

研究報告書

「ガイダンス因子シグナルで普遍的に駆動されるシグナル伝達経路の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 生沼 泉

1. 研究のねらい

低分子量 G 蛋白質 R-Ras は細胞外マトリックスへの接着刺激により細胞内で活性化され、さらに逆に、この活性化された R-Ras が細胞内から(inside-out)に細胞接着因子受容体、インテグリンを物理的に活性化分子構造にし、細胞外マトリックスへの親和性を上昇させることで、細胞接着におけるポジティブフィードバックを担う。一方、反発性ガイダンス因子 semaphorin(Sema)受容体、Plexin はそれ自身の持つ R-Ras GAP 活性により R-Ras を不活性化し、このポジティブフィードバックループの一点を抑制することで、インテグリン活性化を効率的に抑制し、神経軸索の伸長を抑制する。最も基本的で普遍的な細胞機能の1つにおいて R-Ras を介した増幅機構が存在し、また、様々なガイダンスシグナルシグナルにおいて、その機構の制御による細胞接着の制御が普遍的・中心的役割を担っていると予想されることから、R-Ras の情報伝達経路の理解は、ガイダンス因子シグナルの普遍的駆動原理の理解に繋がる。本研究は、個々の分子要素の同定を行い、それらの分子イメージングおよび細胞内・生体内での機能解析で得られるデータを手がかりに、種々の誘引性・反発性ガイダンスシグナルにおいて普遍的に駆動される情報伝達機構の発見へとつなげることを、目標として掲げた。

2. 研究成果

(1) 概要

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、軸索およ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、正確で厳密にできており、これを可能としているのは神経ガイダンス因子の誘導作用である。神経ガイダンス因子には、大きく分けて、神経繊維に誘引的に働き伸長に促進的に働く誘引性因子と、忌避的に働き伸長に抑制的に働く反発性因子の2つがあり、神経細胞は軸索の先頂部にある成長円錐という構造体で、神経細胞周辺に存在するそれらの因子を感知しながら、伸長の方向性を判断している。

これまでのガイダンス因子シグナル伝達研究は、個々のガイダンス因子に特化された報告が散漫に羅列されている状態で、「ガイダンス応答」という全体的視野では有機的に捉えられていなかった。さらに、軸索と樹状突起という、2つの性質の異なる神経突起形態制御が同じシステムに依っているのかも不明であった。その状況で、われわれは、最終的に伸長や方向性の決定がどのような細胞内シグナルに統合され、神経細胞内において、形態変化や進路の「判断」を下しているかのメカニズムに興味を持ち、数々のガイダンス因子の下流で活性制御が行われている R-Ras ファミリー低分子量 G 蛋白質

を窓とし、研究を行った。その一連の研究成果をここに報告する。

(2) 詳細

1) 軸索の分枝化のエフェクターの同定

われわれのこれまでの研究で、R-Ras は神経軸索の形成に必要であることが明らかになっている。さらに最近の研究で、反発性ガイダンス因子 Sema の1つ、Sema4D は軸索の分枝を減少させ、また、誘引性ガイダンス因子 netrin-1 の刺激は逆に、軸索の分枝を増加させることがわかっている。しかしながら、どのような分子機構で軸索分枝の形態を制御するかは不明であったので、われわれは R-Ras による軸索の形態制御に必要な下流のエフェクター分子の同定を試みた。酵母のツーハイブリッドシステムを用いた結合蛋白質のスクリーニングにより、活性型 R-Ras の結合蛋白質として、アクチン細胞骨格に連結した足場蛋白質である Afadin を得た。Afadin は N 末端側に RA ドメイン(Ras 蛋白質結合ドメイン)を有する蛋白質で、*in vitro* での結合実験により、R-Ras は活性(GTP 結合)依存的に Afadin の RA ドメインに直接結合することが明らかになった。

また、初代培養神経細胞における内在性 Afadin 蛋白質の発現を調べたところ、大脳皮質および海馬由来の神経細胞のいずれにおいても、Afadin は培養初期の軸索の形成時期に多く発現していることがわかった。また、培養2日目の初代培養大脳皮質神経細胞を用いた免疫沈降実験によって、内在性の R-Ras と Afadin の結合が確認され、内在性の Afadin は軸索の先頂部の成長円錐および、分岐部分に F-actin と共局在するかたちで集積していた(図1)。

