

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700379

研究課題名(和文) シュワン細胞ミエリン化における Sema4D / ARHGEF10 経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of Sema4D/ ARHGEF10 signal transduction on the myelin sheath formation of Schwann cells

研究代表者

柴田 理志 (Shibata, Satoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00423153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：ARHGEF10は細胞の骨格形成に関与していると考えられているが、その機能はほとんど解っていない。我々は扱いが困難なシュワン細胞におけるARHGEF10の役割を解析する前に、ARHGEF10の基本的な機能を扱いやすい培養細胞を用いて解析した。ARHGEF10の細胞内における局在やARHGEF10欠失細胞を調べることで、ARHGEF10がゴルジ装置から細胞膜への物質輸送に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Though ARHGEF10 (guanine exchange factor) is known as GEF for Rho family protein which is related to the regulation of actin cytoskeleton, the function of ARHGEF10 had been unknown. Because it was necessary to obtain the basal functional information of ARHGEF10 before starting the functional analysis of ARHGEF10 in the Schwann cells, we carried out the research about the cytoplasmic localization of ARHGEF10 and ARHGEF10 depleted cells. These research indicated that ARHGEF10 localized at the vesicles which is transported from golgi-apparatus to plasmamembrane and the function of ARHGEF10 is related to the cytoplasmic transport of the exocytosed vesicles.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：RhoGEF メンブレントラフィック

1. 研究開始当初の背景

ミエリンは中枢神経ではオリゴデンドロサイト、末梢神経ではシュワン細胞により形成されており、絶縁体として機能することで活動電位の効率的な伝導を可能にしている。ミエリンに関しては、一つのオリゴデンドロサイトが複数本の軸索に対してミエリンを形成するがシュワン細胞は軸索に対して 1:1 で形成する、中枢神経では基板を持たないが末梢神経では基板に覆われているなどの違いがあるが、構造や myelin basic protein(MBP) や myelin-associated glycoprotein(MAG)などのミエリン構成因子において多くの共通点も認められている。

これまでにミエリン形成に関わる多くの因子が同定され、ミエリン形成の分子メカニズムが少しずつ明らかになってきた。例えば、末梢神経ではシュワン細胞が分裂、遊走、軸索束の中から一本の軸索を探索する radial sorting などの過程を経てミエリンを形成する。この過程において、神経栄養因子である brain-derived neurotrophic factor(BDNF) や neurotrophin-3(NT-3)、細胞外基質である Laminins は、受容体である p75NTR や Trk-C、1-integrin を介してシュワン細胞の分裂や遊走、radial sorting をそれぞれ制御することが報告されている。これらのリガンド刺激は細胞内の様々な因子へと伝達されて各々の作用を発現する。アクチン骨格の再編を担う低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーもそのような因子の一つである。

Rho ファミリーは大きく分けて RhoA、Rac1、Cdc42 のサブファミリーからなり、線維芽細胞では主に RhoA はアクチンストレスファイバーと焦点接着、Rac1 は葉状仮足、Cdc42 は糸状仮足の形成を誘導することが知られている。Rho ファミリーの活性は guanine nucleotide exchange factor (GEF) と GTPase activating protein(GAP)により調節されている。GEF は GDP 型(不活性型)から GTP 型(活性型)への交換反応を触媒し、GAP は GTP 型から GDP 型への加水分解反応を促進する。GEF や GAP の多くは、細胞の様々な場所に局在化する受容体等からシグナルを受け、シグナルに応じた時間・場所で活性調節されている。近年、Rho ファミリーやその活性調節因子とシュワン細胞ミエリン化の関わりが少しずつ明らかとなり、これらの因子のミエリン化における機能解析の重要性が指摘されている。

Sema4D は膜貫通型や可溶性蛋白質として存在し、PlexinB1 を介して RhoA の GEF である PDZ-RhoGEF や leukemia-associated RhoGEF(LARG)を活性化しアクチン骨格の再編を行い細胞の形態変化を誘導することが知られている。現研究室では以前 Sema4D K.O マウスの解析を行い、Sema4D K.O マウスでは成熟したオリゴデンドロサイトの数が上昇していることを明らかにし、Sema4D 刺激が中枢神経のミ

エリン形成過程に深く関わっていることを示した。続いて我々はラット大脳 cDNA ライブラリーを用いた Yeast-two hybrid 法(Y2H)により、PlexinB1 の細胞内領域の結合因子として RhoA の GEF である ARHGEF10 を同定した。Verhoeven らは 332 番目のトレオニン(T)がイソロイシン(I)へ変異した ARHGEF10(T332I)を持つヒトでは、末梢神経軸索のミエリン形成の低下や神経伝導速度の遅延を生じることを報告したが、このような機能・形態変化を起こす分子基盤は明らかではなかった。

我々は平成 23 年度に T332I の細胞生物学的解析を行い、T332I は恒常的活性型の GEF としてふるまうこと、HeLa 細胞や HEK293T 細胞で過剰発現すると細胞の収縮を引き起こすこと、この収縮は T332I の GEF 活性に依存していること、更に同様の収縮が T332I を過剰発現したシュワン細胞でも認められることを発表した。これらの結果は T332I のもつ恒常的な GEF 活性が末梢神経のミエリンの機能・形態異常を引き起こすことを強く示唆するものであり、更に ARHGEF10 は広範な組織に発現しているが、T332I による異常が特にシュワン細胞で認められたということは、ARHGEF10 の機能がシュワン細胞ミエリン形成において重要であることを意味している。また、その下流因子である RhoA の阻害は一つのシュワン細胞に複数のミエリン形成を誘導することが報告されており、末梢神経ミエリン形成制御における RhoA の重要性を示している。

