

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570226

研究課題名(和文)低分子量Gタンパク質間クロストーク制御による細胞移動と軸索伸長メカニズムの解析

研究課題名(英文)Regulation of cross-talk among small GTPases in cell migration and neuronal axon pathfinding

研究代表者

戸井 基道(Doi, Motomichi)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：50344213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞は、発生の過程において活発に移動と標的細胞に向けた軸索伸長を行う。本研究では、この神経細胞移動と軸索伸長を制御する新たなメカニズムとして、複数の低分子量Gタンパク質と相互作用するRIN-1分子を同定した。RIN-1は活性化型のRac1と特異的に結合し、その活性制御をもとに細胞内のアクチン動態を制御していることを見出した。また反発性のガイダンス分子であるSLT-1/SAX-3の経路の下流で機能していることも明らかにした。これらの結果は、ガイダンス分子の下流で適切に細胞骨格系を制御する低分子量Gタンパク質の複雑なネットワークが存在することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Cell migration and axon guidance both require proper regulation of the actin cytoskeleton in response to extracellular guidance cues. Rho/Rac, a member of the small GTPase family, is an essential regulator of actin remodeling. Here we show that the VPS9-domain protein RIN-1 acts as a novel effector for CED-10 in *C. elegans*. We found that RIN-1 specifically binds to the GTP-bound form of CED-10, and that mutations in *rin-1* cause significant defects in migration and axon guidance of some neuronal cell types. Our genetic analyses placed RIN-1 in the Slit-Robo genetic pathway that regulates repulsive signaling for dorso-ventral axon guidance. Furthermore, in *rin-1* mutants, actin accumulated on both the ventral and dorsal sides of the developing HSN neuron. These results strongly suggest that RIN-1 acts as an effector for CED-10/Rac and regulates actin remodeling in response to restricted guidance cues.

研究分野：分子神経科学

キーワード：細胞移動 低分子量Gタンパク質 軸索伸長 細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

低分子量 G タンパク質の Rho ファミリーに属する「Rac」は、細胞骨格であるアクチンの動態を制御する中心的分子であり、神経細胞においても、移動から軸索伸長、シナプス形成に至るまでの様々な現象に参与する。Rac は、他の低分子量 G タンパク質と同様に GTP 結合型が活性型であり、この活性型にエフェクター分子が特異的に作用する事で、細胞外からのシグナル特異的に下流の分子経路が働き細胞骨格制御を導く。しかしながら、シグナル特異的に Rac の活性化や局在などの細胞内極性を作り、領域特異的なアクチン重合のオン・オフを切り替えるメカニズムは解明されていなかった。

申請者は、Rac の新規エフェクターを単離する目的で、線虫の Rac1 ホモログである「CED-10」を用いて Yeast two-hybrid スクリーニングを行い、活性型 CED-10 とのみ特異的に相互作用する分子として線虫 RIN-1 タンパク質を同定した。ヒトの Rin1 は、もともと低分子量 G タンパク質である「Ras」と相互作用する分子として単離され (Ras interacting protein1) その後の解析でさらに別の G タンパク質である「Rab5」の活性化因子としても機能することも報告されていた。これらの報告と申請者の結果から、RIN-1 は細胞内で少なくとも3つの G タンパク質と相互作用し、それらの活性化や局在を細胞外からのシグナル依存的に制御することで神経細胞の移動や軸索伸長といった形態変化に参与していると推測した。また哺乳類を含めた RIN-1 タンパク質ファミリーは、比較的新しく同定された分子であった。消化管系のガンにおいて、ヒト Rin1 が高発現している等の報告もあるが、その細胞移動に関する機能についてはあまり理解されていない。そこで線虫を用いた詳細な解析から、RIN-1 を介した細胞移動の新たな知見が得られると考えた。

