

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 12 年度博士課程進学
氏名 小林陽子
指導教官名 加藤茂明

論文題目

脳神経分化における細胞形態形成の制御機構 —新規 Rho GTPase 活性化蛋白質 Nadrin の機能解析—

脳神経系は、巨大な情報処理器官であり、神経細胞突起により形成される複雑なネットワークによって、認知、思考、感情、意志などの複雑な高次精神機能を司っている。脳神経系は、数千億個にもものぼる神経細胞とその周囲をとりまくグリア細胞から構成される。その中で、グリア細胞の占める割合は神経細胞の数十倍にも及ぶといわれている。成熟した哺乳動物の中樞神経系のグリア細胞には、アストロサイト、オリゴデンドロサイトおよびミクログリアが存在し、個々に特有の機能を果たしている。アストロサイトは中樞神経系で最も数の多いグリア細胞であり、星状の形態が特徴で、多数の突起を周囲に伸ばして、脳の外表面やシナプス、ランビエ絞輪、血管などを取り囲む。アストロサイトは神経細胞の支持作用、血液脳関門の形成、神経伝達物質(グルタミン酸など)の代謝、栄養物質や神経発育因子の産出など神経活動を支える重要な機能を有している。またアストロサイトは脳損傷時などには、周囲の神経細胞の置かれた状況に応じて自らの形態と機能をダイナミックに変化させることができる。しかしこれらの細胞形態変化、それに伴う機能変化および細胞遊走のメカニズムの詳細は明らかになっていない。これまでに神経疾患において、神経細胞の形態や機能は詳細に解析されてきたが、アストロサイトをはじめとするグリア細胞については報告が少ないことから、アストロサイトの細胞形態変化の理解は重要であると考えられる。

一方、細胞の形態変化や細胞遊走などの過程では、アクチン骨格系の再編成が必要であり、これらは複雑なシグナル伝達系によって制御されている。細胞の形態変化など、アクチン骨格系は低分子量 G 蛋白質の Rho ファミリーが制御している。多くの細胞で Rho はアクチンストレスファイバーやフォーカルコンタクトの形成を、Rac は葉状仮足の形成を、Cdc42 は糸状仮足の形成をそれぞれ制御している。しかし Rho ファミリー間の活性制御

機構については依然不明な点も多い。

そこで本研究では、本研究室で同定された新規 Rho GTPase 活性化蛋白質 Nadrin(Neuron-associated developmentally regulated protein)の機能解析を通じ、アストロサイトの形態変化のメカニズムおよび細胞骨格系制御機構の解析を試みた。

Nadrin のアストロサイトに対する影響の解析

Nadrin は発現クローニング法により、PC12 細胞よりクローニングされた新規分子である。多くの組織に広範に発現しており、脳では神経細胞のみならず、アストロサイトにも発現していることが明らかになった。Nadrin は N 末端側より分子間相互作用に関わる coiled-coil 領域、RhoGAP(GTPase-activating protein)領域、グルタミンリピード、SH3(Src homology)結合領域、PDZ(PSD-95/Dlg/ZO-1)結合領域など多くの機能領域を有する。しかしながらその機能は不明であった。

細胞の形態変化など、アクチン骨格系を制御する Rho ファミリーG 蛋白質は分子スイッチとして、それぞれ GDP/GTP 交換因子(GEF)と GTPase 活性化因子(GAP)の二つの因子の助けをかりて、GTP 結合型 (活性型) と GDP 結合型 (不活性型) の二つの状態をとる。Nadrin は Rho ファミリーG 蛋白質の GTPase 活性を促進し、Rho ファミリーG 蛋白質を不活性型にする RhoGAP 領域を有することから、Rho ファミリーG 蛋白質の活性制御を通じ、細胞骨格系制御に関与することが予想された。

マウスではアストロサイトのマーカーである GFAP (glial fibrillary acidic protein) 陽性細胞は、胎生 16 日ころより出現をはじめ、生後発達に伴い、さらにその数は増加する。またアストロサイトは分化や脳損傷などに応答し、平坦な石垣状の細胞から、グリア突起を伸展した星状の細胞に形態を変化させ、reactive astrocytes と呼ばれるアストロサイトへと分化する。形態変化前の細胞ではストレスファイバーが強く観察されるが、形態変化をおこすためには RhoA を不活性化し、ストレスファイバーを消失させる必要があると考えられる。

