

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19209002

研究課題名（和文） 神経回路形成における低分子量 G 蛋白質の機能解析

研究課題名（英文） A role of small GTPases in the formation of neural network system

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）：我々は、plexin 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、神経軸索の反発作用を引き起こすことを明らかにしてきた。そこで、さらに、R-Ras GAP 活性の下流の情報伝達機構を解析した。PI3 キナーゼの活性抑制と PTEN の活性化を引き起こし、その結果として Akt の活性抑制、GSK3b の活性化を介した CRMP-2 のリン酸化による CRMP-2 の微小管重合促進作用の阻害により軸索反発作用を発揮していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Plexins are receptors for axonal guidance molecules semaphorins. We recently reported that the Sema4D receptor, Plexin-B1, suppresses PI3 kinase signaling through R-Ras GAP activity, inducing growth cone collapse. PIP3 level is critically regulated by PI3 kinase and PTEN. 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. On the other hand, the expression of M-Ras, another member of R-Ras subfamily, is upregulated during dendritic development, and M-Ras is required for the denrite outgrowth. Sema4D/Plexin-B1 shows M-Ras GAP activity and suppresses dendrite outgrowth through M-Ras GAP activity. Thus, Plexin-B1 is a dual functional GAP for R-Ras and M-Ras, remodeling axon and dendrite morphology, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	17,100,000	5,130,000	22,230,000
2008年度	12,600,000	3,780,000	16,380,000
2009年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
年度			
年度			
総計	37,800,000	11,340,000	49,140,000

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、M-Ras、Rho、軸索ガイダンス

1. 研究開始当初の背景

記憶や学習など複雑な高次脳機能を可能にしているのは、神経細胞がその特徴的な構造である神経突起を伸ばし、互いに接着することにより形成される複雑な神経回路による。神経回路は、神経細胞が通常、細胞体から1本の軸索と複数の樹状突起を伸ばし、目的のターゲット細胞に到達して形成して、複雑なネットワーク回路を形成して完成する。この神経回路網の基本構造は正確で厳密に形成されるが、それは神経細胞より伸長した軸索を正確にターゲット細胞に誘導する軸索ガイダンス分子の誘導作用による。

軸索ガイダンス分子の中で、**semaphorin** は代表的な反発性のガイダンス分子であり、その特異的な細胞膜1回貫通型の受容体、**plexin** を介して軸索の反発作用を発揮する。**Plexin** には **Plexin-A**、**B**、**C**、**D** の4つのサブファミリーがあり、**plexin** の情報伝達機構として最初に明らかにされたことは、**Plexin-B** のC末端のPDZ結合モチーフに、**Rho** の活性化因子、**PDZ-RhoGEF** が結合し、**RhoA** を活性化して軸索の退縮を引き起こして反発作用を発揮することであった。しかし、PDZ結合モチーフはBタイプのみ保存されており、**plexin** ファミリー全体の共通の機構とは考えにくかった。我々は、**Sema4D** の受容体、**PlexinB1** で、**plexin** ファミリー全体に共通によく保存されている領域が **Ras** ファミリーの1つ、**R-Ras** に対する **GAP** を直接コードしており、細胞膜を伸展させる **R-Ras** の活性を抑制することにより軸索の成長円錐の退縮を引き起こすことを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究は、**semaphorin/plexin** の神経細胞内でのシグナル伝達における **Ras** ファミリーの機能と役割を統合的に理解し、神経回路形成に必須な神経軸索ガイダンス分子の受容体のガイダンス作用の情報伝達機構を分子レベルで解析し、神経軸索ガイダンスの分子メカニズムを明らかにし、神経軸索ガイダンス分子により精密で正確に形成される機能的な神経回路網の成立過程の基本となる分子基盤の解明につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

4つの **plexin** サブファミリーの情報伝達機構の共通性と差異性を明らかにするため、**Plexin-C1**、**Plexin-D1** のcDNAをPCR法でクローニングし、様々な変異体をやはりPCR

法で作成し、それらの **R-Ras GAP** 活性発現機構を生化学的に解析した。

Plexin サブファミリーの神経軸索ガイダンスシグナルを調べるため、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をリボフエクトアミン法や **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