低分子量 G タンパク質群は、細胞の様々な生理現象に参与する重要な分子群であり、その役割を統合的に理解する事は細胞内のシグナル伝達を解き明かす上で大きな意味を持つ。特に、移動や軸索伸長といったダイナミックな細胞の形態変化を起こす神経系においても、個々の分子についての詳細な解析は現在でも大変盛んに行われている。しかしながら、本課題のように複数の G タンパク質と相互作用し、その相互作用がお互いの活性化や局在に影響を与える、すなわち機能のクロストークという観点からこれらの分子群やそれを仲介する分子に注目し、そのクロストークが導く細胞現象を明らかにした研究は申請者の知る限り当時は存在しなかった。

2. 研究の目的

線虫 RIN-1 タンパク質とこれまで相互作用することが知られている G タンパク質との制御機構を明らかにすることを目的とし

て、以下の解析を試みた。

(1) Ras、Rab、Rac の3つの低分子量 G タンパク質と RIN-1 タンパク質との相互作用パターンと活性化のメカニズムを詳細に解析し、RIN-1 を介した G タンパク質間クロストークの実態を明らかにする。特に神経細胞移動と軸索誘導時の極性形成において、個々の分子による制御とクロストークを介した制御との違いを詳細に解析し、その普遍性と特異性を見出す。

(2) RIN-1 分子の上流で細胞移動や神経軸索誘導を制御しているガイダンス分子とその受容体を同定し、細胞外からの情報がどのように RIN-1 および低分子量 G タンパク質活性のクロストークに繋がり、最終的にガイダンス分子特異的な極性を持ったアクチン動態を制御しているのかを明らかにする。これにより、特に神経回路網形成に必須である、誘因・反発シグナル両者のバランスが生体内の適切な位置への細胞移動と軸索投射を制御している分子メカニズムを理解する。

3. 研究の方法

モデル生物線虫および培養細胞の系を用いて、我々が見出した RIN-1 と CED-10/Rac1 との相互作用に加えて、「RIN-1」と「Ras・Rac・Rab」の各 G タンパク質群との相互作用や活性化を生化学的に、その際の各タンパク質の細胞内動態と細胞形態変化を細胞生物学的に解析し、各タンパク質間の活性化や局在がどのように時空間的に制御されているのかを調べた。さらに、線虫突然変異体を用いて、軸索ガイダンス遺伝子群との分子遺伝学的解析により、RIN-1 と各 G タンパク質間の相互作用がガイダンス分子特異的な誘引や反発をどのように制御しているのかを解析した。これらにより、RIN-1 を介した各 G タンパク質間のクロストークの実態と、それが担う細胞移動と軸索伸長に対する新たなモデルの提唱を目指した。具体的には、RIN-1 による G タンパク質間のクロストーク制御の解析として、線虫 RIN-1 と CED-10、RAB-5、Ras ホモログである LET-60 といった各 G タンパク質との相互作用の詳細を以下の解析を用いて明らかにする。特に、ある G タンパク質との相互作用が他の G タンパク質の活性化や RIN-1 との相互作用にどのように影響するのか、タンパク質間機能のクロストークに注目して解析を進めた。

(1) 生化学的解析

これまでの解析で線虫 RIN-1 と活性型 CED-10/Rac1 との特異的な相互作用、また予備実験で RIN-1 と RAB-5 および LET-60/Ras との相互作用を見出していた。まずこれらの相互作用に必要なアミノ酸領域、相互作用の強さなどを Yeast two-hybrid の系と培養細胞 (Hela 及び PC12) を用いてより詳細に確認した。特に活性型あるいは非活性型となるアミノ酸変異を導入した各 G

タンパク質との特異的相互作用に注目し、その後、どの G タンパク質が同時に RIN-1 と相互作用可能なのか、また RIN-1 とそれぞれの G タンパク質との相互作用が他の G タンパク質との結合にどう影響するのかを、複数のタンパク質を発現させた培養細胞の発現系を用いた Pull-down 法で解析した。

(2) RIN-1 と低分子量 G タンパク質間のクロストークによる軸索伸長制御

CED-10/Rac1、あるいは RIN-1 と RAB-5 間のクロストーク制御を明らかにするために、各変異体を用いてその生体内でそれぞれのタンパク質の挙動を解析した。各タンパク質に GFP を融合させた遺伝子を導入し、野生型と変異体における局在の変化を観察した。観察する GFP 融合タンパク質も、野生型・GTP 結合型(活性化状態)・GDP 結合型(不活性化状態)を用いることで、各状態のタンパク質がどのように影響を受けるかを特に細胞移動中や軸索伸長中の神経細胞に注目して、形態変化時にどのような局在変化が起きるのかを調べた。また、活性化型あるいは不活性化型のタンパク質を過剰発現させた際に細胞形態変化がどう影響するのか、相互作用するタンパク質の局在がどう変化するのかを調べた。

