The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Sema-4D受容体PlexinB1のシグナル伝達に関与する新規RhoGEFの性状解析
Author(s)	松本, 浩
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45566
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【4】

氏　　名	松本　浩（まつもと　ひろし）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学位記番号	第　19385　号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	**Sema-4D受容体PlexinB1のシグナル伝達に関与する新規RhoGEFの性状解析**
論文審査委員	（主査） 教　授　古郷　幹彦 （副査） 教　授　上崎　善規　　助教授　竹村　元秀　　講　師　戸田　孝史

論文内容の要旨

1．研究背景と目的

神経回路形成時、神経細胞の軸索先端にある成長円錐がガイダンス分子を認識し、成長方向を決定すると考えられている。それらガイダンス分子の一つとして同定されたセマフォリンファミリーは、構造上、細胞膜結合型と分泌型とに分けられ、多彩な生理機能を持つことが明らかになりつつある。Furuyama らによってクローニングされたSema-4D は神経系や免疫系を中心に発現している膜結合型セマフォリン分子であり、最近、その受容体としてPlexinB1 が同定され、PlexinB1 のシグナル伝達系にアクチン細胞骨格系を制御する低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリー分子が関与することが明らかにされてきた。しかしながら、神経系における Sema-4D の具体的な生理機能については依然不明な点が多いことから、本研究では Sema-4D-PlexinB1 の生理機能を明らかにするため、そのシグナル伝達系の解析をさらに進めた。

2．結果

(1)PlexinB1 の細胞内領域に結合する RhoGEF10 分子の同定

Yeast two hybrid 法により、PlexinB1 の細胞内領域に新規の Rho ファミリーguanine nucleotide exchange factor（グアニンヌクレオチド交換因子：RhoGEF）が結合することを見出した。本分子は、従来の RhoGEF 分子がグアニンヌクレオチド交換反応を触媒する領域である DH（dbl homology）領域とそれに引き続く PH（pleckstrin homology）領域から構成されるタンデム構造を有しているのに対し、PH 領域を持たない全く新しいタイプのRhoGEF 分子であった。この RhoGEF 分子は、最近、海外の病因遺伝子解析グループから、109 番目の部分アミノ酸変異により髄鞘変性を伴う末梢神経変性疾患を引き起こすことが報告されている RhoGEF10 と同一分子であった。

(2)RhoGEF10 分子の発現の解析

RhoGEF10 のマウス各種臓器における発現を RT-PCR を用いて検討した結果、広範囲な臓器に発現を認めた。発

生段階では、小脳では生後 15－21 日齢にかけて強い発現を認めた。また、末梢神経における髄鞘形成細胞であるシュワン細胞での RhoGEF10 および PlexinB1 の発現を検討するため、ラット坐骨神経よりシュワン細胞を選択的に培養し、RT-PCR による解析を行ったところ、RhoGEF10 および PlexinB1 の発現をともに認めた。

(3)PlexinB1 と RhoGEF10 分子の特異的結合の解析

PlexinB1 と RhoGEF10 のそれぞれの結合部位を同定するために、glutathione-S-transferase (GST)-fusion of RhoGEF10 DH 領域と PlexinB1 細胞内領域を段階的に欠損させた mutant を用いてアフィニティ結合実験を行った結果、PlexinB1 細胞内領域に存在する CRIB（Cdc42/Rac interacting binding）領域を含む mutant との結合を認めた。Yeast two hybrid 法を用いた結合実験でも、同様の結果が得られた。また、PlexinB1 の細胞内領域に存在する CRIB 領域に結合することが知られる活性化型 Rac1 分子は、RhoGEF10 DH 領域の PlexinB1 細胞内領域への結合を阻害した。以上の結果から、RhoGEF10 は PlexinB1 細胞内領域に存在する CRIB 領域に結合することが明らかになった。

(4)RhoGEF10 の性状解析

RhoGEF10 がどの種類の低分子 GTP 結合蛋白質に対するグアニンヌクレオチド交換因子であるかを明らかにするため、Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質、RhoA, Rac1, Cdc42 に対して ^{3}H-GDP 解離反応測定や GST-rhotekin および GST-PAK を用いた pull down assay を行った結果、いずれの G 蛋白質に対しても顕著な GEF 活性は認められなかったが、Rac1 ヌクレオチドフリーフォームへの結合を認めた。

(5)protein kinase 刺激下蛋白質発現の解析

ヒトにおいて末梢神経の髄鞘形成不全の原因として報告されている RhoGEF10 の 109 番目アミノ酸スレオニンからイソロイシンへの mutant Thr109Ile と wild type との蛋白質発現量を protein kinase 刺激下にて検討したところ、RhoGEF10 wild type の蛋白質発現量は低下したが、RhoGEF10 Thr109Ile の蛋白質発現量の低下は認められなかった。

３．まとめ

以上の結果より、Sema-4D-PlexinB1 シグナル伝達機構がこの新規の RhoGEF10 と協調して、末梢神経形成、特にシュワン細胞の分化や髄鞘化等の機能制御に関与する可能性が示され、その際 Rac1 等の Rho ファミリー分子の情報伝達系との相互作用や RhoGEF10 の発現量の制御が重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、Sema-4D 受容体 PlexinB1 細胞内領域に RhoGEF10 が結合することを見い出し、その性状解析を行ったものである。RhoGEF10 の point mutation による末梢神経髄鞘形成不全が報告されている。末梢神経髄鞘形成細胞シュワン細胞において PlexinB1 および RhoGEF10 の発現をともに認めた。また、protein kinase 刺激下において RhoGEF10 wild type と point mutant 間に蛋白質発現量の差を認めたことから、RhoGEF10 蛋白質発現量の制御が末梢神経髄鞘形成に重要な役割を果たしている可能性を示した。

この論文は、Sema-4D の神経系での生理機能について検討したものであり、末梢神経髄鞘形成不全の発症機序解明につながる可能性からも非常に有意義であり、博士（歯学）の学位に値するものと認める。