次に、初代培養大脳皮質神経細胞の軸索形態における R-Ras および Afadin の役割を検討した。活性型の R-Ras を大脳皮質神経細胞に発現させると、神経軸索の分枝化が引き起こされ、この分枝化は内在性 Afadin のノックダウンにより阻害されることがわかった。さらに、R-Ras による Afadin を介した軸索分枝の増加の分子メカニズムを検討したところ、Afadin はそれ単独では大部分が細胞質画分存在するが、活性型 R-Ras が結合することにより、細胞膜へと移行した。Afadin を強制的に細胞膜に移行させる CAAX シグナルを付加した Afadin-CAAX を大脳皮質神経細胞に発現させておいた神経細胞では、著しい軸索分枝の増加が認められ、膜移行と軸索分枝の機能相関が示された。

さらに、下流のシグナル伝達経路についても検討した結果、R-Ras および Afadin を介した軸索分枝化には Afadin の C 末端のアクチン結合ドメインが必要であり、実際に、R-Ras および

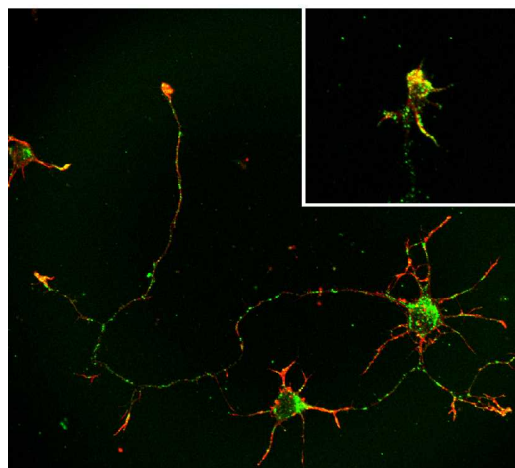


図 1. 大脳皮質神経細胞内在性の Afadin の局在

培養 2 日目の大脳皮質初代培養神経細胞における Afadin(赤色)の細胞内局在を F-actin(緑色)との共染色で示す(右上の挿入写真は、軸索先端の成長円錐の拡大写真)。

Afadinによる軸索分枝化は、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシンBにより、阻害された。以上の結果から、神経細胞においてR-RasはAfadinを介したアクチン細胞骨格再編成により軸索の分枝化を制御することを明らかにできた(参考文献1)。

2)樹状突起伸長・分枝化のエフェクターの同定

R-RasサブファミリーはR-Ras(R-Ras1)、TC21(R-Ras2)、およびM-Ras(R-Ras3)からなり、われわれは過去に、R-Rasが軸索の形態制御、M-Rasが樹状突起の形態制御を行っているという研究成果を報告している。しかしながら、M-Rasがどのような分子機構で樹状突起の形態を制御するかは不明であったので、M-Rasによる樹状突起形成に必要な下流のエフェクターの同定を試みた。データベースを用いた結合蛋白のスクリーニングにより、M-Rasの新奇結合蛋白質として、アクチン細胞骨格系制御因子Ena/VASP蛋白質の結合蛋白質であるLamellipodin(Lpd)を得た。LpdはN末端側にRAドメインを有する蛋白質であり、*in vitro*での結合実験により、M-Rasは活性依存的にLpdに直接結合することが明らかになった。また、大脳皮質初代培養神経細胞において、M-RasとLpdの内在性の結合が確認された。

次に、樹状突起形成におけるLpdの役割を検討した。われわれは以前の報告で、恒常的活性型のM-Ras(M-RasQL)を過剰発現させると、大脳皮質神経細胞において樹状突起伸長や分枝の増加が引き起こされることを明らかにしている。この条件において、内在性のLpdをshRNAを用いてノックダウンしたところ、M-RasQLによる樹状突起伸長が抑制された。以上の結果から、LpdはM-Rasによる樹状突起伸長作用に必須であることが明らかになった。

われわれは以前の報告で、反発性ガイダンス因子Sema受容体、Plexinはそれ自身の持つR-RasGAP活性により直接的にR-Rasを不活性化し、神経細胞の軸索に対して反発作用を示すことを明らかにしているが、今回の研究で、Sema4D刺激によって軸索に加え、樹状突起が退縮し、それに伴ってアクチン骨格が樹状突起の先から消えて無くなっていることがわかった(図2)。さらに、これらの樹状突起の分枝の退縮やアクチン骨格の消失は、M-RasQLを導入しておくことで、阻止されたことから、Semaによる樹状突起の分枝の退縮には受容体のPlexinがM-Rasに対するGAP活性を発揮してM-Rasの活性を抑制することで、アクチン骨格の崩壊を引き起こすことが必要であることが明らかになった。

