

## 研究テーマ

神経軸索ガイダンスシグナルにおける R-Ras の普遍的で新しい分子機構の解明と  
神経再生への応用

### 1. はじめに

学習や記憶など、複雑な脳機能を可能とする基本要素は、神経細胞が神経突起を伸長し、お互いに接着することにより形成される複雑な神経回路である。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長させ、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かなり正確で厳密にできており、これを可能としているのが軸索ガイダンス因子の誘導作用である。以前の研究において、我々は神経軸索ガイダンス分子 semaphorin の受容体 plexin の低分子量 G 蛋白質、Rnd1 を介した新規シグナル伝達経路の解明を試みた。その結果、Rnd1が反発性の軸索ガイダンス因子受容体Plexin-B1の細胞内領域に直接結合し、これまでに報告されていた Sema4D/Plexin-B1 の下流で起こる RhoA 活性化とはまったく異なる新しいシグナル経路を発見し、Plexin-B1 の細胞内領域が、Rnd1 の結合により、Ras ファミリー低分子量 G 蛋白質、R-Ras の直接の GAP としてはたらくことを示した。さらに、この Sema4D/Plexin-B1 による R-Ras 不活性化が神経細胞以外の細胞において、細胞接着因子である  $\beta$ 1インテグリンの活性を低下させることを示すことで、解明した分子機構が幅広い細胞で機能している可能性を示唆した。今回は、さらに、この Plexinによる低分子量 G 蛋白質の活性制御の普遍的メカニズムに迫る研究成果を得たので、それに関する知見を報告する。

### 2. 方法

先に述べた背景をふまえて、Plexin の GAP 活性の普遍性について検討した。R-Ras ファミリーは、R-Ras、TC21 (R-Ras2)、M-Ras (R-Ras3) の3つのメンバーからなる。そこで、Plexin の GAP 活性が、これらの R-Ras ファミリーに対して普遍的なものであるかを検討した。また、我々の以前の研究によりPlexin-B1に関しては、その GAP 活性の発揮に Rnd サブファミリーのなかで Rnd1 が Plexin-B1 の細胞内領域に直接結合することが必要であることがわかっていた。また、別のグループの報告により、別の Plexin サブファミリーの Plexin-A1 に関しても、Plexin としての GAP 活性が保存されていることが報告されており、その機能共役にもRnd1の結合が必須であることが報告されている。しかしながら、他の Plexin サブファミリーに関しては、そのような知見はない。そこで、他の Plexin サブファミリーである Plexin-C1 および Plexin-D1 に関して、R-Ras GAP 活性が保存されているのか、またその活性発揮にどの Rnd の機能共役が必要であるのかを検討した。

### 3. 結果 研究成果

#### 1) Plexin の GAP 活性の R-Ras ファミリーに対する普遍性について

PlexinのGAP 活性が、R-Rasファミリーに対して普遍的なものであるかを検討した。Plexin-B1を過剰発現させた細胞は Rnd1 の存在下において、リガンドである Sema4D 刺激依存的に、R-Ras のみならず

らず M-Ras に対する GAP としても働くことがわかった。一方で、TC21 に対する GAP 活性はなかった。また、R-Ras ファミリーのなかで R-Ras は軸索形成時に活性化され、軸索に集積するのに対し、M-Ras は軸索形成時には神経細胞にほとんど発現しておらず、樹状突起形成時に発現されることがわかった。また、大脳皮質初代培養神経細胞における内在性 M-Ras の欠失は、樹状突起伸展の抑制を引き起こし、すでに樹状突起を呈しているラット大脳皮質初代培養神経細胞に Sema4D 刺激を施すと、刺激後 10 分で内在性の M-Ras 活性が低下した。また、それに伴って樹状突起の退縮反応が引き起こされた。さらに、常時活性型変異体である M-Ras<sup>QL</sup> を神経細胞に発現させておくことにより、Sema4D 刺激による樹状突起退縮反応は阻止された。これらより、Sema4D 刺激は、Plexin-B1 の M-Ras GAP 活性を促進させることにより、神経細胞内在性の M-Ras の活性低下を引き起こし、樹状突起退縮を引き起こすことを明らかにした。

## 2) Plexin の GAP 活性の Plexin サブファミリー間での普遍性について

まず、Plexin サブファミリーのうちで Plexin-D1 に関して R-Ras GAP 活性を検討した。すると、Plexin-D1 は、Rnd サブファミリーのなかでも Rnd2 の存在下でのみ、リガンドである Sema4D 刺激依存的な R-Ras GAP 活性を発揮することがわかった。このことから、Plexin-A1 や Plexin-B1 が Rnd1 と共役するのとは異なり、Plexin-D1 は Rnd サブファミリーのなかでも Rnd2 と共役することが明らかになった。さらに、Plexin-C1 についてもその R-Ras GAP 活性の発現の様式を検討したところ、Plexin-C1 は Rnd1 の非存在下においても R-Ras GAP として機能することがわかった。Plexin の R-Ras GAP 活性は、異なる Plexin サブファミリー間で保存されている機能であるが、その活性発揮の制御の様式にバリエーションがあり、Plexin-A1 および Plexin-B1 では Rnd1 の機能共役を必要とするが、Plexin-D1 では Rnd2 の機能共役を必要とした。また、Plexin-C1 はいずれの Rnd サブファミリーの機能共役も必要でなかった。

## 4. 考察 まとめ

以上のように、Plexin の GAP 活性は R-Ras ファミリーの中で、R-Ras および M-Ras に普遍的であり、SemaD/Plexin-B1-Rnd1 複合体は軸索においては、R-Ras を不活性化させることにより、また、樹状突起においては、M-Ras を不活性化させることにより、反発作用を発揮していることがわかった。さらに、Plexin の GAP 活性は異なる Plexin サブファミリー間に共通であり、その GAP 活性の制御において、異なる Rnd サブファミリーの共役を受けていることを明らかにした。

## 5. 発表論文

1) の部分は以下の論文として発表した。

Saito Y., I. Oinuma, S. Fujimoto, and M. Negishi. 2009. *EMBO Rep.* 10:614-621.

2) の部分は以下の論文として発表した。

Uesugi K., I. Oinuma, H. Katoh, and M. Negishi. 2009. *J. Biol. Chem.* 284:6743-6751.