

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19700346

研究課題名（和文） 神経幹細胞の増殖・分化に作用する ephrin-Eph シグナルの解析

研究課題名（英文） Molecular analysis of ephrin-Eph associated signaling pathways in the neural stem cell proliferation and differentiation

研究代表者

澤田 貴宏 (SAWADA TAKAHIRO)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・助教

研究者番号：00382325

研究成果の概要（和文）：FGF 受容体(FGFR)が Eph 受容体 A4 とヘテロ二量体として結合し、下流シグナルを増強することを発見したことを発端に、EphA4、FGFR および、FGFR の結合分子である FRS2 α を加えた3分子の相互作用を詳細に解明した。その結果、これらの3分子が三量体複合体を形成すること、また、複合体を介したシグナルが神経幹細胞の増殖・分化において非常に重要な役割を担っていることを発見した。さらに、FGFRがEphA4の下流分子である ephexin1 に直接作用し、Rho ファミリーを活性化することで神経細胞の遊走および形態変化を調節していることを発見した。これらの研究は、EphA4-FGFR の相互作用を軸としたシグナルが神経系細胞の増殖・分化・遊走において重要な機能をもっていることを示している。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated previously that FGFRs and EphA4 trans-activate each other by forming a heterodimer, and augment downstream signals through FRS2 α , a major docking protein of FGFRs, and MAP kinase. Based on these studies, I have studied the interaction domains among EphA4, FGFRs and FRS2 α , and trans-phosphorylation partners of the two receptor tyrosine kinases. EphA4 interacts directly with and phosphorylates not only FGFRs but also FRS2 α . From these interaction studies, it has become clear that EphA4, FGFR and FRS2 α compose a ternary complex, which plays an important role in proliferation and differentiation of neural stem cells. Furthermore, I also found that FGFR directly activates ephexin1, a downstream molecule of EphA4, which regulates migration and morphological changes of neuronal cells through activation of Rho family. These studies show that the interaction of EphA4 with FGFR functions as a molecular mediator for neural cell proliferation, migration and differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,200,000	720,000	3,920,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：細胞内情報伝達、神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼに含まれる増殖

因子受容体(FGFR, EGFR, PDGFR, IGF1R など)は、リガンドによる刺激を受けた後、ホモ二

量体を形成し、受容体およびその下流分子のチロシンがリン酸化されシグナルが下流に伝達される、とされていた。私達の研究室では FGFR に対して結合する新たな分子として、異なる受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する EphA4 を見だし、これらが互いの細胞内ドメインを介しヘテロ二量体を形成して相互に活性化することで下流シグナルを増強するという新規シグナル伝達様式を発見した。この発見を起点に EphA4 と FGFR によるクロストークの詳細な分子メカニズムと、それぞれの下流シグナル分子に対する影響を解明するため、さらに ephrin/Eph シグナルが幹細胞の増殖・遊走に関するという報告があることから、神経幹細胞に焦点を当て EphA4-FGFR クロストークシグナルの生理的作用を探究するため、本研究を開始した。

2. 研究の目的

(1) EphA4-FGFR のクロストーク

EphA4 と FGFR によるクロストークの詳細および下流シグナル分子の調節機構を解明し、細胞の増殖と遊走に対するクロストークの作用を調べる。

(2) EphA4 以外の Eph と FGFR とのクロストーク

タイプ A, B で計 16 クラス存在する Eph 受容体ファミリーは様々な細胞で多様な組み合わせで発現しており、EphA4 以外にも FGFR とクロストークをもつ可能性がある。EphA4 と比較し、各 Eph と FGFR とのクロストークの親和性および普遍性を調べる。

(3) EphA4-EGFR のクロストーク

EGFR シグナルは FGFR シグナルとともに神経幹細胞の増殖に深く関与している。EGFR も FGFR と同様に EphA4 と結合することを発見したことから、これらが相互作用し、下流シグナルを調節していると考えられる。EphA4-EGFR のクロストークを結合様式およびリン酸化を指標に解明し、シグナルの生物学的意義を調査する。

3. 研究の方法

(1) 各分子間の結合領域の特定、リン酸化部位および下流シグナルの変化に関しては組み換えタンパク質を用いた *in vitro* 実験および 293T 細胞での強制発現実験を行い、SDS-PAGE およびウエスタンブロット法で調べた。

①FGFR による EphA の下流分子である ephexin のリン酸化部位を特定するため、複数の Tyr/Phe 変異 ephexin 分子を作製し、FGFR との共発現実験を行った。また FGFR-ephexin シグナルの作用を調べるため、そのリン酸化 (活性化) ephexin をもちいて RhoA, Rac1, Cdc42 への作用を GDP exchange

assay にて測定した。さらに神経様モデル細胞 P12 に同変異 ephexin をレトロウイルスを用いて発現させ、形態の変化を観察した。

②FGFR-FRS2 α 結合ドメインは従来から知られており、本研究では EphA4-FRS2 α 結合ドメインを解明した。そのため、EphA4 の欠損分子を MBP 融合タンパク質として作製し、6xHis タグとの融合タンパク質として作製した FRS2 α との結合を *in vitro* で調べた。さらに、FGFR の傍細胞膜領域は EphA4 および FRS2 α と結合するが、その相対的位置関係は明確ではない。そのため、FGFR 傍細胞膜領域の N 端および C 端からの数アミノ酸毎の欠損分子を作製して Bait として使用し、FRS2 α および EphA4 細胞内ドメイン (Fish として使用) との結合を Yeast Two-Hybrid System を用いて調べた。

