様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年　4 月 15 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)
研究期間：2007～2008
課題番号：19870012
研究課題名（和文）　ガイダンス分子の情報伝達におけるRas ファミリーの機能解析

研究課題名（英文）　Roles of Ras family GTPases in signaling of guidance molecules

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

研究成果の概要：反発性軸索ガイダンス分子 semaphorin 受容体、Plexin のシグナル伝達において、低分子量 G 蛋白質、R-Ras の活性を受容体自身の GAP 活性により低下させることが必要である。本研究により、その GAP 活性の詳細な制御機構を明らかにした。さらに、R-Ras ファミリーに属する R-Ras、TC21、M-Ras について、それぞれ Plexin の GAP 活性のターゲットとなりうるかを検証した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	1,370,000	0	1,370,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総　計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：生物学
科研費の分科・細目：生物化学・分子生物学
キーワード：シグナル伝達・神経科学・がん

１．研究開始当初の背景

学習や記憶など、複雑な脳機能を可能とする基本要素は、神経細胞が神経突起を伸長し、お互いに接着することにより形成される複雑な神経回路である。発生期に生まれた神経細胞は個々の特定の位置に移動し、軸索及び樹状突起を適切な標的細胞に伸展させ、やがてはシナプスを形成することにより神経回路が形成される。神経回路網は複雑であるもののかなり正確で厳密にできており、これを可能としているのが軸索ガイダンス因子の誘導作用である。神経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てシナプスを形成させる。軸索ガイダンス分子は脳の様々な部位に発現しており、これを指標に神経軸索が脳内を迷うことなく正確に目的の細胞に到達できるようになっている。現在までに、様々な軸索ガイダンス因子が同定されているが、その作用から大きく２つのグループに分類され、１つは軸索を誘引する因子で、netrin ファミリーや NGL-1 が知られている。もう１つのグループは軸索を反発させる因子で、semaphorin(Sema)ファミリー、slit ファミリー、ephrin ファミリーなどが見いだされている。また、これらの因子に対する受容体も次々と同定されている。しかしながら、これ

らのガイダンス因子がどのような分子機構で軸索誘導を引き起こすのかという研究はまだ始まったばかりである。

２．研究の目的

本研究は、神経軸索ガイダンス因子の細胞内情報伝達で、その活性制御が重要な役割を果たすことが明らかになってきたにもかかわらず、いまだその神経機能がほとんど知られていない Ras ファミリー低分子量 G 蛋白質の１つ、R-Ras の情報伝達機構の解明をすることを目的とする。R-Ras は神経系に限らず、幅広い組織で発現している。また、反発性ガイダンス因子 Sema は元来、発達期の神経系においての反発因子として働く因子として単離されたが、近年の報告で、Sema が神経系以外を含めた幅広い細胞種で細胞接着や細胞運動を制御していることがわかってきた。さらに、Sema およびその受容体 Plexin は癌化した細胞にも発現しており、Sema および Plexin の変異と癌の転移･浸潤の能力に相関があることが知られている。このことから、私は、R-Ras の情報伝達機構の解明により神経系のみならず、幅広い細胞種においてのガイダンス分子の情報伝達の共通で基本的な機構の解明につなげることを目的として研究を行う。

３．研究の方法

(1) Plexin ファミリーの R-Ras GAP 活性の解析とその反発作用における役割の解析

Plexin ファミリーは大きく分けて Plexin-A、B、C、D の４つのグループに分かれる。R-Ras GAP 構造である C1 と C2 は種を超えて全ての Plexin ファミリーに保存されている。これまでに、Plexin-B1 と Plexin-A1 は R-Ras GAP 活性により R-Ras を不活性化することで反発作用を発揮することを明らかにした(*Oinuma et al., Science 2004*)。しかし、他の Plexin ファミリーについては未だ明らかではない。そこで、Plexin-C1 および D1 でも実際に R-Ras GAP 活性を示すのかを生化学的に証明し、またその活性を介して神経軸索の反発作用を発揮するのかを初代培養神経細胞を用いて調べ、R-Ras GAP 活性が Plexin ファミリーの反発作用における普遍的な情報伝達系であることを証明する。