semaphorin はその特異的な受容体、**plexin** を介して軸索に反発作用を引き起こす。我々は、これまでに、**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、**R-Ras** の活性を抑制し、**R-Ras** による **インテグリン** の活性化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。また、**R-Ras GAP** 活性の下流で、**Akt** の活性抑制、**GSK3b** の活性化を介した **CRMP-2** のリン酸化による、**CRMP-2** の微小管重合促進作用の阻害による成長円錐の消失を引き起こすことを明らかにしてきた。**R-Ras** の代表的なエフェクターは **PI3** キナーゼであり、**R-Ras** による **PI3** キナーゼ活性化の抑制による **PIP3** 量の低下が、上記のシグナル伝達につながると考えられた。しかし、**PIP3** 量は合成酵素である **PI3** キナーゼ活性と分解酵素である **PTEN** の2つの酵素活性のバランスで決まっている。そこで、**Sema4D/Plexin-B1** が **PTEN** の活性に対し何らかの調節作用を示すのかを検討した。ラット海馬神経細胞において、**Sema4D/Plexin-B1** は、**PTEN** の脱リン酸化を促進し、**PTEN** の細胞質から細胞膜への移行を促進し、細胞膜で機能を発現するようになった。また、**Sema4D** は *in vitro* で **PTEN** の酵素活性を促進した。さらに、**PTEN** のリン酸化機構について検討し、**カゼインキナーゼ2** が **PTEN** をリン酸化すること、また、**R-Ras GAP** 活性は *in vitro* で **カゼインキナーゼ2** の酵素活性を抑制し、これにより **PTEN** の脱リン酸化が引き起こされていることがわかった。したがって、**Sema4D/Plexin-B1** はその **R-Ras GAP** 活性を介し、**カゼインキナーゼ2** の活性を抑制し、**PTEN** の脱リン酸化、その活性化により **PIP3** 量の低下を引き起こし、神経軸索の反発作用を発揮することがわかった。

Plexin には4つのサブグループ、**Plexin-A**、**B**、**C**、**D**が存在するが、**Plexin-A**と**B**サブグループの細胞内情報伝達機構については、比較的よく研究されてきたが、**Plexin-C**と**D**に関して、その分子機構についてはほとんど不

明であった。そこで、Plexin-C1 と Plexin-D1 の R-Ras GAP 活性とその調節機構について解析した。Plexin-A と Plexin-B の R-Ras GAP 活性発現には、Rho ファミリーの Rnd サブグループ (Rnd1, 2, 3) の Rnd1 の結合が必須である。そこで、Plexin-C1 と Plexin-D1 の R-Ras GAP 活性の Rnd 依存性を調べた結果、plexin-D1 には Rnd2 が特異的に結合し、R-Ras GAP 活性に必須であるが、Plexin-C1 ほどの Rnd も R-Ras GAP 活性発現に必要ではなかった。これらのことから、4つの Plexin サブグループは、R-Ras GAP 活性を発揮するが、その活性発現における Rnd の依存性が異なり、Plexin-A と B は Rnd1、Plexin-D1 は Rnd2、Plexin-C1 は非依存性と、その活性調節機構において異なることがわかった。

軸索は、様々な軸索ガイダンス分子に導かれて伸長し、目的のターゲット細胞に到達し、複雑な神経回路を形成する。一方、神経細胞は、複数の樹状突起を伸長し、軸索と接着することにより、シナプスを形成する。そのため、樹状突起の形成調節は正確な神経回路形成にとって重要なステップとなる。我々は、神経軸索ガイダンス分子、Semaphorin の受容体、plexin は R-Ras GAP 活性を発揮し、神経軸索の反発作用を発揮することを明らかにしてきた。R-Ras は、Ras ファミリーの中で、M-Ras、TC21 と共に R-Ras サブファミリーを形成している。そこで、他の R-Ras メンバーの対する Plexin-B1 の GAP 活性を調べた結果、Plexin-B1 は、TC21 に対しては GAP 活性を示さなかったが、M-Ras に対しては強い GAP 活性を示した。そこで、M-Ras の神経細胞の形態における役割を解析した。初代培養大脳皮質細胞において、M-Ras は樹状突起形成期以降に強く発現し、M-Ras を shRNA でノックダウンすると、樹状突起伸長と分枝化が抑制され、M-Ras の常時活性型変異体、M-Ras-QL を発現させると、樹状突起の伸長と分枝化が促進された。また、Sema4D/Plexin-B1 は M-Ras 活性を抑制し、樹状突起の伸長と分枝化を抑制した。これらのことから、Sema4D/Plexin-B1 は、2つの異なる R-Ras サブファミリーの G 蛋白質の活性を調節し、R-Ras GAP 活性により軸索を、M-Ras GAP 活性により樹状突起の調節を行っていることがわかった。

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 1 1 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 Nakase, I., Tadokoro, A., Kawabata, N., Takeuchi, T., Katoh, H., Hiramoto, K., Negishi, M., Nomizu, M., Sugiura, Y., and Futaki, S. Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry* (査読有), 46, 492-501 (2007)
- ⑪ 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)

[学会発表] (計 3 4 件)

- ①生沼泉、根岸学：第 82 回日本生化学大会「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. 神戸国際会議場、神戸、2009 年 10 月 21～24 日
- ②生沼泉、根岸学：第 31 回日本神経科学大会：「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：東京国際フォーラム、東京、2008 年 7 月 9～11 日
- ③Negishi, 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：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：「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) : パシフィコ横浜、横浜市、2007 年 12 月 11～15 日

[その他]

ホームページ：

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