

Title	RA-RhoGAP, Rap-activated Rho GTPase-activating Protein Implicated in Neurite Outgrowth through Rho
Author(s)	山田, 知広
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/47363
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	やま だ とも ひろ 山 田 知 広
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 20912 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	RA-RhoGAP, Rap-activated Rho GTPase-activating Protein Implicated in Neurite Outgrowth through Rho (Rap 依存的な Rho GTPase 活性促進タンパク質である RA-RhoGAP は Rho を介した神経突起伸長に関与する)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 内山 安男 教授 狩野 方伸

論文内容の要旨

〔 目的 〕

神経細胞は、脳内において複雑なネットワークを形成しているが、その基本機能はシグナルを受け取りそれを統合して他の細胞へ伝えることである。この機能の遂行には軸索と樹状突起の形成が重要である。軸索・樹状突起とも最初は区別のつかない未成熟な神経突起から形成されていくが、どうして複数ある突起のうち 1 本のみが選択され急速に伸長し、軸索となるのかについては、未だ不明である。軸索選択の分子メカニズムとして、軸索になる神経突起の成長円錐におけるアクチン繊維の形成阻害が重要であることが知られている。その分子メカニズムのひとつとして、Rho 低分子量 G タンパク質の不活性化が関与している。一方、軸索になる神経突起の成長円錐における Rap1 低分子量 G タンパク質の活性化が関与している。しかし、これら二つの低分子量 G タンパク質の関係については、明らかにされていない。そこで、Rap1 と Rho の関係を明らかにし、Rap1 と Rho を結びつける分子機構を調べた。

〔 方法ならびに成績 〕

神経突起伸長における Rap1 と Rho の関係

神経芽細胞腫の cell line である NG108 細胞に活性化型である GTP 結合型 Rap1B を発現させると、神経突起の伸長を促進した。GTP 結合型 RhoA を共発現させると、この GTP 結合型 Rap1B による神経突起の伸長を抑制した。NG108 細胞に RapGAP を発現させて Rap1 の活性化を阻害すると、神経突起の伸長が抑制された。Rho のインヒビターである C3 を共発現させると、この RapGAP による抑制効果を解除した。これらの結果から、Rap1 による神経突起伸長には Rho の不活性化が必要であり、Rap1 が Rho の活性を調節していることが明らかになった。

Rap1 と Rho を繋ぐ RA-RhoGAP の同定

そこで、この Rap1 と Rho を結びつける分子機構を明らかにするために、GTP 結合型 Rap1B に結合する標的タンパク質を yeast two-hybrid 法によりヒト脳 cDNA ライブラリーから検索したところ、RA-RhoGAP (Rap-activated RhoGAP) を同定した。RA-RhoGAP は、N 末から PH ドメイン、RA ドメイン、RhoGAP ドメイン、そしてふたつのアネキシンリピートを有していた。

Rap1 による RA-RhoGAP の GAP 活性の活性化

RA-RhoGAP の GAP 活性を検討したところ、Rho 特異的であった。RA-RhoGAP に GTP γ S 結合型 Rap1B を結合させると、GAP 活性が活性化された。Rap1B と結合する RA ドメインを欠損した変異体 (RA-RhoGAP- Δ RA) は、RA-RhoGAP wild type よりも高い GAP 活性を示した。これらの結果から、RA ドメインが RhoGAP ドメインの GAP 活性を抑制し、RA ドメインに Rap1 が結合したときに抑制されていた GAP 活性を解除して GAP 活性を活性化することが明らかになった。

神経突起伸長における RA-RhoGAP の関与

NG108 細胞に RA-RhoGAP を発現させると、神経突起の伸長を促進した。GTP 結合型 Rap1B を共発現させると、より神経突起の伸長を促進した。RA-RhoGAP- Δ RA を発現させると、RA-RhoGAP wild type よりも強く神経突起の伸長を促進した。RhoGAP ドメインにある 399 番目のアルギニンをロイシンに置換した GAP 活性欠損変異体 RA-RhoGAP Δ RA-R399A は、神経の突起伸長を促進しなかった。これらの結果から、RA-RhoGAP は、RA ドメインによって調節されている GAP 活性に依存して神経突起の伸長を制御していることが明らかになった。

Rap1 依存的な神経突起伸長における RA-RhoGAP の関与

Rap1 による神経突起伸長において、RA-RhoGAP が Rap1 の標的タンパク質であるかをさらに確認するために、RNA 干渉法を用いて検討した。NG108 細胞の RA-RhoGAP をノックダウンすると、GTP 結合型 Rap1B による神経突起の伸長を抑制した。これらの結果から、RA-RhoGAP は Rap1 から Rho ヘシグナルを伝達し、神経突起伸長に関与していることが明らかとなった。

[総括]

Rap1 による神経突起の伸長には、Rho の不活性化が必要であることを見出した。また、その Rap1 と Rho を繋ぐ分子として Rap1 によって活性化される RA-RhoGAP を見出した。活性化された Rap1 は RA-RhoGAP に結合し、その RhoGAP 活性を活性化することにより、Rho を不活性化して神経突起の成長円錐におけるアクチン繊維の形成を阻害することにより神経突起の伸長を制御していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

神経細胞は、脳内において複雑なネットワークを形成しているが、その基本機能はシグナルを受け取りそれを統合して他の細胞へ伝えることである。この機能の遂行には軸索と樹状突起の形成が重要である。神経細胞における軸索と樹状突起の伸長には、低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーによる細胞骨格の再構築が重要であることが示唆されている。一方、Rap1 低分子量 G タンパク質が神経突起伸長に関与していることも報告されている。しかし、これら二つの低分子量 G タンパク質の関係については明らかにされていない。

本申請者は本研究において、Rap1 と Rho の関係を明らかにし、Rap1 と Rho を結びつける分子機構について解析した。その結果、Rap1 と Rho を繋ぐ RA-RhoGAP を同定し、活性化型 Rap1 によって RA-RhoGAP の GAP 活性を活性化することを見いだした。また、RA-RhoGAP が Rap1 から Rho ヘシグナルを伝達し、神経突起伸長に関与することを見いだした。

本研究は、神経突起伸長の分子メカニズムを解明する上で重要であり、実験結果自体の意義だけでなく、今後の研究への発展も期待できる。したがって、博士 (医学) の学位授与に値する。