

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790069

研究課題名(和文) R-Ras ファミリー低分子量 G 蛋白質の情報伝達の解析

研究課題名(英文) Signal transductions of R-Ras family GTPases

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(和文)：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、活性の制御をうける低分子量 G 蛋白質、R-Ras について、それら自身の情報伝達機構についての検討を行った。神経細胞における、R-Ras、TC21、M-Ras の機能、およびその機能発現に必要な下流分子を同定した。

研究成果の概要(英文)：We have identified roles of R-Ras family of small GTPases, which functions downstream of the repulsive axon guidance molecule, semaphorin and its receptor, Plexin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：シグナル伝達・神経科学

1. 研究開始当初の背景

軸索ガイダンス因子の中で、Sema は代表的な反発性ガイダンス因子であり、その特異的な細胞膜 1 回貫通型受容体、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 の細胞内情報伝達機構として明らかにされたことに、Plexin-B タイプによる RhoA 活性化がある。申請者らは、Plexin-B の C 末端の PDZ 結合モチーフに、低分子量 G 蛋白質 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、反発作用を発揮することを明らかにした(Oinuma et al., J. Biol. Chem. 2003)。し

かしながら、PDZ 結合モチーフは Plexin の B タイプにのみ存在し、Plexin ファミリー全体の共通の普遍的な機構とは考えにくかったため、申請者らはさらに、Plexin ファミリーに普遍的な、軸索反発作用の分子機構を探索した。Plexin ファミリーの細胞内領域には種を超えてとても良く保存された領域、C1 領域と C2 領域がある。この領域が 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、細胞膜を進展させる R-Ras の活性を抑制することにより、神経細胞の成長円錐の退縮を引き起こすことを明らかにした(Oinuma et al., Science 2004)。この発見は、Plexin という受容体が Ras ファミリー低分子量 G 蛋白

質の GAP という、今までに報告のない全く新しい概念の情報伝達機構であった。また、この Plexin-B1 の R-Ras GAP 活性には Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 Rnd1 の Plexin-B1 への結合が必要であり、Plexin-B1 は Rho ファミリーの機能共役により Ras ファミリー G 蛋白質 R-Ras の活性調節を行う分子であることを明らかにした(Oinuma et al., J. Neurosci. 2004)。また、R-Ras が細胞接着や細胞膜進展に必要な細胞接着因子受容体、インテグリンを活性化するが、Plexin-B1 はその R-Ras GAP 活性によりインテグリンの活性化を抑制し、神経軸索の伸長を抑制したり、神経細胞以外の培養細胞においても、インテグリン依存的な細胞運動を抑制することを明らかにした(Oinuma et al., J. Cell Biol. 2006)。Sema に加えて、ephrin も代表的な反発性の軸索ガイダンス分子であり、その受容体は Eph で、チロシンキナーゼ活性を持つ。最近の報告で、Eph が R-Ras をチロシンリン酸化することにより、R-Ras の活性を抑制し、軸索の反発作用を発揮することがわかってきた。また、このリン酸化による R-Ras の活性抑制以外にも、R-Ras に対する活性抑制分子の GAP が受容体 Eph の細胞内領域に直接結合し、R-Ras GAP 活性を示すことでも、ephrin/Eph は R-Ras を不活性化する。このことから、今まで神経機能がほとんど知られていなかった Ras ファミリー低分子量 G 蛋白質の 1 つ、R-Ras が様々な神経軸索ガイダンス因子による神経軸索ガイダンスの分子機構に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。内在性の R-Ras は神経細胞において、軸索が伸長する時期に強く活性化され、またその細胞内局在は軸索に限局しており、また R-Ras を欠失させた神経細胞では軸索の形成が著しく阻害される(Oinuma et al., J. Biol. Chem. 2007)。このことから、R-Ras が軸索伸長において決定的な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、R-Ras がどのような機序で軸索の伸長を引き起こすのか、またどのような分子機構で細胞接着や細胞膜進展に必要な細胞接着因子受容体、インテグリンを活性化するのかについては、いまだ明らかでない。

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 ファミリーの神経細胞における情報伝達機構、を明らかにすることを目的とする。R-Ras ファミリーは

R-Ras、TC21、M-Ras から成り、発達期の神経系に豊富に発現している。しかしながら、それらの機能は未知であるので、神経細胞発達過程の様々な時期において、各々の G 蛋白質の持つ機能に関して調べるとともに、その機能発現に必要な下流分子を同定していく。

また、R-Ras ファミリーのうち、R-Ras に関してはインテグリン活性化を引き起こすことがわかっているものの、その分子機構がわかっていないので、その機構についても検討する。

3. 研究の方法

(1) R-Ras によるインテグリン活性化メカニズムの解析

活性型 R-Ras に結合することが既にわかっていた蛋白質のドメインを用いたデータベースサーチにより、R-Ras に結合する蛋白質を列挙し、その蛋白質と R-Ras の細胞内における結合を検討した。さらに、得られた候補蛋白質に関して、抗活性型インテグリン抗体を用いたフローサイトメトリーにより、R-Ras によるインテグリン活性化に寄与しているのかを検討した。また、インテグリンの活性化にはインテグリンの細胞膜辺縁部への移行が必要であることがわかっているので、R-Ras や得られた候補分子が、そのインテグリン輸送に関与しているかを、細胞染色やライブセルイメージングにより、検討した。

(2) R-Ras 以外の R-Ras ファミリー G 蛋白質の神経細胞における役割の解明

R-Ras ファミリーは、R-Ras、TC21、および M-Ras から成っており、これまでの申請者の研究により、内在性の R-Ras が軸索ガイダンスにおいて決定的な役割を果たしており、その活性調節がガイダンス因子の作用に必要であると考えられる。しかしながら、TC21 や M-Ras に関しては、神経細胞におけるそれらの役割に関する報告はほとんどない。従って我々は、まず TC21 や M-Ras の発現分布を *in situ hybridization* 法や PCR 法で検討した。また、それぞれの G 蛋白質の過剰発現やノックダウンを海馬初代培養神経細胞で行うことにより、得られる形態変化を観察した。さらに、その形態変化に必要な下流のエフェクター分子を、酵母の *two-hybrid* 法を用いたスクリーニングによって探索した。

(3) Plexin による R-Ras GAP 活性の下流シグナルについての検討

Plexin は R-Ras GAP 活性を発揮することで、軸索において反発性応答を引き起こす。また、

その下流のシグナル伝達経路として、PI3 キナーゼの抑制が必要であることを、我々は以前の研究で明らかにしている。一方で、細胞内のPIP3はPTENとよばれるフォスファターゼによっても制御されている。そこで、PTENのPlexinによる反発性応答における役割について検討すべく、フォスファターゼ活性を欠失させたPTENや、shRNAを用いたPTENのノックダウンなどによって、Semaphorin/Plexinシグナルの下流におけるPTENの必要性について検討をした。

(4)ガイダンス因子シグナルにおける TC21 や M-Ras の役割の解明

神経細胞以外の培養細胞を用いた系においての下流の情報伝達経路に関する研究において、R-RasはPI3Kの経路を活性化するが、ERK-MAPK経路を活性化する能力がないことが他のグループにより、報告されている(Marte et al., *Curr. Biol.* 1997)。一方で、TC21やM-RasについてはERK-MAPK経路を活性化する能力があることが、他のグループにより報告されている(Yokoyama et al., *J. Cell Biol.* 2007)。申請者はsemaphorin/Plexinの反発性ガイダンス刺激がTC21やM-Rasの活性やERK-MAPKの活性を制御するのかについて、株化培養細胞を用いた生化学的アッセイの系を用いて検討した。また、ガイダンス因子によるそれらG蛋白質の活性制御により、海馬初代培養神経細胞においてどのような形態変化を引き起こすのかについて、検討した。

4. 研究成果

(1)に関して

活性型 R-Ras に結合することが既にわかっていた蛋白質のドメインを用いたデータベースサーチにより、申請者は R-Ras に結合する新規蛋白質として、Myosin を同定した。Myosin は R-Ras 活性型特異的に結合し、ファイブネクチンなどのインテグリンリガンドの刺激により、繊維芽細胞内在性の Myosin と R-Ras の結合が増強されることがわかった。また、Myosin はその C 末端でインテグリンに直接結合することも明らかにした。さらに、抗活性化型インテグリン抗体を用いたフローサイトメトリーによる実験により、R-Ras によるインテグリン活性化は、Myosin の shRNA によるノックダウンや、Myosin のモーター活性の阻害により、阻害されることがわかった。このことから、Myosin のモーター活性によるインテグリン輸送が、R-Ras によるインテグリン活性化に必要であることがわかった。また、mCherry 蛍光蛋白を融合させたインテグリンを用いた細胞観察により、R-Ras や Myosin のノックダウンや、Myosin のモーター活性の阻害により細胞内でのイ

ンテグリンの細胞辺縁部への輸送が阻害されることがわかった。以上の結果から、R-Ras は Myosin を介してインテグリン活性化を引き起こすと考えられ、現在も引き続き検討を続けている。

(2)に関して

我々はまず、TC21および、M-Rasの脳内における発現分布を、in situ hybridization 法や、PCR法により検討した。その結果、TC21は生後後期に発現が増加し、シナプス形成期に発現量が高いことがわかった。また、M-Rasは生後に発現が増加し、樹状突起形成期に発現量が高いことがわかった。R-Ras、TC21、M-Rasは海馬の神経細胞に発現していたことから、海馬初代培養神経細胞を用いて、shRNAによるノックダウンにより、各々の機能を検討したところ、R-Rasのノックダウンにより軸索形成の阻害が、TC21のノックダウンにより、樹状突起のフィロポディア形成の阻害が、M-Rasのノックダウンにより、樹状突起の形成が阻害されることがわかり、R-Rasファミリーの各G蛋白質が神経細胞の形態形成において、異なったステージにおいて機能していることが明らかになった。また、神経細胞形態調節における各G蛋白質の下流のシグナル伝達経路についても検討した結果、R-Rasによる軸索の形態制御にはアクチン足場蛋白のAfadinが、M-Rasによる樹状突起の形成に、lamellipodinが、直接のエフェクターとして必要であることがわかった。