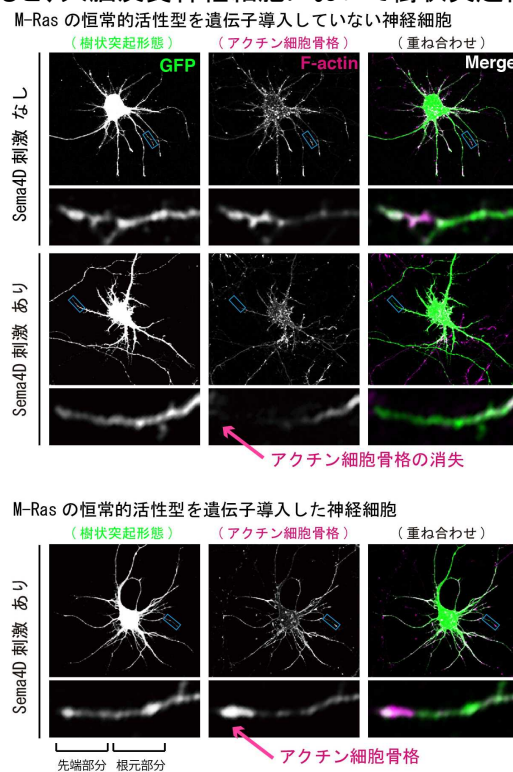


図2. Sema4D刺激が大脳皮質神経細胞の樹状突起先端のアクチン細胞骨格に与える影響
培養7日目の神経細胞にSema4D刺激を90分間行い、観察した。

さらに、分子メカニズムを詳細に検討したところ、M-RasQL は Lpd に結合してそれを細胞膜へ運ぶ作用があることが生化学的な分画実験により明らかになった。一方で、不活性型である M-RasSN にはそのような作用はなかった。このことから、Lpd は M-Ras の活性依存的に細胞膜へ運ばれると考えられる。大脳皮質神経細胞に Sema4D 刺激を加えると、膜画分に存在する Lpd の量が減少していた。Lpd に CAAX シグナルを付加した Lpd-CAAX を大脳皮質神経細胞に発現させておいた神経細胞では、Sema4D によって引き起こされる樹状突起の退縮が阻止された。

これらの結果から、Sema が無い状態では受容体の Plexin が活性化されていないため、樹状突起内の M-Ras の活性が高いため、Lpd が樹状突起の先端の細胞膜へ運ばれ、アクチン骨格系の伸長が起こるが、Sema が存在すると、受容体の Plexin の GAP 活性が活性化され、樹状突起内の M-Ras が不活性化状態に変換されることによって、Lpd が樹状突起の先端の細胞膜へ運ばれなくなり、アクチン骨格系の伸長が抑制されるということがわかった (図3)。また、今回の成果により、Plexin による R-Ras GAP 活性発揮のシステムは、軸索と樹状突起という、性質の異なる神経突起における共通のシグナル機構であることを明らかにできた(参考文献 2)。

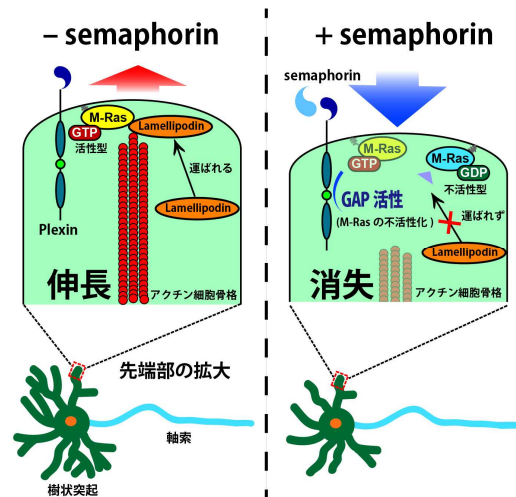


図 3. semaphorin 刺激によって引き起こされる Plexin の GAP 活性を介した樹状突起先端のアクチン細胞骨格制御のモデル

3. 今後の展開

本プロジェクトによって、神経細胞の分枝化および伸長に必要な細胞骨格制御に必要なエフェクターを明らかにできた。また、反発性ガイダンス因子受容体 Plexin による R-RasGAP システム (R-Ras 不活性化システム)は、軸索と樹状突起という、2つの性質の異なる突起の形態制御において共通のメカニズムであることが明らかになった。今後は、同定したエフェクターが種々のガイダンス因子の下流で普遍的に使われているのかを検討することで、シグナル集約点として働く分子であるかを見たい。その上で、ガイダンス応答過程での軸索成長円錐および樹状突起先端部の高詳細なイメージングおよびそれに基づいた数理モデル解析を行うことにより、突起が様々なガイダンス情報を汲み取って最終的に自らの進路(あるいは伸長)を判断するに至る閾値(いわば、判断基準)を明らかにしたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究では、さまざまな誘引性・反発性ガイダンス因子のシグナル統合地点としての R-Ras に着目し、その下流のエフェクターを2つ同定できた。さらにそのエフェクターはいずれも、細胞

形態調節で最も基本的役割をもつ、アクチン細胞骨格の再編成を直接的に制御する分子だった。さらに、軸索の形態制御だけでなく、樹状突起の形態制御においても共通に駆動されるシステムとしての R-Ras GAP システムの位置付けを明らかにすることができた。また、現段階では誌上公表には至っていないが、2期生の戸島拓郎博士(理研BSI)に技術的アドバイスをいただき、同定したエフェクターの軸索先端部成長円錐の局所での速い動きを全反射顕微鏡でイメージングすることに成功しており、さらにその局在がガイダンス因子刺激で制御されることを確認している。さらに、領域会議においてアドバイザーの先生からご意見をいただき、同定したエフェクターの *in vivo* での役割を検証する必要性を感じ、1期生の松田孝彦博士(京都大学 iCeMS)に *in vivo* での遺伝子発現誘導システムの技術を学び、*in vivo* での機能解析実験にも着手し、成果を得ている。これらの研究はさきがけに参画していなかったら為し得なかったものであり、さきがけに参画したことで、今後長い研究人生の中での自身の研究の幅が大きく広がったことを実感しており、その点を期間中の論文発表実績以上に、自身では評価している。

本研究の成果は、一見すると地味な基礎研究である。しかしながら、損傷神経において損傷部位周辺では、神経細胞は一定期間生存しているものの、sema などの複数の反発性ガイダンス因子が発現誘導されることにより、損傷神経繊維の再生が阻害されることが明らかになっており、それぞれの反発性ガイダンス因子に対応する阻害剤の開発は既に、様々な研究者や企業によって進められているが、あくまでもそれらは、特定の因子に対する阻害作用をもつものでしかない。われわれの研究を発展させ、シグナル統合地点である R-Ras の活性操作およびその直下のエフェクターの活性制御をすることにより、再生阻害因子環境中においても効率良く機能的な神経繊維再生が可能になると信じている。

また、ガイダンス因子情報伝達に関する一連の成果の積み重ねにより、各種受賞に至ったことにも、この場に感謝の意を表したい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

神経細胞の軸索や樹状突起がどうして正しい方向に伸長してゆくことができるのかは神経科学の長年の課題であり、多数の誘引性あるいは反発性ガイダンス因子が同定され細胞接着分子の関与が研究されてきたが、それらのシグナルが細胞内でどう処理、伝達、統合されるかについてはほとんど不明であった。生沼研究者らは先に低分子量 G 蛋白質 R-Ras の関与明らかにしてきたが、本課題は軸索に対する誘引性ガイダンス因子 netrin-1 刺激の下流において R-Ras が Afadin に結合して細胞膜への移行を引き起こし、アクチン細胞骨格再編成により軸索分枝を呈すること、一方樹状突起においては M-Ras がアクチン細胞骨格系制御に関わる Lamellipodin に結合すること、さらに反発性ガイダンス因子 Sema4D 受容体 Plexin-B1 の下流の R-Ras の関与は軸索と樹状突起に共通であることなどを、神経細胞プライマリーカルチャー系を用いた精力的な実験によって明らかにしたことは大きな成果であり、課題をほぼ達成したものと言える。これらの成果は論文発表も行っている。今後は同定したエフェクター系が他のガイダンス因子にも普遍的なものであるかの解明が注目されるとともに、軸索成長円錐および樹状突起先端部の詳細な解析と *in vivo* での検証が大いに期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Nariaki Iwasawa, Manabu Negishi, and * <u>Izumi Oinuma</u> (2012)
R-Ras controls axon branching through Afadin in cortical neurons.
<i>Molecular Biology of the Cell</i> 23:2793–2804. |
| 2. Gen-ichi Tasaka, Manabu Negishi, and * <u>Izumi Oinuma</u> (2012)
Semaphorin 4D/Plexin-B1-mediated M-Ras GAP activity regulates actin-based dendrite remodeling through Lamellipodin.
<i>The Journal of Neuroscience</i> 32:8293–8305. |
| 3. * <u>Izumi Oinuma</u> , Kana Kawada, Kiyoka Tsukagoshi, and Manabu Negishi (2012)
Rnd1 and Rnd3 targeting to lipid raft is required for p190 RhoGAP activation.
<i>Molecular Biology of the Cell</i> 23:1593–1604. |