③EphA4-FGFR-FRS2 α 複合体シグナルの神経幹細胞における役割を調べるため、neurosphere 法で培養したマウス神経幹細胞に対し EphA4 のリガンドである ephrin-A1、FGFR のリガンドである FGF2、およびそれら両方で刺激を実施してその反応を増殖を指標に観察した。さらに EphA4 と FRS2 α を阻害する目的でそれぞれのドミナントネガティブ分子をレトロウイルスにより発現させ、同様にリガンドによる刺激実験をして増殖における複合体のはたらきを調査した。

(2) 神経幹細胞にはほぼ全ての EphA が発現しているが、EphA4 以外の Eph ファミリーが EphA4 と同様に FGFR と結合しているかは不明である。EphA4-FGFR の結合と比較するため、EphA4 (・JM, KD) (傍細胞膜ドメイン欠損、kinase 欠損変異 EphA4 分子) を各種 Eph および FGFR と共に 293T 細胞に高発現させ、そのことによるそれぞれの Eph の FGFR との結合およびリン酸化の阻害をウエスタンブロット法調べた。

(3) EphA4 と EGFR が結合することはこれまでに解明しており、Eph(KD) (kinase 欠損変異分子) および EGFR2(KD) を用いて、これらの EGFR(WT) および Eph(WT) による相互のリン酸化を 293T 細胞高発現実験で調べた。また、EphA4 と EGFR の結合領域を組み換えタンパク質を作製し *in vitro* 結合実験で調べた。さらに EphA4 と PDGFR、VEGFR 等との結合・リン酸化も同様に調査を進めている。

4. 研究成果

(1) EphA と FGFR による異なる受容体間の結合を見出したことから、EphA4-FGFR のクロストークによる両受容体それぞれの下流シグナルに対する影響を調べた。

①GEF (guanine nucleotide exchange factor) である ephexin は、EphA4 の下流分子であるが FGFR に直接結合することで作用を受けることを発見し、ephexin の変異体を用いて FGFR

によるチロシンリン酸化部位を特定し、そのリン酸化ephexinのRhoファミリーGTPaseへの作用を調べた。その結果、FGFRを介したephexinの活性化がRho familyのうち、RhoAのみの活性を増強することを発見した。これは神経細胞の伸展における反発作用を示唆するが、神経様モデル細胞であるPC12を用いた変異体発現実験において、RhoAの活性化から予期できる形態変化が観察された (*J. Biol. Chem* 282: 31103-12, 2007)。

②従来FGFRの下流分子として知られているFRS2 α がEphAと直接的な相互作用を持つのかどうかを検討した。その結果、FRS2 α はEphAと直接結合し、リン酸化を受けることを発見した。つまりこれはEphA、FGFR、FRS2 α の3分子が複合体を形成する事を示唆している。これら3分子の結合様式をYeast two-hybrid法とin vitro binding assayにて検討したところ、結合部位を特定し、それぞれが異なる部位で結合することを発見した。さらに培養細胞をもちいた発現実験においても3分子が同時に結合する事を示した。EphA4によるFRS2 α のリン酸化様式を調べたところ、FGFRによるFRS2 α リン酸化部位と比べ相違があることを発見した。このことはEphA4によるFRS2 α を介した独自のシグナル調節が行われている可能性を見出した。

③この3分子複合体を介したシグナルがもつ生物学的意義を調べるため、これら全てを発現しているマウス胚由来神経幹細胞をもちい、その増殖作用に及ぼす影響を検討した。両受容体のリガンドであるFGF2およびephrin-A1による刺激により増殖が亢進したが、EphAおよびFRS2 α のドミナントネガティブ分子を発現させることでリガンド刺激の有無に関わらずその増殖が顕著に阻害された。以上より、EphA4、FGFR、FRS2 α の3分子が複合体を形成することを明らかにし、この複合体を介したシグナルが神経幹細胞の増殖において重要な役割を担うという新たな知見を示した (*Genes Cells* 15, 297-311, 2010)。さらに、EphA4、FGFR、FRS2 α 複合体による神経幹細胞の分化への影響を検討した結果、EphAのリガンドであるephrin-A1での刺激により神経幹細胞が神経細胞へ分化誘導される事を免疫染色法により発見した。FGFRおよびEphA4によるFRS2 α のリン酸化部位の相違から、今後分化に作用する複合体下流シグナルの解析を進める。

(2) タイプA、Bで計16クラス存在するEphファミリーのうち、ヒト脳cDNAライブラリーより得られたEph (EphA1, A2, A3, A4, A5, A7, B4) と、FGFR1-4との結合を293T細胞での強制発現系で調べたところ、それぞれ異なる親和性で結合することが分かった。さらに活性型変異体EphA4存在下では、その他のEphの各FGFRへの結合が阻害される、あるいは変化し

