

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・付置研究所・助教

研究者番号：00382325

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. 研究計画の概要

私達はチロシンキナーゼ型受容体の1つである EphA4 が、異なるファミリーに属する受容体である FGFR とヘテロ複合体を形成し、この複合体がそれぞれの受容体の下流シグナルを増幅・制御していることを発見した。このシグナルの下流には Ras-MAPK 経路および Rho-family Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF)である ephexin を介する経路が存在する。Ras-MAPK は、受容体複合体とは FRS2 というドッキング蛋白分子を介して繋がっており、ephexin は受容体複合体に直接結合している。これらの知見をもとに、複合体シグナルの詳細な分子メカニズムと幹細胞の増殖・分化・遊走における役割を解明することを目的とし、下記の研究計画を進めている。

(1)従来 FGFR のドッキング蛋白と考えられていた FRS2 が EphA4 と直接結合することが判明したため、これら3分子のそれぞれの結合部位を特定するための実験を施行する。(2)EphA4-FGFR 複合体から下流へのシグナル伝達で重要な働きをする FRS2 はリン酸化されるべき複数の Tyr を保持しているが、EphA4 と FGFR により異なる部位の Tyr のリン酸化を受けることが予備実験で判明している。このため、(1)の結果を用いて結合ドメインを阻害する分子を細胞内で発現させ、それぞれの分子の複合体への組み込みを特異的にブロックすることにより、下流シグナルへの影響を調べる。(3)ephexin が EphA4 のみに結合してその作用を受けるという従来の考え方とは異なり、FGFR からも作用を受けるとを発見したことから ephexin が FGFR によりリン酸化を受ける Tyr を決定し、

そのリン酸化 ephexin の RhoGTPase への作用を調べる。また、このシグナルは細胞の遊走および軸索の伸展に関係するため、その観点から神経系細胞への作用を調べる。(4)他の Eph 受容体と FGFR との結合能および結合部位を、293 細胞を用いた共発現実験等の手法で調べる。(5)神経幹細胞の増殖および分化における EphA4-FGFR 複合体シグナルの作用を調べる。(6)EphA4 が FGFR 以外の増殖因子受容体との結合を示す結果が得られていることから、特に EGFR とのクロストークを調査し、これらの結合ドメインの決定と神経幹細胞の増殖・分化に及ぼす影響について調べる。

2. 研究の進捗状況

(1)変異型 ephexin を用いて FGFR による Tyr 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**, 31103-31112, 2007)。(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 293 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。また、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。

(3)従来 FGFR の下流分子として知られている FRS2 が EphA と直接結合し、リン酸化を受けることを発見した。さらにそれら受容体による FRS2 のリン酸化部位に相違があることを発見し、EphA4、FGFR による FRS2 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。(4)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、それぞれ異なる部位で結合を示し、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。(5)マウス胚由来神経幹細胞をもちい、複合体の増殖作用に及ぼす影響を検討した結果、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、EphA4 および FRS2 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 (*Genes Cells*, 15, 297-311, 2010)。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

当初の研究計画に盛り込んだ仮説に沿って研究を進めたところ順調に研究結果が得られ、シグナル分子複合体形成のメカニズムの詳細と、神経細胞および神経幹細胞における複合体の役割について多くを解明する事が出来た。また、同研究室の坂口が研究代表者である研究課題「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」に、これらの研究成果が大きく寄与したと考えられる。

4. 今後の研究の推進方策

当初の研究計画に従い、現在までに得られた成果に関連して下記の 2 点についてさらに研究を推進する予定である。

(1)Eph-FGFR 複合体を介したシグナル伝達のメカニズムと神経幹細胞の増殖における役割については一定の成果が得られている。現在得られている未発表のデータより、この複合体を介して下流シグナルの調節が行なわれることで増殖または分化への方向性が決定されるということが示唆されている。そのため複合体シグナルによる分化への影響を詳細に調べると同時に、増殖と分化におけるシグナル様式の相違点を調査する。

(2)神経幹細胞の増殖・分化において重要な役割を担う増殖因子に EGF が存在する。EGF の受容体である EGFR も EphA4 と結合するという結果が得られており、神経幹細胞の増殖・分化におけるシグナル伝達を解明するうえで、これらのクロストークを詳細に調べる

事が必要である。Eph-FGFR のクロストーク解明と同様の手法を用いて研究を進める。

5. 代表的な研究成果

(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 2 件)

- ① 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, 査読無
- ② 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, 査読無

[学会発表] (計 4 件)

- ① 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
- ② 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
- ③ 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
- ④ 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(2P-1)、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