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表、招待講演

1. 生沼泉
神経軸索ガイダンス分子セマフォリンの情報伝達機構
平成26年度日本生化学会奨励賞、受賞講演
2014年10月15日(国立京都国際会館)
2. 生沼泉
軸索形態調節におけるR-Rasの役割
第7回神経発生討論会
2014年3月14日(大阪大学)
3. 生沼泉、根岸学
軸索形態調節におけるR-Rasシグナル
第86回日本生化学会大会、シンポジウム
「神経回路形成のシグナル伝達クロストークを解くー神経再生応用に向けて」
2013年9月13日(パシフィコ横浜)
4. 生沼泉
神経軸索ガイダンス因子の情報伝達経路の解明
第15回花王研究奨励賞、受賞公演
2013年6月13日(花王芸術・科学財団)

5. Izumi Oinuma

R-Ras family GTPases in semaphorin signaling

日米脳科学情報交換セミナー

「Growth Cones and Axon Regeneration: Entering The Age of Informatics」

2012年10月10日(米国ニューオリンズ)

6. 生沼泉、根岸学

神経回路形成における R-Ras サブファミリーの役割

第31回日本神経科学大会、シンポジウム

「次世代の担い手による最先端脳科学」

2012年9月19日(名古屋国際会議場)

受賞

- 2014年 日本生化学会奨励賞
「神経軸索ガイダンス分子セマフォリンの情報伝達機構」
- 2013年 第5回 井上リサーチアワード
「神経ガイダンスの分子基盤の解明-神経再生応用に向けて」
- 2013年 第15回 花王研究奨励賞
「神経軸索ガイダンス因子の情報伝達経路の解明」

プレスリリース等

- 2012年6月13日
The Journal of Neuroscience に掲載された論文の内容に関して、京都新聞(夕刊6面)に、「神経細胞の成長制御-再生応用に期待」というタイトルの記事として報道された。(右の記事)
- 2012年8月6日

われわれの近年の semaphorin による神経軸索の伸長阻害作用の分子メカニズムに関する研究内容

MONDAY
の岡野栄
間報道さ
(下の記

セマフォリンは、神経が伸びてくるのを阻むことにより、無秩序な配線を防ぐらしい。京都大の生沼泉助教らは、マウスの実験で、神経の突起の人格Vとなる物質を消失させて伸びを防ぐ仕組みを突き止めた。

脊髄損傷の場合は、この仕組みは、切れた神経の再生に邪魔になる。セマフォリンの働きを少し弱めてやれば、脊髄損傷の治療が可能になるかもしれない。慶応大の岡野栄之教授らと大日本住友製薬は、セマフォリンの働きを阻害する化合物を発見。脊髄損傷のラットに4週間投与すると傷ついた神経が一部再生し、後ろ足の動きが改善したという。(木須井麻子、今津博文)

脊髄損傷治療に光見える

について、読賣新聞の科学(朝刊31面)において、慶応大学光之教授の研究成果とともに、新事)

神経細胞の成長制御

京大グループ発見 再生に応用期待

脳の神経ネットワークの田坂元一さんたちのグループが見つけた。樹状突起が、正しい損傷した神経細胞の再生に形に成長するよう生に利用できる可能性があるという、米学会誌「ニューロサイエンス」13日に発表した。

樹状突起は木の枝のように分岐しており、樹状突起や信号を送り出す神経細胞の軸索が正しく伸びないと、神経回路が絡まって混乱が起こる。グループは軸索が伸びるときに道しるべとして働くタンパク質セマフォリンが、樹状突起でも道しるべとして働くことを突きとめた。マウスの胎児を使った実験で、セマフォリンの働きを阻害すると、脳の樹状突起の枝分かれが大幅に増えて絡み合うようになり、神経回路の形成が阻害された。

セマフォリンは人にもあり、同様の働きをしている可能性が高いという。生沼助教は「セマフォリンの働きを阻害することで、事故などで損傷した神経の樹状突起の成長を促すことができるかもしれない。成長に関わる他のタンパク質も見つけた」と話している。(松尾浩博)

