

論文の内容の要旨

Plexin-A1 and Plexin-B1 interact and modulate their downstream signaling

プレキシン A1 と B1 の相互作用による下流のシグナル調節

指導教官 清水 孝雄 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

臼井 洋

セマフォリンは神経回路形成、血管形成、免疫担当細胞の活性化など、生体内のさまざまなプロセスに関わることが明らかになりつつある、分泌型や細胞膜結合型の蛋白質のファミリー分子である。脊椎動物のセマフォリンはクラス3から7まで約20種類がこれまでに同定されているが、その中でもクラス3のセマフォリン3Aはそのノックアウトマウスの解析で脳神経や嗅覚神経などの回路形成に必須であることが示されており、とくに注目されている。セマフォリン3Aは分泌型のセマフォリンで、発生中の神経軸索に発現している受容体ニューロピリン-1と結合し、そのニューロピリン-1と複合体を形成しているプレキシンA1を介して細胞内にシグナルを伝え、神経軸索に対する反発作用を引き起こしていると考えられている。しかしながら、プレキシンA1の下流でどのような分子がシグナル伝達に関わっているのかはまだ殆ど分かっていない。

プレキシンA1の下流のシグナル伝達経路を明らかにするため、酵母を用いたツーハイブリッド法にてプレキシンA1の細胞内領域と結合する蛋白を探索したところ、同じファミリー分子のプレキシンB1がプレキシンA1と細胞内領域で結合することを見出した。プレキシンは細胞膜を一回貫通するタイプの約2,000アミノ酸の蛋白質で、AからDまで9種類(A1~A4, B1~B3, C1, D1)がこれまでに同定されており、プレキシンB1はセマフォリン4Dに対する受容体であることが報告されている。同一ファミリー内の異種の受容体同士が二量体を形成することによってシグナルを伝える例はこれまでも幾つかの報告があるが、プレキシン

ンファミリーに関してはこれまで報告が無く新しい知見である。

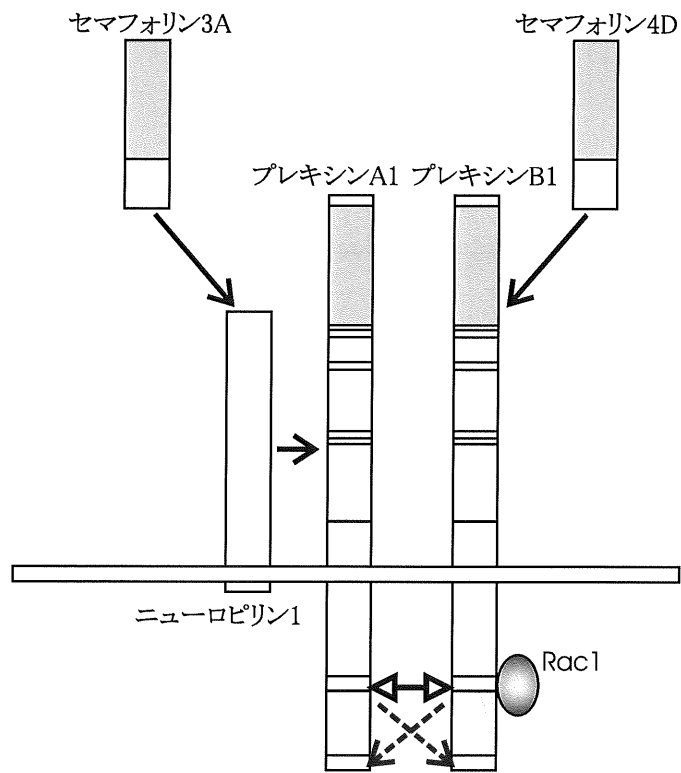
マウスのプレキシシンB1のcDNAを全長にわたりクローニング、塩基配列を決定し、哺乳動物細胞の発現系を用いた免疫沈降法にてこの結合をさらに確認した。また、この結合はプレキシシンA2、A3では認められず、プレキシシンA1に特異的であることも明らかにした。ノーザンブロット法にてプレキシシンA1とB1との成体マウスでの発現パターンを解析したところ、主として脳で両者のmRNAの強い発現が認められた。

プレキシシンA1のいくつかの断片を用いた免疫沈降法にて、プレキシシンA1のC末端の20アミノ酸がプレキシシンB1との結合に必須であることを見出した。以下、プレキシシンA1のC末端の20アミノ酸を欠損させた蛋白(A1 Δ 20)を比較対照として、プレキシシンA1とプレキシシンB1との相互作用を調べることにした。

セマフォリン3Aによる成長円錐の縮退をRhoファミリー分子のRac1が媒介していること、プレキシシンA1とRnd1・RhoD、プレキシシンB1とRac1・RhoAがそれぞれ特異的に結合すること、また、これらのRhoファミリー分子がプレキシシンのシグナル伝達を媒介しているとの報告がなされている。GST pull-down法にて、Rac1の活性型とプレキシシンB1との結合をみる実験で、プレキシシンA1またはA1 Δ 20を加えたところ、プレキシシンA1によりRac1とプレキシシンB1との結合が増強することが認められた。

また、プレキシシンA1はセマフォリン3Aの刺激により神経軸索の成長円錐の縮退をひきおこすこと、および、これと類似した現象として、培養細胞のCOS7の縮小もひきおこすことが報告されている。また、プレキシシンA1の細胞外領域はその細胞縮退機能の自己抑制に関わっており、プレキシシンA1の細胞外領域を欠損させると、プレキシシンA1単独で軸索の成長円錐やCOS7細胞の縮退をひきおこすことができることが報告されている。この現象を利用し、COS7細胞におけるプレキシシンA1による細胞縮小に対するプレキシシンB1の影響を調べたところ、プレキシシンA1による細胞縮小はプレキシシンB1により殆ど影響を受けなかったが、プレキシシンA1 Δ 20ではプレキシシンA1による細胞縮小がプレキシシンB1によってほぼ完全に抑制された。ごく最近、プレキシシンB1はセマフォリン4Dの下流でRnd1を介して、COS7細胞の縮退を起こすことが報告された。このこともふまえると、プレキシシンA1とB1それぞれが別個にリガンドにより刺激された際に、プレキシシンA1とB1との間の相互作用により、適切な細胞応答を引き起こすようなメカニズムが働いていることが考えられる。

なお、上記のCOS7細胞の縮退の実験では、他グループでは、プレキシシンなどの導入遺伝子の発現を免疫染色により確認しているが、これでは染色の操作で縮退している細胞が優先的にはがれやすくなり、縮退の正確な評価が困難である。私は、プレキシシンA1、B1それぞれの下流にIRES (Internal Ribosomal Entry Site) を介して緑色・赤色蛍光蛋白を同一のベクターに組み込み、プレキシシンA1、B1の双方を発現している細胞を染色の操作をせずに直接観察できるように工夫をした。この方法により、より精緻に細胞の縮退の割合を測定することが可能となった。



↓ ↓
成長円錐の縮退