(2) ガイダンス因子受容体の変異による発ガンの分子機構の解明

R-Ras は神経系に限らず、全身の幅広い組織で、広範な時期において発現しており、細胞運動や増殖を制御している。また、反発性ガイダンス因子 Sema は元来、発達期の神経系においての反発因子として働く因子として単離されたが、近年の報告で、Sema が神経系以外を含めた幅広い細胞種で細胞接着や細胞運動を制御していることがわかってきた。さらに、Sema およびその受容体 Plexin は癌化した細胞にも発現しており、悪性度の高い癌細胞では Plexin の細胞内領域に点変異が生じていることが知られている。私はこれらの癌細胞での変異体 Plexin に R-Ras GAP 活性があるのかどうかを生化学的に検証し、変異した Plexin が R-Ras に対する GAP として機能することができないことが細胞の過剰な運動や増殖をひきおこし、癌細胞の悪性化につながるのかどうかを明らかにする。

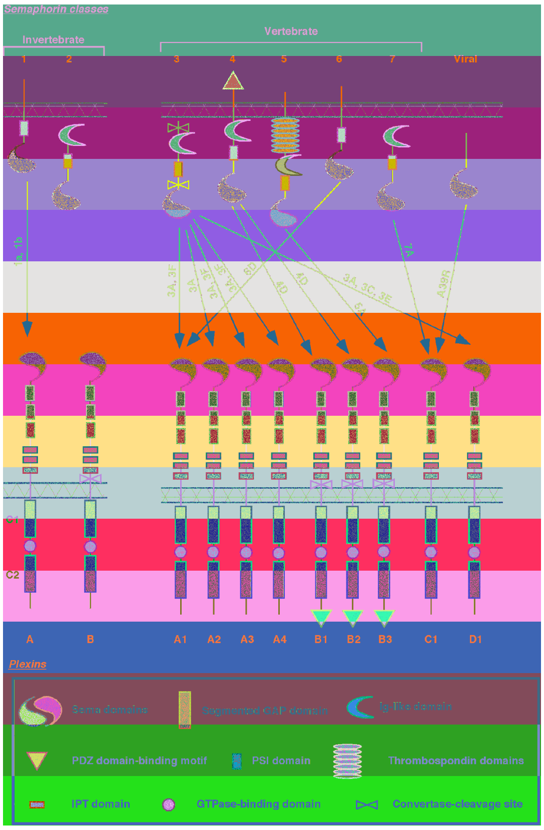
(3) Plexin の R-Ras GAP 活性のターゲットとなりうる低分子量 G 蛋白質の探索

R-Ras ファミリーは、R-Ras、TC21、M-Ras の３つから成る。そこで、R-Ras 以外のこれらの R-Ras ファミリー蛋白質に対して Plexin が GAP 活性を発揮出来るかどうかを検討し、その生理的意義について初代培養神経細胞を用いた系や、in utero electroporation 法を用いた方法により探索する。

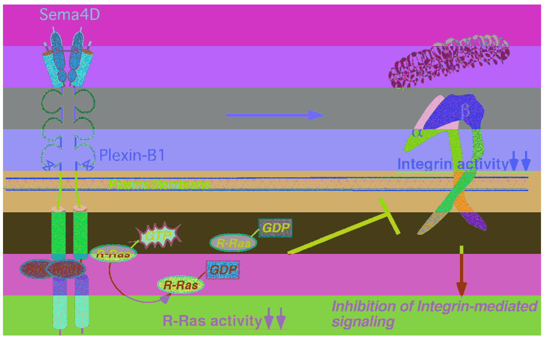
４．研究成果

(1)について

Plexin は、共役する Rho ファミリーの違いによって、R-Ras GAP 活性の発揮のシステムに違いを出していることを明らかにした。Plexin-A1、B1 については Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質、Rnd1 の結合によって、Plexin-D1 については Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質、Rnd2 の結合によって、リガンドであるセマフォリン刺激依存的に R-Ras GAP 活性を発揮することを明らかにした。一方で、Plexin-C1 についてはその R-Ras GAP 活性の発揮に Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の結合を必要としなかった。これらから、R-Ras GAP 活性は Plexin ファミリーに普遍的であり、その機能発揮には異なる Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の機能共役が必要であることを明らかにした。



