

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390019

研究課題名(和文) 神経回路形成における G 蛋白質シグナル伝達系の機能の統合的理解

研究課題名(英文) Roles of signaling systems of small GTPases in the formation of neural network system

研究代表者

根岸 学 (NEGISHI, MANABU)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：60201696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000 円、(間接経費) 4,260,000 円

研究成果の概要(和文)：我々は、plexinがR-Ras/M-Ras GAPを直接コードし、R-Ras/M-Rasの活性を抑制することにより、神経軸索と樹状突起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、GAP活性の下流の情報伝達機構を解析した。R-Ras/M-Rasのエフェクターとしてアクチン重合制御因子lamellipodin (Ipd) を同定し、Sema4D/Plexin-B1はR-Ras/M-Ras-Ipdシグナルを抑制することによりアクチン重合を阻害し、軸索及び樹状突起に対する反発作用を発揮することを明らかにした。

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, functions as a GAP for R-Ras/M-Ras, inducing repulsion of both axons and dendrites, respectively. We have examined downstream effectors of R-Ras/M-Ras, linking to regulation of actin filament cytoskeleton, and we identified lamellipodin (Ipd), a regulator of actin polymerization, as a novel effector of R-Ras/M-Ras. R-Ras/M-Ras specifically bind to Ipd and recruit it to membranes, and Sema4D/Plexin-B1 suppresses R-Ras/M-Ras activity and Ipd membrane translocation, inducing repulsion of axons and dendrite in hippocampal and cortical neurons. Our study shed light on how repulsive guidance molecules regulate actin cytoskeleton, revealing a novel mechanism that the R-Ras/M-Ras-Ipd systems regulate actin-based axon and dendrite remodeling by sema/plexin in the formation of neural network system.

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 樹状突起

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。現在までに様々な軸索ガイダンス分子が同定されているが、その作用から2つのグループに分かれ、1つは軸索を誘引する分子で、netrinファミリーが知られている。もう1つのグループは軸索を反発させる分子で、semaphorin (sema) や、ephrinファミリーなどが見いだされており、それらの受容体も次々に同定されている。これらのガイダンス分子がどの神経の軸索ガイダンスに関わっているかの研究はかなり進んでいるが、その軸索誘導の情報伝達の分子機構についてはまだ不明な点が多い。

近年、神経突起の伸長や退縮に低分子量 G 蛋白質 Ras ファミリーや Rho ファミリーが重要な役割を果たしていることがわかってきた。Rho ファミリーの中で、特に Rho、Rac、Cdc42 の機能の研究が進み、Rac と Cdc42 は軸索の伸長に、Rho が軸索の退縮に関わることがわかっている。我々は、機能の不明であった Rho ファミリー、RhoG の特異的エフェクターとして Elmo を同定し、RhoG-Elmo-Dock180 という Rac を活性化する新しい経路を見だし、この経路が神経突起伸長を引き起こすことを明らかにした。一方、軸索ガイダンス分子の中で、sema 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。我々は、Sema4D の受容体、Plexin-B1 の細胞内領域が 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軸索の反発作用を引き起こすことを明らかにし、Plexin-B1 という受容体が G 蛋白質の GAP であるという今までに報告のない全く新しい情報伝達機構であることを発見した。

2. 研究の目的

本研究は、反発性の Sema/Plexin や ephrin/Eph、誘因性の netrin を代表とした、神経突起ガイダンス分子のシグナル伝達における、Ras ファミリー及び Rho ファミリーの個々の G 蛋白質の機能の解析の上に、それらの密接なコミュニケーションの神経突起ガイダンスにおいて果たす役割を細胞レベル個体レベルで体系的に明らかにし、ガイダンスにおける Ras 及び Rho ファミリーの機

能を統合的に理解し、体系づけていくことを目的とし、期間内に明らかにしていく。そして、神経回路形成に必須な神経突起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、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ていく。

3. 研究の方法

Plexin サブファミリーの下流の情報伝達の分子機構を明らかにするため、R-Ras サブファミリーの 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、plexin サブファミリーの R-Ras GAP 活性発現機構を生化学的に解析した。また、R-Ras サブファミリーの下流のエフェクター分子を同定するため、R-Ras サブファミリーに結合する分子を酵母の two-hybrid 法を用いてスクリーニングして、候補分子の cDNA をクローニングした。

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 をリポフェクトアミン法や 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

