

## 論文の内容の要旨

論文題目 チロシンリン酸化される RhoGAP 蛋白質 TCGAP  
の神経系における機能解析

指導教員 山本 雅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 劉 輝

Src 型チロシンキナーゼは非受容体型チロシンキナーゼの 1 サブファミリーであり、哺乳類では Src、Fyn、Yes、Lyn、Lck、Hck、Blk、Fgr の 8 つから構成される。Src 型キナーゼは様々な組織でほぼ普遍的に発現しているが、神経系と血球系では特に高い発現が認められる。Src ファミリーのうち、Src、Fyn、Lyn、Yes、Lck の 5 つが神経系で発現しており、中でも Fyn の神経系における重要性が主に Fyn 欠損マウスの解析から明らかになってきた。Fyn 欠損マウスには海馬構造の形成不全、ミエリン形成不全などの脳発達異常が見られる。また Fyn 欠損マウスは LTP の減弱や空間記憶の障害、恐怖心の亢進、エタノール感受性の亢進など様々な神経機能の異常も示す。このことは Fyn が神経系において多様なシグナル伝達系に関与し、脳発達および脳機能の両方に重要な役割を果たすことを示唆している。最近の研究により、CNR、mDab1、N-WASP、PSD-95、p190RhoGAP、NMDA 受容体など多くの Fyn の結合蛋白質および標的基質が同定され、それらが神経細胞の移動、シナプス可塑性、オリゴデンドロサイトの分化および神経細胞の軸索成長・ガイダンスにおいて、重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。しかし、Fyn が神経系のシグナル伝達に関与するメカニズムについては未解明な部分が多く、さ

らなる Src 型キナーゼ結合分子・標的基質の同定が必要である。

神経系においてアクチン細胞骨格は、神経線維構造の形成・維持、神経細胞の移動、形態変化、オリゴデンドロサイトの分化、細胞内輸送、グルタミン酸受容体クラスター化などに密接に関与している。Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質はアクチン細胞骨格系を制御する主要な分子群の 1 つである。Rho ファミリーの中で RhoA、Rac1、Cdc42 についての研究が特に進んでいる。RhoA は焦点接着やストレスファイバ形成を制御している。また、Rac1 は膜のラメリポディア形成、Cdc42 はフィロポディアの形成を制御している。神経系では Rho ファミリーは神経系の発生における神経突起伸長や、成長円錐ガイダンス、神経細胞移動、中枢神経系の樹状突起上のスパインの形態、シナプスでの神経伝達物質を介した神経機能の調節などを制御している。Rho ファミリーの低分子量 GTP 結合蛋白質は不活性型である GDP 結合型と活性化型である GTP 結合型として存在し、主に GEF (guanine nucleotide exchange factor) と GAP (GTPase-activating protein) により活性が制御されている。RhoGAP は GTP 結合型 Rho ファミリー蛋白質の GTP 加水分解活性を促進して、不活性型である GDP 結合型の形成を誘導し、Rho ファミリーのシグナル伝達を抑制する。RhoGAP ファミリーのうち、p190 RhoGAP は Src と Fyn の標的基質であり、神経系で重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、神経系では多くの RhoGEF、RhoGAP が発現しており、それぞれの RhoGEF、RhoGAP がどの時期、どの細胞で機能しているか、またどのようにシグナル伝達系の制御を受けるかはよくわかっていない。

本研究では神経系における Fyn シグナル伝達に関与する分子を同定するために、yeast two-hybrid 法により Fyn 結合分子を探索した。ヒト Fyn の全長をベイトとし、ヒト胎児脳の cDNA ライブラリーを用いて、 $8.6 \times 10^6$  個独立クローンのスクリーニングを行った結果、80 個の候補クローンが得られた。本研究では得られた候補分子の中で、RhoGAP ドメインを持つ、解析開始当時は新規であった蛋白質 TCGAP に着目して解析を行った。

TCGAP は最近同定された RhoGAP であり、脂肪細胞においてインシュリンによるグルコース輸送の制御に関わることが報告された。ヒト TCGAP は全長 1126 アミノ酸から成り、N 末端側に phox homology (PX) ドメイン、SH3

ドメイン、RhoGAP ドメインを持ち、C 末端に 22 個の proline-rich 領域を持つ蛋白質である。本研究では、まず細胞内での TCGAP と Fyn との結合を調べた。HEK293T 細胞再構成系において、TCGAP と Fyn を一過性に発現させ、免疫共沈実験を行った結果、TCGAP は Fyn と結合した。Fyn の変異体を用いた結果、Fyn には TCGAP との結合に必要な領域は Fyn の SH3 ドメイン領域であることが強く示唆された。また、再構成系により TCGAP は Fyn によってチロシンリン酸化された。4 週齢の野生型マウスと Fyn 欠損マウスから脳可溶化液を調製し、抗 TCGAP 抗体で免疫沈降を行った結果、マウス脳の内在性 TCGAP は Fyn によってチロシンリン酸化されることが示唆された。

次に TCGAP の RhoGAP ドメインが実際に細胞内で Rho ファミリーの GTPase に対して GAP 活性を持っているかを検討した。そのために Cdc42、Rac1 および RhoA について、TCGAP の野生型と GAP 活性欠失変異体 R350I を使い、Rho エフェクタープルダウンアッセイを行った。この方法は活性化型の Cdc42、Rac1 が PAK の CRIB ドメインに結合し、活性化型の RhoA が Rhotekin の RBD ドメインに結合する性質を利用している。その結果、TCGAP は Cdc42 に対して選択的な RhoGAP 活性を示した。さらに活性化型 Fyn と TCGAP を共発現させたところ、TCGAP の RhoGAP 活性は Fyn によるリン酸化で抑制されることが示された。

各器官における TCGAP の発現パターンを検討するため、*in situ* hybridization 法を行った。胎生期と生後のマウスでの発現を調べた結果、TCGAP mRNA は神経系に特異的な強い発現を示した。TCGAP mRNA のマウス脳における経時的発現パターンを検討した結果、胎児期と生後 1 週まで脳では全体的に発現し、特に嗅球、線条体、大脳皮質、海馬、小脳、視床で発現が高かった。生後 2 週以後の成体マウスにおいて、TCGAP mRNA は主に前脳の神経細胞層（嗅球、線条体、大脳皮質、海馬）で発現が高く、小脳と視床には発現がほとんど見られなかった。

TCGAP は成熟脳では前脳に特異的に発現することから、海馬由来の初代培養神経細胞を用いて、TCGAP の神経細胞内の局在を観察した。免疫染色を行った結果、未成熟神経細胞では TCGAP は細胞質にも神経突起にも存在していた。一方、成熟神経細胞では TCGAP は細胞質、軸索および樹状突起に存在し

たが、特にスパインへの局在が鮮明に観察された。これに対応してマウス脳から調製した postsynaptic density (PSD)画分を用いて行ったウエスタンブロットより、TCGAP が PSD に濃縮されていることが示された。

TCGAP が発達段階の脳で高度に発現するため、PC12 細胞の系を用いて、TCGAP の神経突起伸長における役割を解析した。PC12 細胞は神経成長因子 NGF によって誘導される神経分化・神経突起伸長のモデル系として使用されている。Src や Fyn を導入した PC12 細胞は NGF 刺激による神経突起伸長が増強される。また Src や Fyn の抑制により、PC12 細胞の NGF 刺激による神経突起伸長が抑制されると報告されている。しかし、Src 型キナーゼが NGF・TrkA レセプター伝達経路にどのようにかかわっているか、標的基質、メカニズムはまだ完全には理解されていない。

レトロウィルスベクターを用いて、PC12 細胞に野生型 TCGAP を過剰発現させた結果、NGF による神経突起伸長が抑えられた。一方、TCGAP の GAP 活性欠失変異体 R350I の過剰発現は NGF による神経突起伸長を促進した。このことから、TCGAP は Cdc42 に対する GAP として、PC12 細胞の神経突起伸長を抑制すると考えられる。また、NGF 刺激により、PC12 細胞の内在性 TCGAP のチロシンリン酸化レベルが上昇した。この TCGAP のチロシンリン酸化は Src ファミリーの阻害剤 PP2 によって抑制された。これらの結果から、NGF 刺激に伴い、Src ファミリーにより TCGAP がチロシンリン酸化され、その GAP 活性が抑制されることが、Cdc42 の活性上昇および神経突起の伸長に寄与すると考えられる。以上の PC12 細胞を用いた実験結果より、神経細胞においても TCGAP およびその Fyn によるリン酸化は軸索および樹状突起の発達に関与していることが期待される。

本研究では、脳における Fyn の新規基質として TCGAP を同定し、その機能解析および Fyn によるリン酸化の意義付けを行った。TCGAP は発達段階の脳では軸索、樹状突起の伸長発達のほか、神経細胞の移動などにも関与しているかもしれない。TCGAP は成熟した脳において、シナプス、特に PSD に濃縮されていることから、TCGAP は成熟神経細胞の後シナプスにおいて重要な役割を果たしていると考えられる。発達脳・成熟脳における内在性 TCGAP の役割の解明は今後の課題である。