(2)について
Plexin-B1 の前立腺ガン患者の術中摘出組織における点変異を探索したところ、悪性度の高い組織においては、Plexin-B1 の細胞領域の R-Ras GAP 活性に必要な領域に点変異が入っていることがわかった。私はこれらの癌細胞での変異体 Plexin に R-Ras GAP 活性があるのかどうかを生化学的に検証したところ、変異した Plexin が R-Ras に対する GAP として機能することができないことがわかった。その結果、細胞の過剰な運動をひきおこし、癌細胞の転移につながることを明らかにした。



(3)について
R-Ras ファミリーは、R-Ras、TC21、M-Ras の 3 つから成る。そこで、R-Ras 以外のこれらの R-Ras ファミリー蛋白質に対し Plexin が GAP 活性を発揮出来るかどうかを生化学的に検討したところ、Plexin-B1 は R-Ras ファミリーの中で、R-Ras および M-Ras に対して GAP 活性を示すことがわかった。M-Ras は海馬および大脳皮質初代培養神経細胞において、樹状突起形成・成熟に関わっていることを、shRNA を用いたノックダウン法により明らかにした。Plexin-B1 のリガンドである semaphorin 4D (Sema4D)を海馬および大脳皮質初代培養神経細胞に処理すると、神経細胞内在性の M-Ras の活性が抑制され、樹状突起の退縮が観察された。また、この樹状突起退縮は常時活性型の M-Ras の過剰発現により阻止されることがわかった。さらに、Sema4D/Plexin-B1 による M-Ras GAP 活性低下の下流シグナルについても検討したところ、M-Ras 活性の低下により、MAPK 経路の抑制がおこることが、樹状突起退縮につながることがわかった。

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　２件）
① Oscar Gee-Wan Wong, Tharani Nitkunan, Izumi Oinuma, Chun Zhou, Veronique Blanc, Richard S. D. Brown, Simon R. J. Bott, Joseph Nariculam, Gary Box, Phillipa Munson, Jason Constantinou, Mark R. Feneley, Helmut Klocker, Suzanne A. Eccles, Manabu Negishi, Alex Freeman, John R. Masters, and Magali Williamson　Plexin-B1 mutations in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:19040-19045. (2007)、査読有
②Kanami Uesugi, Izumi Oinuma, Katoh Hironori, and Manabu Negishi　Different requirement for Rnd GTPases of R-Ras GAP activity of Plexin-C1 and Plexin-D1. *J. Biol. Chem.* 284:6743-6751. (2009)、査読有
〔学会発表〕（計　４件）
① 生沼泉、加藤裕教、根岸学、反発性ガイダンス因子受容体と細胞接着因子とのクロストーク、第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会合同大会、2007 年 5 月 28 日（福岡国際会議場）
② 生沼泉、加藤裕教、根岸学、R-Ras controls axon specification upstream of GSK-3beta through integrin-linked kinase、第 30 回日本神経科学大会、2007 年 9 月 12 日（パシフィコ横浜）

③ 生沼泉、加藤裕教、根岸学、R-Ras は ILK-GSK-3beta 経路を介して軸索決定を制御する、第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学学会合同大会、2007 年 12 月 12 日（パシフィコ横浜）
④ 生沼泉、根岸学、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、2008 年 7 月 10 日（東京国際フォーラム）

〔その他〕
研究成果以下のホームページに掲載している。
http://www.users.kudpc.kyoto-u.ac.jp/~p51907/negishi/index.html

６．研究組織
(1)研究代表者
生沼　泉　（OINUMA IZUMI）
京都大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：40452297

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし