Chem.* (査読有), 282, 303-318 (2007)
- ⑪ Hiramoto, K., Negishi, M., and Katoh, H. Dock4 is regulated by RhoG and promotes Rac-dependent cell migration. *Exp. Cell Res.* (査読有), 312, 4205-4216 (2006)
- ⑫ Kakimoto, T., Katoh, H., and Negishi, M. Regulation of neuronal morphology by Toca-1, an F-BAR/EFC protein that induces plasma membrane invagination. *J. Biol. Chem.* (査読有), 281, 29042-29053 (2006)
- ⑬ Ito, Y., Oinuma, I., Katoh, H., Kaibuchi, K., and Negishi, M. *Sema4D/Plexin-B1* activates GSK-3 β via R-Ras GAP activity, inducing growth cone collapse. *EMBO Rep.* (査読有), 7, 704-709 (2006)
- ⑭ Oinuma, I., Katoh, H., and Negishi, M. Semaphorin 4D/Plexin-B1-mediated R-Ras GAP activity inhibits cell migration by regulating β 1 integrin activity. *J. Cell Biol.* (査読有), 173, 601-613 (2006)
- ⑮ Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. Small GTPase Rnd1 is involved in neuronal activity-dependent dendritic development in hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* (査読有), 400, 218-223 (2006)
- ⑯ Tanaka, H., Katoh, H., and Negishi, M. Pragmin, a novel effector of Rnd2 GTPase, stimulates RhoA activity. *J. Biol. Chem.* (査読有), 281, 10355-10364 (2006)
- ⑰ Katoh, H., Fujimoto, S., Ishida, C., Ishikawa, Y., and Negishi, M. Differential distribution of ELMO1 and ELMO2 mRNAs in the developing mouse brain. *Brain Res.* (査読有), 1073-1074, 103-108 (2006)
- ⑱ Nakamura, K., Yamashita, Y., Tamamaki, N., Katoh, H., Kaneko, T., and Negishi, M. In vivo function of Rnd2 in the development of neocortical pyramidal neurons. *Neurosci. Res.* (査読有), 54, 149-153 (2006)
- ⑲ Katoh, H., Hiramoto, K., and Negishi, M. Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *J. Cell Sci.* (査読有), 119, 56-65 (2006)
- ⑳ Tateiwa, K., Katoh, H., and Negishi, M. Socius, a novel binding partner of G α 12/13, promotes the G α 12-induced RhoA activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有), 337, 615-620 (2005)
- ㉑ Yamazaki, J., Katoh, H., Yamguchi, Y., and Negishi, M. Two G12 family G proteins, G α 12 and G α 13, show different subcellular localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有), 332, 782-786 (2005)
- ㉒ Harada, A., Katoh, H., and Negishi, M. Direct interaction of Rnd1 with FRS2 β regulates Rnd1-induced downregulation of RhoA activity and is involved in FGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* (査読有), 280, 18418-18424 (2005)

[学会発表] (計60件)

- ① 生沼 泉、根岸 学: 「G 蛋白質シグナル伝達の新たな概念化」 Molecular mechanism of integrin activation by R-Ras. : 第 82 回日本生化学大会、神戸国際会議場、神戸、2009 年 10 月 21~24 日
- ② 生沼 泉、根岸 学: 「神経突起の成長を制御するシグナル伝達系」 Semaphorin による神経軸索および樹状突起に対する反発作用の分子機構: 第 31 回日本神経科学大会、東京国際フォーラム、東京、2008 年 7 月 9~11 日
- ③ Negishi, M.: Signaling pathway of axon guidance factors, semaphorins, for repulsive response. EMBO Workshop : Semaphorin function & mechanisms of action : Abbaye Des Vaulex de Cernay, 8-11, May 2008
- ④ 根岸 学、生沼 泉、加藤裕教: 「形質膜と細胞骨格のインタフェイス」 神経軸索ガイダンス分子、セマフォリンの情報伝達機構 (Signaling pathway of axon guidance factors, semaphorins, for repulsive response): 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、パシフィコ横浜、横浜市、2007 年 12 月 11~15 日
- ⑤ 根岸 学: 「G 蛋白質シグナルによる神経機能制御」 神経軸索ガイダンス分子、セマフォリンの情報伝達機構: 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 公開シンポジウム 2005: 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所、春日井市、2005 年 12 月 16 日
- ⑥ 根岸 学、加藤裕教: 「細胞携帯と運動の制御」 Regulation of cell migration by RhoG-ELMO-Dock180 signaling pathway. : 第 28 回日本分子生物学会年会、Zepp Fukuoka、福岡・2005 年 12 月 7-10 日
- ⑦ 根岸 学、生沼 泉、加藤裕教: 「神経突起形成の分子機構」 Signaling mechanisms of axon guidance molecules, semaphorins. : 第 48 回日本神経化学会大会、JAL リゾート シーホークホテル福岡、福岡・2005 年 9 月 28-30 日
- ⑧ 根岸 学、生沼 泉、加藤裕教: 神経軸索ガイダンス分子、セマフォリンの情報伝達

機構：第6回長井長義記念シンポジウム、
徳島大学長井記念ホール、徳島・2005年
7月7～8日

⑨根岸 学：「新しい研究視野の提示」神経
軸索ガイダンス分子、セマフォリンの新しい
情報伝達機構の発見：日本分子生物学会
第5回春期シンポジウム、朱鷺メッセ 新
潟コンベンションセンター、新潟・2005
年5月15～17日

⑩根岸 学：神経軸索ガイダンス分子、セマ
フォリンの情報伝達機構：21世紀 COE
プログラム、免疫コロキウム、有馬グラン
ドホテル、神戸・2005年2月21日

[その他]

ホームページ：

[http://www.users.kudpc.kyoto-u.ac.jp/~p
51907/negishi/index.html](http://www.users.kudpc.kyoto-u.ac.jp/~p51907/negishi/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根岸 学 (NEGISHI MANABU)
京都大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：60201696

(2) 研究分担者

加藤 裕教 (KATO HIRONORI)
京都大学・生命科学研究科・准教授
研究者番号：50303847

生沼 泉 (OINUMA IZUMI)
京都大学・生命科学研究科・助教
研究者番号：40452297