(3)軸索伸長に関わるガイダンス分子の遺伝学的解析：背腹軸に沿った軸索誘導を示す神経を対象にして、RIN-1 および各低分子量 G タンパク質とガイダンス分子との関係を解析した。神経細胞として「AVM」と「HSN」に注目し、各分子の変異体や過剰発現体内での伸長を解析した。さらに、RIN-1 が制御する細胞移動と軸索伸長に関して、それぞれの移動に必要なガイダンス分子とその受容体の分布やシグナル経路に RIN-1 が関与するのかどうかを解析した。RIN-1 タンパク質はその N 末端側に細胞膜受容体と相互作用する SH2 ドメインを有しており、膜タンパク質と相互作用する可能性が示唆されていた。線虫背腹軸に沿った細胞移動に関しては、腹側への誘引シグナルとして UNC-6 とその受容体 UNC-40 が働いており、逆に背側への反発シグナルとして SLT-1 と受容体 SAX-3 が働いている。したがって、これらの受容体と RIN-1 が直接相互作用しうるのかを酵母の系を用いて解析した。また受容体を蛍光タンパク質に融合させて線虫神経に発現させ、細胞膜上での分布パターンを野生型と *rin-1* 変異体で比較し、RIN-1 がその動態に関与するのかを調べた。

(4) 形態変化中の細胞内現象の解析：ガイダンス分子に応答した神経軸索内での低分子量 G タンパク質の挙動を観察するために、各タンパク質を蛍光タンパク質でラベルし、HSN 神経に発現させた。これらの蛍光融合タンパク質の局在パターンを観察するとと

もに、その下流で制御されるアクチンやエンドソームの動態を観察した。観察する GFP 融合タンパク質も、野生型・GTP 結合型(活性化状態)・GDP 結合型(不活性化状態)を用いることで、各状態のタンパク質がどのように影響を受けるかを特に細胞移動中や軸索伸長中の神経細胞に注目して、形態変化時にどのような局在変化が起きるのかを調べた。また、活性化型あるいは不活性化型のタンパク質を過剰発現させた際に細胞形態変化がどう影響するのか、相互作用するタンパク質の局在がどう変化するのかを調べた。

4. 研究成果

(1) 線虫 RIN-1 タンパク質と低分子量 G タンパク質との相互作用解析

神経細胞の適切な移動やその軸索の伸長制御は、脳や個体内で機能的な神経回路網が形成されるために必須である。低分子量 G タンパク質は、細胞内の様々なシグナル伝達を制御する基本分子であり、そのうち Rho/Rac ファミリーは、細胞骨格アクチン動態の制御に関与する。これまでの研究で、線虫の Rac1 である CED-10 の活性化型と特異的に結合する分子として RIN-1 タンパク質を同定していた。

哺乳類の相同タンパク質である Rin1 が相互作用することが知られている Ras および Rab5 の G タンパク質との相互作用に注目し、Yeast-two hybrid の系を用いて相互作用解析を行った。RIN-1 の C 末端側の約 450 アミノ酸領域に、Ras と相互作用する RA domain、Rab5 と相互作用する VPS9 domain が存在し、各タンパク質との相互作用に必要な事が推測されていた。その領域の野生型配列や各ドメインを欠失させた変異体配列をベクターに組み込み、また G タンパク質側も野生型、不活性化型、活性化型それぞれを組み込んで、RIN-1 と G タンパク質それぞれを酵母に発現させた。その結果、線虫 RIN-1 は不活性化型 RAB-5 と VPS9 domain で結合することは分かった。しかしながら、RAS ホモログである