そこで、生体内における Nadrin の機能を明らかにするために、マウスアストロサイトを用いて Nadrin の細胞形態変化や細胞移動に対する影響を検討した。まず 1.マウス脳の発達段階での発現パターン、2.初代培養のアストロサイトにおける Nadrin の細胞内局在を検討した。また初代培養のアストロサイトは、cAMP の膜透過性アナログである dBcAMP や Forskolin によって細胞内 cAMP 濃度を上昇させると、GFAP の発現が上昇し、急速に星状の細胞に形態を変化させ、分化することが知られている。そこで、dBcAMP を用いて 3. Nadrin の形態変化への影響および分化マーカーである GFAP の発現量変化の検討を行なった。さらに 4.形態変化に伴う RhoA の活性の変化を、GST-pull down 法により検討した。

その結果、大脳皮質および海馬では、胎児期から誕生前後にかけて、一旦発現の低下が見られるものの、生後再び発達に伴って発現が増加することが示された。また小脳においては生後 3 日目ころより発現をはじめ、発達に伴い、発現量の増加が見られた。GFAP は各部位で生後より発現量が増加するが、この増加の時期と Nadrin の発現増加の時期が重なることから、Nadrin はアストロサイトの分化に関与している可能性が考えられた。

細胞内局在を内因性の Nadrin の抗体染色により、また GFP を融合した Nadrin を強制発現して検討したところ、主に細胞質に存在し、核周辺部や、形態変化前の細胞では特にラフリング膜に局在することが観察された。同時に Nadrin が局在する部位ではストレスファイバーの消失が見られ、このことは RhoA の不活性化および

Rac の活性化によるものと考えられた。よって Nadrin は細胞内において Rac ではなく RhoA に対して GAP 活性を有することが示唆された。

また dBcAMP 投与による形態変化時の RhoA の活性を、活性型である GTP 型 RhoA に特異的に結合する RhotekinRBD を GST に融合したものを用いた GST-pull down 法にて検討を行なった。その結果、dBcAMP 投与後、形態変化に伴い、RhoA の活性が低下することが示された。

次に dBcAMP によってアストロサイトを刺激し、細胞形態変化に対する影響を検討した結果、Nadrin を強制発現させた細胞では、発現していない細胞と比較し、分化マーカーである GFAP の発現が上昇することが観察された。さらに cAMP 刺激に対する応答の効率が著しく上がり、短時間で星状の細胞に形態が変わることを見出した。また内因性の Nadrin が多い細胞ほど、形態変化が早いことが観察されたことから、Nadrin の発現量の増加が GFAP の発現量の増加を引き起こす一つの要因となっており、その結果、形態変化を引き起こす可能性が示唆された。以上の結果から、Nadrin は RhoA を不活性化する GAP として機能することによって、アストロサイトの形態変化を促進していると考えられた。

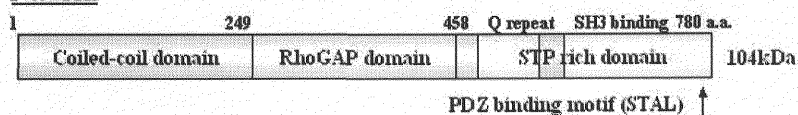
Nadrin の細胞内における GAP 活性の検討

アストロサイトにおける結果は、Nadrin がアストロサイトの細胞内で RhoA に対し、GAP 活性を持つ可能性を示唆していた。しかしながら、これまでに Nadrin の GAP 領域を用いた *in vitro* GAP アッセイにより、Nadrin が GAP 活性を有することは明らかにされていたものの、分子全長が細胞内で GAP 活性を有するのかは明らかではなかった。そこで実際に Nadrin の細胞内での GAP 活性の有無、および Rho ファミリー G 蛋白質それぞれに対する特異性について検討を行なった。

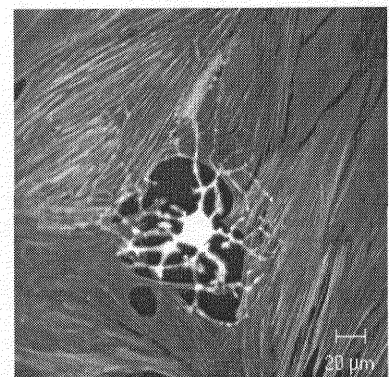
Nadrin の細胞内における RhoA および Rac に対する影響を検討するために、293 細胞に野生型および GAP 領域に点変異体を入れた不活性化型 Nadrin を強制発現し、細胞内での活性を検討した。それぞれ活性型である GTP 型 RhoA および Rac に特異的に結合する RhotekinRBD および PAKCRIB を GST に融合させた蛋白質を用いた GST-pull down アッセイを行なった。