記憶や学習など複雑な高次機能の基盤となる神経回路は、神経細胞が軸索と樹状突起を伸ばし、ターゲット細胞とシナプスを形成して完成する。このように、神経回路形成において、特徴的な神経突起伸長は必須であり、その神経突起伸長は低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーにより調節されている。Rho ファミリーには様々な分子があり、その中で、Rnd サブファミリー (Rnd1、Rnd2、Rnd3) は中枢神経系に主に発現しており、様々なエフェクターを介して神経細胞の形態を含めて神経機能の調節に関わっている。3つの Rnd 分子の中で、Rnd1 と Rnd3 は Rho の活性を抑制して、神経突起の伸長を促進するが、Rnd2 は Rho の活性を促進して、神経突起の退縮を引き起こし、Rnd 分子群は Rho の活性を正と負の活性調節を行い、アンタゴニスティックに働く調節機構であると考えられる。しかし、in vitro において、Rnd は全て Rho の GAP である p190RhoGAP に結合し、Rho の活性を抑制する能力があった。そこで、この分子機構を明らかにすることにした。Rnd1 と Rnd3 は Rnd2 と異なり、ユニークな N 末端配列を持つ。この意味を解析したところ、Rnd1 と Rnd3 は細胞膜のラフトに局在するが、Rnd2 はラフト以外に局在し、Rnd2 に Rnd1 の N 末端を付加したところ、ラフトに局在するようになり、Rnd1 と Rnd3 の N 末端の配列がラフト局在シグナルになっていることがわかった。また、Rnd1 と Rnd3 は p190RhoGAP をラフトに移行さ

せ、Rho の活性を抑制するが、Rnd2 は p190RhoGAP をラフトに移行させることができず、Rho の活性を抑制しないが、Rnd1 の N 末端を付加した分子は、p190RhoGAP をラフトに移行させ、Rho の活性を抑制したので、Rnd1 の N 末端が、ラフト移行シグナルで、Rho 抑制機能の発揮に参与していることがわかった。このことから、分子の機能発現には分子の細胞膜への局在の特異性が重要な役割を果たしていることが示された。一方、我々は Rho ファミリーのシグナル伝達経路で、RhoG-Elmo-Dock180 による Rac の活性化経路を研究してきた。Dock180 は CDM ファミリーに属する Rho ファミリーの活性化因子であるが、CDM ファミリーのメンバーで Dock4 が神経細胞のスパインに発現し局在することを見いだした。そして、Dock4 はスパインにおいて、アクチン骨格調節分子のコータクチンに結合し、Rac を活性化することにより、スパイン形成を制御していることを明らかにした。

R-Ras サブファミリーに関し、我々は、神経軸索に局在して軸索の伸長を促進する R-Ras に対し、M-Ras は樹状突起に局在し、樹状突起の伸長を促進すること、Sema4D/Plexin-B1 は R-Ras と M-Ras に対し共に GAP 活性を示し、それぞれの活性制御で、軸索の反発作用と樹状突起の成長抑制をすることを見いだした。そこで、R-Ras と M-Ras の下流で働くエフェクターの探索を行った。まず、M-Ras のエフェクターとして、Lamellipodin (Lpd) を同定し、M-Ras は活性型特異的に Lpd に結合し、Lpd を細胞膜に移行させ、アクチン細胞骨格に結合して、樹状突起の伸長と分枝化を促進した。また、Sema4D/Plexin-B1 はこの M-Ras-Lpd シグナル経路を抑制し、アクチン繊維の樹状突起先端からの消失を引き起こして、樹状突起に対し、反発作用を発揮した。一方、R-Ras も活性型特異的に Lpd に結合し、アクチン繊維の伸長を促進し、軸索の伸長を促進した。また、Sema4D/Plexin-B1 は、R-Ras-Lpd シグナル伝達経路を阻害し、軸索の反発作用を発揮した。

我々は、R-Ras の下流で働くさらなる R-Ras のエフェクター分子を酵母 two-hybrid 法でスクリーニングし、アクチン繊維結合分子である afadin を同定した。そして、R-Ras による軸索形成の調節作用における afadin の役割を解析した結果、afadin は R-Ras による軸索伸長作用ではなく、R-Ras による軸索の分枝化に必要であることがわかった。また、R-Ras は afadin を細胞膜にリクルートすることにより分枝化の制御を行い、この作用には、afadin のアクチン繊維への結合によるアクチン骨格の再構築が必要であることを明らかにした。我々は、以前、R-Ras の下流のエフェクターとして、PI3 キナーゼ及び PTEN を同定し、R-Ras が PIP3 リン脂質代謝系の制御を介した微小管伸長の調節により、軸索の伸長を行っていることを明らかにしてきたが、

今回の研究により、R-Ras が異なるエフェクター系を用いてアクチン骨格系、微小管系 2 つの細胞骨格の再構築を連携して制御することにより、軸索の伸長と分枝化を調節し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 8 件)

Kobayashi, M., Harada, K., Negishi, M., and Katoh, H. Dock4 forms a complex with SH3YL1 and regulates cancer cell migration. **Cell. Signall.** (査読有) 26, 1082-1088 (2014)(doi;org/10.1016/j.cellsig.2014.01.1027)

Ueda, S., Negishi, M., and Katoh, H. Rac GEF Dock4 interacts with cortactin to regulate dendritic spine formation. **Mol. Biol. Cell** (査読有) 24, 1602-1613 (2013)(doi; 10.1091/mbc.E12-11-0782)

Kawai, H., Kobayashi, M., Hiramoto-Yamaki, N., Harada, K., Negishi, M., and Katoh, H. Ephexin4-mediated promotion of cell migration and anoikis resistance is regulated by serine 897 phosphorylation of EphA2. **FEBS Open Bio** (査読有) 3, 78-82 (2013)(doi; org/10.1016/j.fob.2013.01.002)

Iwasawa, N., Negishi, M., and Oinuma, I. R-Ras controls axon branching through Afadin in cortical neurons. **Mol. Biol. Cell** (査読有) 23, 2793-2804 (2012)(doi; 10.1091/mbc.E12-02-0103)

Tasaka, G., Negishi, M., and Oinuma, I. Semaphorin 4D/Plexin-B1-mediated M-Ras GAP activity regulates actin-based dendrite remodeling through Lamellipodin. **J. Neurosci.** (査読有) 32, 8293-8305 (2012) (Doi; 10.1523/JNEUSCI.0799-12-2012)

Oinuma, I., Kawada, K., Tsukagoshi, K., and Negishi, M. Rnd1 and Rnd3 targeting to lipid raft is required for p190 Rho GAP activation. **Mol. Biol. Cell** (査読有) 23, 1593-1604 (2012) (Doi; 10.1091/mbc.E11-11-0900)

Wakita, Y., Kakimoto, T., Katoh, H., and Negishi, M. The F-BAR protein Rapostlin regulates dendritic spine formation in hippocampal neurons. **J. Biol. Chem.** (査読有) 286, 32672-32683 (2011)(Doi; 10.1074/jbc.M111.236265)

Harada, K., Hiramoto-Yamaki, N., Negishi, M., and Katoh, H. Ephexin4 and EphA2 mediate resistance to anoikis through RhoG and phosphatidylinositol 3-kinase. **Exp. Cell Res.** (査読有) 317, 1701-1713 (2011)(Doi; 10.1016/j.yexcr.2011.05.014)

〔学会発表〕(計 16 件)

根岸学、田坂元一、生沼泉：第 86 回日本生化学会大会「神経突起ガイダンス分子 Sema4D/Plexin-B1 によるアクチン骨格の制御機構」 パシフィコ横浜、横浜、2013 年 9 月 11～13 日

生沼泉、根岸学：第 86 回日本生化学会大会「軸索形態調節における R-Ras シグナル」 パシフィコ横浜、横浜、2013 年 9 月 11～13 日

加藤裕教、根岸学：第 86 回日本生化学会大会「RacGEF Dock4 の機能制御と病態との関連」 パシフィコ横浜、横浜、2013 年 9 月 11～13 日

加藤裕教、根岸学：第 85 回日本生化学会大会「EphA2 受容体に結合する Ephexin4 の機能」 福岡国際会議場、福岡、2012 年 12 月 14～16 日

根岸学、生沼泉：第 84 回日本生化学会大会「神経突起形成における R-Ras サブファミリーの役割」 京都国際会館、京都、2011 年 9 月 21～24 日

加藤裕教、根岸学：第 84 回日本生化学会大会「EphA2 受容体による細胞運動の制御」 京都国際会館、京都、2011 年 9 月 21～24 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/negishi/j/toppu.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

(3) 連携研究者

加藤 裕教 (KATO HIRONORI)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：50303847

生沼 泉 (OINUMA IZUMI)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：40452297