以上から、中枢神経と末梢神経の差異は留意しなければならないが、Sema4D/ARHGEF10 経路さらにその下流に存在する RhoA の活性制御が神経軸索のミエリン形成過程に関与していることが考えられる。これまでに、末梢神経シュワン細胞における Sema4D や ARHGEF10 の機能解析はほとんど行われていない。そこで、本申請研究では次の 2. を明らかにすることを目的として研究を進める。

2. 研究の目的

これまでの我々の研究結果は、神経軸索の成長円錐反発因子 Semaphorin4D (Sema4D) とその受容体 PlexinB1 が、PlexinB1 の結合因子として同定した低分子量 G 蛋白質 Rho の GEF である ARHGEF10 の活性を調節して末梢神経の髄鞘形成を制御することを示唆するものであった。本申請研究では ARHGEF10 の基本的な機能や Sema4D から ARHGEF10 へのシグナル経路(Sema4D/ARHGEF10 経路)が機能している分子基盤を明らかにし、更に Sema4D ノックアウトマウス(K.O)やシュワン細胞を実験材料として用いて Sema4D/ARHGEF10 経路の末梢神経のミエリン形成における役割を解明することを目的として研究を遂行する。

3. 研究の方法

1) Sema4D/ARHGEF10 経路の解析

ARHGEF10/ Sema4D 経路が機能しているかを調べるために免疫沈降法を行い、Sema4D/ARHGEF10 経路がいかに機能しているかを明らかにする。Sema4D ノックアウトマウスの末梢神経ミエリンの観察を行い実際に個体レベルで ARHGEF10/ Sema4D 経路が機能しているかを調べる。

2) ARHGEF10 の基本的機能の解析

ARHGEF10 が細胞内でどのような機能を有しているかはほとんど明らかとなっていない。我々は ARHGEF10 の基本的な機能を理解するために ARHGEF10 に対する特異的抗体を作成し ARHGEF10 の細胞内局在の解析を行った。この抗体を用いた免疫蛍光染色により様々なマーカー蛋白質との局在比較を行い、ARHGEF10 が細胞のどのオルガネラに局在しているかを明らかにした。更に RNA 干渉により ARHGEF10 をノックダウンした時に、これらのマーカー蛋白質の局在に及ぼす影響などを調べた。また、様々な ARHGEF10 変異体を作成し、これらの変異体の強制発現がマーカー蛋白質の局在に及ぼす影響を調べた。

3) ARHGEF10 相互作用因子の探索

ARHGEF10 の相互作用因子をイーストツーハイブリッドアッセイにより探索する。

4. 研究成果

1) Sema4D/ ARHGEF10 経路について、Sema4D の受容体 PlexinB1 と ARHGEF10 の相互作用は免疫沈降法により確認できている。しかし、PlexinB1 と ARHGEF10 の相互作用に Sema4D がどのように関与しているか等を明らかにすることは出来なかった。また、Sema4DKO マウスを用いた抹消神経のミエリン形成の異常等を見出すまでには残念ながら至っていない。今後は、Sema4D/ARHGEF10 経路が機能していなかった場合で当初計画していたように2)で得られたデータを元に ARHGEF10 がシュワン細胞ミエリン形成でどのような役割を果たしているかを明らかにしていく。

2) ARHGEF10 の機能解析を行い、ARHGEF10 の基本的な機能については明らかになってきた。ARHGEF10 はゴルジ装置から細胞膜へ向かう vesicles に局在することがあきらかとなった。この様な vesicles の輸送では低分子量 G 蛋白質である Rab ファミリーが機能している。ゴルジ装置で合成された分泌蛋白質はゴルジ装置から分裂する vesicles に含まれたまま細胞膜へと輸送され、細胞膜と融合することで蛋白質を細胞外へと分泌する。ゴルジ装置からの vesicles の分裂や続く輸送には Rab6 が機能し、この vesicles には Rab6 依存的に Rab8 が局在化し Rab8 は vesicle の細胞膜への融合で機能することが知られている。我々は、ARHGEF10 は Rab8 と同様に Rab6 に依存してこの vesicles に局在化することを明らかにした。更に、ARHGEF10 を欠失した細胞では Rab8 がこの vesicles へ局在しなく

なっていることが分かった。ARHGEF10 のある種の欠失型変異体の強制発現は Rab6, Rab8 の局在変化を引き起こすことが明らかとなった。これらの結果から、ARHGEF10 が Rab6 と Rab8 の機能を関連付けるような働きをしていることが明らかとなった。シュワン細胞のミエリンは非常に複雑な膜構造を呈していることから、ARHGEF10 が膜輸送と関与していることは、今後 ARHGEF10 のシュワン細胞における機能を知るうえで非常に有用な情報である。

3) ARHGEF10 の相互作用因子の探索については現在2)で用いた ARHGEF10 の変異体を用いてイーストツーハイブリッドアッセイを行っているところである。

Sema4D/ARHGEF10 シグナル経路が機能していることを見出せていないため、当初考えていたように研究を遂行することは困難であったが、これまでほとんど未知であった ARHGEF10 の機能が明らかになってきたことは本研究の最も重要な成果であると考えている。

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

2012 年 12 月日本解剖学会近畿支部(神戸)

2013 年 12 月日本分子生物学会(神戸)

2014 年 6 月日本細胞生物学会(奈良)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 理志 (Shibata, Satoshi)

大阪大学・医(系)研究科 研究院・助教

研究者番号：00423153

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：