ないという組み合わせが存在することを発見し、結合ドメインに相違があることが示唆された。さらに活性型変異体EphA4がEph-FGFRの結合だけでなくこれらの相互リン酸化をも阻害することを発見した。このことは、EphとFGFRの各メンバーの結合が、それぞれの決まったドメインを介しておこる普遍的な現象である事を示唆している。

(3) EphA4がEGFRとも結合し、リン酸化を受ける事を発見した。EphA4-EGFRのクロストークではEphA4はEGFRをリン酸化せず、一方向性であった。この発見はEphA4がFGFR以外の多様な受容体型チロシンキナーゼともクロストークをもつ事を示唆していることから、EphA4と各種受容体との結合およびリン酸化を、HEK293細胞を用いた強制発現系で調べた。その結果、EphA4はPDGFR α 、PDGFR β およびVEGFR2と結合を示し、特にPDGFR \cdot とは双方向性のリン酸化を示した。現在これらの受容体分子について詳細なクロストークの解析を進めており、血管新生や他の生命現象における当該クロストークの役割を調査する布石としている。

これらの研究でEph-FGFR-FRS2 α 複合体によるシグナル伝達が細胞の増殖・遊走に作用するだけでなく分化にも関与していることがわかり、幹細胞研究の観点から非常に重要であると考えられる。また、EphA4を中心とした多様な複合体形成とそのクロストークの存在が明らかである。これらを解析することは、様々な生命現象を調節する複雑なシグナル伝達の仕組みを解明するうえで重要であると考えられる。さらに本研究は同研究室の坂口が研究代表者になっている研究課題「脳内神経幹細胞の分化誘導によるパーキンソン病治療法の開発」と連携しており、本研究成果をフィードバックしている。

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 Masayuki Kawahara, Yasumasa Iwasaki, Kazushige Sakaguchi, Takafumi Taguchi, Mitsuru Nishiyama, Takeshi Nigawara, Machiko Kambayashi, Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Masayasu Miyajima, Yoshio Terada, Kozo Hashimoto, Toshihoro Suda. Involvement of GCMB in the transcriptional regulation of the human parathyroid hormone gene in a parathyroid-derived cell line PT-r: Effects of calcium and 1,25(OH) $_2$ D $_3$. *Bone* (2010) 47, 534-541, 査読有
- ② Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Yueqiang Zhang, Emi Shimada, Hideyuki

Yokote, Masayasu Miyajima, and Kazushige Sakaguchi. Ternary complex formation of EphA4, FGFR and FRS2 α plays an important role in the proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells. *Genes Cells* 15 (2010) 297-311, 査読有

- ③ Yueqiang Zhang, Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Hideyuki Yokote, Xiaomei Yan, and Kazushige Sakaguchi. Regulation of Ephexin1, a guanine nucleotide exchange factor of Rho family GTPases, by FGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 31103-31112, 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Masayasu Miyajima, Emi Shimada and Kazushige Sakaguchi. Signaling through the ternary complex of EphA4, FGFR, and FRS2 α . 2nd Eph/Ephrins and Cancer Meeting, Winston-Salem Marriott, Winston-Salem, North Carolina, USA June 21-22, 2010
- ② 京雪楓 三輪英人 澤田貴宏 横手秀行 村垣泰光 中西一郎 近藤智善 宮嶋正康 坂口和成、Ephrin-A1-mediated transformation of the subventricular neural stem cell niche leading to dopaminergic neurogenesis in the dopamine-depleted striatum、第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月 11 日、パシフィコ横浜
- ③ 澤田貴宏 京雪楓 横手秀行 張月強 島田栄美 坂口和成、Eph-FGFR-FRS2 α の複合体を介するシグナル伝達、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、平成 20 年 12 月 11 日、神戸ポートアイランド
- ④ 宮嶋正康 京雪楓 澤田貴宏 飯田啓二 村垣泰光 島田栄美 千原和夫 坂口和成、Dwarfism caused by a defect in a novel growth hormone signaling pathway、90th The Endocrine Society's Annual Meeting、平成 20 年 6 月 18 日、サンフランシスコ
- ⑤ 宮嶋正康 京雪楓 村垣泰光 飯田啓二 千原和夫 澤田貴宏 張月強 坂口和成、GH シグナル伝達不全に基づく小人症モデルとしての EphA4 ノックアウトマウス、第 24 回日本内疾患モデル学会総会、平成 19 年 9 月 1 日、つくば国際会議場

[産業財産権]

- 出願状況 (計 1 件)

名称：中枢神経障害治療剤及び中枢神経障害の治療方法

発明者：坂口和成、京 雪楓、三輪英人、澤田貴宏

権利者：坂口和成

種類：国際特許

番号：PCT0711601

出願年月日：平成 20 年 2 月 1 日

国内外の別：両方

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 貴宏 (SAWADA TAKAHIRO)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・助教

研究者番号：00382325

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者