その結果、Nadrin は RhoA に対して GAP 活性をもつことが見出された。点変異体では RhoA の不活性化が見られないことから、直接 RhoA の GTPase 活性を促進し、RhoA を不活性化していることが示された。また Rac に対しては GAP 活性を示さず、むしろ Rac の活性化が見られた。従って、Nadrin は細胞内では RhoA に対する GAP として機能していると考えられた。また一般に Rac、RhoA の活性は拮抗すると考えられているが、その制御はいまだ明らかとなっていない。以上の結果と前述の細胞内局在の結果より、Nadrin は Rac、RhoA 間の活性制御を直接担う分子である可能性が示唆された。

Nadrin



上：Nadrin の一次構造、右：dBcAMP 投与後 2 時間のアストロサイト。中央の GFP-Nadrin が発現している細胞のみ、形態変化が起きている。アクチン (Phalloidin) との二重染色。



Nadrin の GAP 活性の制御機構の解析

Nadrin がどのようなメカニズムで、RhoGAPとしての機能を発揮しているのかを明らかにするために、Nadrin の Rho GAP 活性の制御機構について検討を行なった。Nadrin は GAP 領域をはさんで N 末端側に coiled-coil 領域を持ち、C 末端側に SH3 結合領域や PDZ 結合領域(STAL)を持つことから、これらの部位で他の分子と相互作用している可能性が考えられた。そこでこれらの領域に相互作用する因子の検索を試みた。

その結果、Nadrin は N 末端側の coiled-coil 領域で自分自身と相互作用して 2 量体化することが示された。相同性検索の結果、amphiphysin などの分子の、2 量体化に関わる BAR (BIN1/amphiphysin/RVS) 領域と高い相同性を持つことが明らかとなった。さらに N 末端側と C 末端側が相互作用し、GAP 領域をマスクすることで自ら GAP 活性を抑制している可能性が示唆された。この相互作用は EGF や cAMP 刺激によって、解離することが示されたが、解離の詳細なメカニズムは今後の課題である。しかしながらこれまで活性化に関与する GEF などでは GEF 活性の制御機構が明らかになってきているが、GAP 活性の制御機構については報告がなく、GAP にも同様に活性制御機構が存在することが示唆されたことは大きな意義をもつと考えられる。

さらに免疫沈降法により、相互作用する因子の検索を行なったところ、Nadrin は C 末端の PDZ 結合領域で EBP50(ERM binding phosphoprotein 50、別名 NHE-RF1: Na⁺/H⁺ exchanger isoform3 regulatory factor 1)に結合し、EBP50 を介して、ERM(Ezrin/Radixin/Moesin)と間接的に相互作用することを見出した。ERM は N 末端側でリン脂質や膜受容体等と直接あるいは PDZ 蛋白質である EBP50 等を介して間接的に結合し、C 末側でアクチンと結合することで細胞膜と細胞骨格系をつなぐ役割を担うと考えられている。EBP50 は、ERM に結合する一方、NHE3(Na⁺/H⁺ exchanger isoform3)や β -AR(adrenergic receptor)、PDGFR などの膜貫通受容体に PDZ 領域を介して相互作用することが知られている。Nadrin の EBP50/ERM との複合体は、293 細胞および COS-7 細胞では EGF などの刺激依存的に形成されることを見出した。アストロサイトにおいては、cAMP で形態変化を誘発した時に ERM と複合体を形成していることが示された。従って Nadrin は N 末端と C 末端が解離することにより、EBP50 と結合し、ERM と複合体形成を形成し、ERM とリンクしている RhoA を不活性化することで、アクチン骨格系の制御に寄与しているものと考えられた。

まとめ

本研究において、Nadrin が RhoA を特異的に不活性化する RhoGAP として機能すること、さらにアストロサイトにおいては、形態変化および機能分化を促進する分子であることを示した。また Nadrin の RhoGAP 活性が、細胞形態変化を引き起こすシグナルにより制御されている可能性を示す結果を得たことから、GEF だけではなく、RhoGAP にもその活性を制御する機構が存在する可能性を示した。これは Rho ファミリー G 蛋白質が活性化の制御に加え、不活性化についても厳密に制御されていることを示唆するものであると考えられる。しかしながら、Nadrin を介した形態形成制御機構には不明な点が多く残されている。また Nadrin とてんかんなどの神経疾患との関連についても興味を持たれる。今後の解析によって、それらの詳細な解明が期待される。