(3)に関して

細胞内の PIP3 量はキナーゼの PI3K とフォスファターゼの PTEN の双方で制御されていることが知られており、我々の以前の研究により、Semaphorin/Plexin によって引き起こされる、神経軸索の反発性応答が、PI3K の活性低下を必要としていることを明らかにしている (Ito et al., *EMBO Rep.* 2006)。そこで、我々はさらに、PTEN 活性の制御の必要性について検討した。その結果、in vitro の系において、Semaphorin/Plexin は PTEN のフォスファターゼ活性の活性化を引き起こしていることを明らかにした。また、その活性には Plexin による R-Ras GAP 活性が必要なことがわかった。さらに、海馬初代培養神経細胞を用いた系において、shRNA による PTEN のノックダウンや、PTEN のフォスファターゼ活性の欠失体の過剰発現は、Semaphorin による成長円錐崩壊の反発応答を阻止した。このことから、Semaphorin/Plexin による反発性応答には、PIP3 フォスファターゼである PTEN の活性化が必要であることがわかった。

(4)に関して

まず、一般的な株化培養細胞である COS-7 細胞を用いた系において、Plexin-B1 を発現させた細胞を用いてリガンドである Semaphorin4D 依存的な TC21 や M-Ras の活性変化を検討した。その結果、Semaphorin4D 刺激依存的に、細胞内の M-Ras の活性が低下し、一方で、TC21 の活性は変化しないことがわかった。さらに、その活性変化が Plexin 自身の持つ、GAP 活性に依るものであることを検討するために、Plexin 内の Plexin ファミリー間で保存された GAP ドメインに点変異を入れた Plexin-B1 を用いて同様の実験を行ったところ、M-Ras の活性低下が観察されなかったことから、Plexin-B1 は Semaphorin4D 刺激依存的に、M-Ras GAP として働くことがわかった。M-Ras は軸索形成期よりも、樹状突起形成期に発現が多かったため、次に、樹状突起における Plexin-B1 による M-Ras GAP 活性の意義について、海馬初代培養神経細胞を用いて検討した。まず、内在性の M-Ras は樹状突起の発達時期に豊富に発現しており、shRNA によるノックダウンによって、樹状突起の伸長が抑制されることがわかった。また、樹状突起発達時期の海馬初代培養神経細胞に Semaphorin4D 刺激を施すと、樹状突起の伸長が著しく阻害されることがわかった。さらに、その樹状突起の伸長の阻害は活性型の M-Ras の過剰発現によって阻止されたことから、内在性の M-Ras の活性低下に依っていることがわかった。さらに、Semaphorin4D による樹状突起の縮退の下流の分子機構についても検討した。Semaphorin4D 刺激を施すと、海馬初代培養内在性の ERK の活性が低下していることがわかった。また、活性型 ERK の過剰発現により、Semaphorin4D による樹状突起の縮退が阻害された。また、海馬初代培養神経細胞における M-Ras のノックダウンにより、ERK の活性低下が、逆に、活性型 M-Ras の過剰発現により、ERK の活性上昇が観察された。以上の結果から、Semaphorin/Plexin は樹状突起で M-Ras に対する GAP として働くことにより、樹状突起における反発作用を担っていることを明らかにした。

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)

①Yasuhiro Saito, Izumi Oinuma, Satoshi Fujimoto, Manabu Negishi.
Plexin-B1 is a GTPase activating protein for M-Ras, remodelling dendrite morphology. EMBO Rep. 10: 614-621 (2009) 査読有

②Izumi Oinuma, Yuri Ito, Hironori Katoh, and Manabu Negishi
Semaphorin 4D/ plexin-B1 stimulates PTEN activity through R-Ras GTPase-activating protein activity, inducing growth cone collapse in hippocampal neurons. J. Biol. Chem. 285: 28200-28209 (2010) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①生沼 泉
神経回路形成へのナビゲーション
第 82 回日本生化学会大会
2009 年 10 月 22 日 神戸ポートピアホテル
②生沼泉、根岸学
Molecular mechanism of integrin activation by R-Ras
第 82 回日本生化学会大会
2009 年 10 月 23 日 神戸ポートピアホテル
③田坂元一、生沼泉、根岸学
M-Ras の新奇エフェクターである Lamellipodin はアクチン骨格系の制御により樹状突起伸長を制御する
□Lamellipodin, a novel effector of M-Ras, regulates the dendritic maturation through reconstructing actin network

[図書] (計 1 件)

①伊藤正男、川合述史、水島昇、生沼泉、大島登志男、太田訓正、船越洋、柳川右千男、森吉弘毅、佐藤純、浜千尋、長谷川功、鎌田恭輔、三澤日出巳
クバプロ出版
ブレインサイエンスレビュー 2010
p 263 (pp 45-60)

[その他]

ホームページ等
研究成果は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