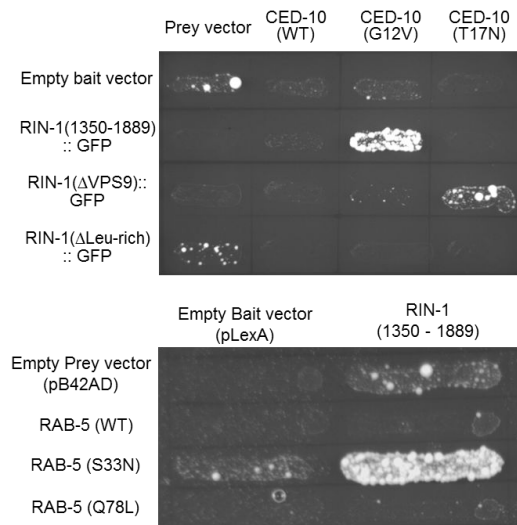


図1 Yeast-two hybridによる相互作用解析

LET-60 とは明確な相互作用が見られなかった。また、CED-10 との相互作用には、VPS9 domain とその直ぐ N 末側にあるロイシンリッチな配列が必要である事が分かった。(図 1)

次に、これらの相互作用解析から得られた結果が遺伝学的に個体の中でどのような意義を持つのかを解析した。まず RIN-1 が実際に RAB-5 の活性化制御に関わるのかを調べるために、*rin-1* 変異体の表現型解析を行ったところ、*rab-5* 変異体で見られるような強いエンドサイトシス異常や膜タンパク質の局在異常は観察されなかった。同様に、他の Rab5 活性化因子である Rme6 や Rabex5 とも遺伝学的相関を示さなかった。これらの結果から、RIN-1 は RAB-5 活性化ドメインを有した相互作用するが、その制御は非常に弱いか、発現している細胞特異的か、輸送するタンパク質依存的である可能性が示唆された。以上の結果により、各 G タンパク質と RIN-1 タンパク質間の相互作用の実態を明らかにし、特に CED-10 タンパク質との相互作用に必要なアミノ酸領域を明確にする事が出来た。これにより、CED-10 と RAB-5 がほぼ同じ領域に結合すること、線虫タンパク質では明確な結合は見られなかったが哺乳類では Ras もほぼ同じ領域に結合することが明らかになった。これらにより、RIN-1 が有する生化学的特性の一端を明らかにしたと同時に、線虫ではクロストーク機構に Ras は関与しない事可能性を示した。

ヒト相同タンパク質間での相互作用とクロストークを解析するために、まず HEK293 細胞にヒト Rin1 と各 G タンパク質を発現させた。局在パターンを解析するために GFP を融合させたものと、Pull-down assay に用いるために Rin1 には flag タグを、G タンパク質には Myc タグを融合させた。単独の発現細胞、Rin1 と GTPase を 1 つずつ同時に発現させたものからタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットングで発現を確認した。これをもとに Flag-affinity gel を用いて Rin1 を回収し、Myc 抗体で各 GTPase の細胞内での結合を解析した。その結果、これまでの線虫や酵母の結果と同様に、ヒト Rin1 は活性

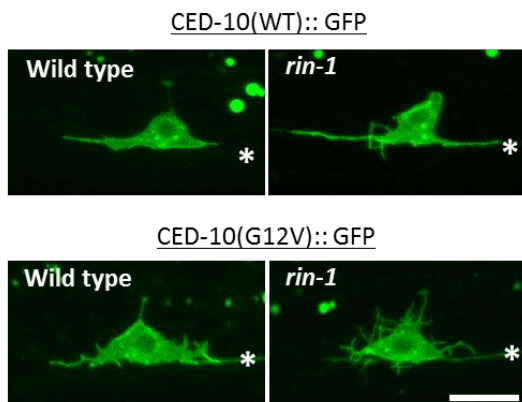


図2 *rin-1*変異体におけるCED-10の分布

化型の Rac1 とは細胞内で結合していることが分かった。また野生型の Rac1 とも弱い結合がみられた。Rab5 に関しては、どのフォームと弱く結合していることが観察された。Ras とも、野生型・活性化型両者と結合していた。これらの結果から、ヒト細胞においても Rin1 は Rac/Rab5/Ras の 3 者の低分子量 G タンパク質と相互作用することが明らかになった。

(2) RIN-1 と低分子量 G タンパク質間のクロストークによる軸索伸長制御

まず移動中の HSN 神経内で CED-10 の野生型および活性化型変異体の局在を観察した。CED-10 タンパク質は、細胞内に均一に存在し、特に進行方向や伸長中のフィロポディアに強く局在するようには見られなかった(図 2)。また、その局在パターンは、*rin-1* 変異体や *rab-5* (*RNAi*)においても特に大きな変化は見られなかった。RAB-5 はエンドソーム系の細胞内小胞に観察され、*rin-1* 変異体においても野生型と同様な局在パターンを示した。従って、細胞内の局在には、これらの分子間による制御機構は強く働いていないと考えられた。しかしながら、活性化型 CED-10 を HSN 神経に発現させた際に見られるフィロポディアの本数や位置が、野生型のそれとは大きく異なることを見出した。まず、野生型で見られるような軸索伸長方向のみのフィロポディア形成は *rin-1* 変異体では見られなかった。さらに、一過性で現れるフィロポディアの数も、野生型と比べて著しく増加した。この結果から、RIN-1 は CED-10 の局在を制御するというよりも、活性化型 CED-10 による不必要なサイトでのアクチン重合を抑制していると推測された。同様に RAB-5 の分布を観察したが、野生型・活性化型・不活性化型のタンパク質ともほぼ均一に細胞に分布した。したがって RIN-1 は RAB-5 の局在パターンには関与しないと結論付けた。

(3) 軸索伸長における RIN-1 とガイダンス分子の関係

背腹軸に沿った細胞移動および軸索ガイダンスへの関与を明らかにするために、RIN-1 とガイダンス分子受容体との相互作用

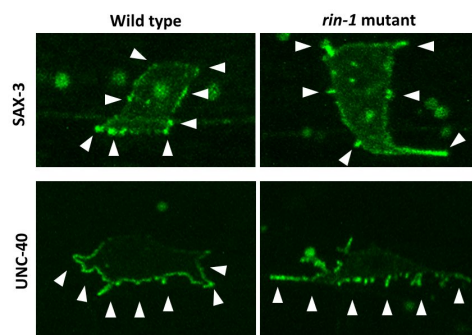


図3 ガイダンス受容体との相互作用と局在解析

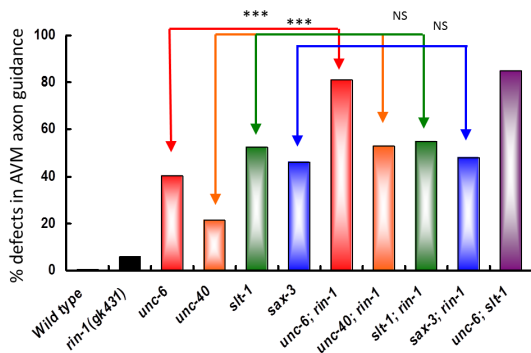


図4 AVM神経の軸索神経に対するガイダンス分子の関与

用を Yeast-Two hybrid の系を用いて解析した。RIN-1 の N 末端側と UNC-40、あるいは SAX-3 とを発現させたところ、RIN-1 は両方の受容体と相互作用した。この相互作用が受容体の分布や局在に関与するのかわかるために、両受容体に GFP を融合して移動中の HSN 神経に発現させた。その結果、野生型で UNC-40 は、進行方向の腹側に強く集積した。それに対して *rin-1* 変異体においては、その集積は若干背側にも観察され、UNC-40 に対する厳密なリガンド依存的な集積制御が変化していると思われる。SAX-3 に関しては、発生過程に伴わず、細胞膜上にほぼ均一に存在しており、そのパターンは *rin-1* 変異体中でも同様であった。(図 3)

しかしながら、AVM 神経軸索の背腹軸に沿った伸長パターンには、UNC-6/UNC-40 の経路ではなく SLT-1/SAX-3 の経路で RIN-1 は機能していることが示された(図 4)。遺伝学的な解析として、各ガイダンス分子変異体あるいは受容体分子変異体と *rin-1* 変異体との二重変異体を作製し、AVM 神経の走行パターンを解析した。*unc-6* および *unc-40* との二重変異体では、単独の変異体よりも有意に高い走行異常の割合を示した。それに対して、*slt-1* および *sax-3* 変異体との二重変異体では、単独の変異体と有意差は見られなかった。この結果は、遺伝学的には RIN-1 の効果は UNC-6 の効果と相加的に働いていると言え、異なる経路でそれぞれのタンパク質が AVM 神経の軸索伸長に関与していると推測される。逆に SLT-1 とは同じ経路にあるために、表現型の増強が見られないと思われる。RIN-1 と SAX-3 受容体とのタンパク質間の相互作用は観察されているので、リガンド SLT-1 を受けた下流で、RIN-1 が SAX-3 の活性化を細胞内でアクチン動態制御に伝えている可能性は十分考えられる。逆に UNC-40 受容体に関しては、AVM 神経を例にした軸索伸長では別々の経路で機能し、HSN 神経を例にした細胞移動時は RIN-1 による UNC-40 受容体の集積パターン制御の機構が働いているのかもしれない。

(4) 形態変化中の細胞内現象の解析

RIN-1 による細胞移動および軸索伸長にお

ける細胞骨格制御の実態を、アクチンの集積を基に解析した。アクチンと GFP を融合し、HSN 神経および AVM 神経に発現させた。AVM 神経内のアクチンは、軸索伸長に伴った発現・局在の変化を明瞭に観察できず、細胞全体が蛍光を発していた。発現調節がうまくできていない可能性が考えられる。HSN にアクチン GFP を発現させたところ、細胞の移動時にその局在パターンが変化することが見られた。発生初期の背腹軸に沿って移動を始めるタイミングで、進行方向側の膜、特にフィロポディア用の突起内にタンパク質が多く集積するのが観察された。突起ではなく通常の膜にも腹側により多い発現が観察された。しかしながら、*rin-1* 変異体に発現させた場合、野生型と同様に進行方向の腹側のフィロポディアにもアクチンの集積が観察されたが、それ以上に反対側の背側の膜上にも多くのアクチンが集積していた。また、尾部側にも同様なフィロポディア用の突起が異常に多く形成され、その中でも多くのアクチンが集積することが分かった(図 5)。この結果は、RIN-1 はその活性に応じて各 GTPase と結合し、局在パターンには大きな関与をしないが、最終的な活性制御パターンに応じて Ra5 を感知したうえで自分の進行方向に合わせたアクチン骨格の制御をしている。

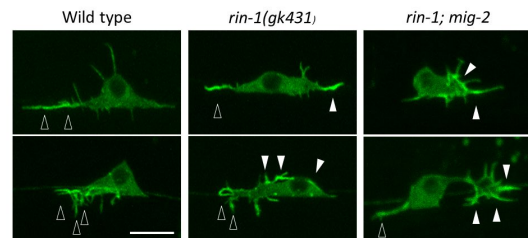


図5 RIN-1によるアクチン動態制御。進行方向と逆側にもアクチンが集積する。

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件)

戸井 基道、峰松 英樹、久保田 幸彦、西脇 清二、宮本 昌明、The novel Rac effector RIN-1 regulates neuronal cell migration and axon pathfinding in *C. elegans*, *Development*, 140(16)、2013、3435-3444.
doi: 10.1242/dev.089722.

[学会発表](計 3件)

戸井 基道、Direct visualization of neuronal function and activity using fluorescent proteins. IAN 2014.
戸井 基道、峰岸 英樹、久保田 幸彦、

西脇 清二、宮本 昌明、The novel Rac effector RIN-1 regulates neuronal cell migration and axon pathfinding in *C. elegans*、ASCB2013

戸井 基道、峰松 英樹、久保田 幸彦、西脇 清二、宮本 昌明、VPS9 ドメインを有する RIN-1 タンパク質は線虫の細胞移動や軸索伸長を制御する新規の Rac エフェクターである、第 35 回日本分子生物学会大会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸井 基道 (DOI, Motomichi)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ
メディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：50344213