

Title	グアニンヌクレチド交換因子RhoGEF10の性状解析
Author(s)	川原, 一郎
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47622
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	かわ 川 原 一 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 0 4 2 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 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学 位 論 文 名	グアニンヌクレオチド交換因子 RhoGEF10 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 西村 理行 助教授 新谷 誠康

論 文 内 容 の 要 旨

1. 研究背景と目的

学習や記憶などの複雑な脳機能を可能にしているのは、神経細胞が神経突起をのばし、お互いに接着することで形成される神経回路である。神経細胞は極性を持ち、1本の軸索と複数の樹状突起を伸長する。この特異な細胞形態が、高次な脳機能発現を可能にしている。そして、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。それらの一つとして同定されたセマフォリン分子は、膜型と分泌型の2種類存在し、神経反発因子作用や軸索伸長作用など、さまざまな生理機能を持つことが分かってきた。Sema4Dは膜型セマフォリン分子であり、その受容体として PlexinB1 が同定されている。また、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していることが報告された。Sema4D-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が必要である。

我々は、PlexinB1 のシグナル伝達機構を解析する為、Yeast-two-hybrid 法を用いて PlexinB1 の細胞内領域に対する結合蛋白質を検索したところ、Rho ファミリーのグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である RhoGEF10 が検出された。一般的に Rho ファミリーは、GEF により GTP 結合型となり活性化され、GAP により GTP 水解が促進され不活性型となる。Rho ファミリーの GEF は、大きく分けて2つのグループがあり、1つは DH-PH ドメインを持つもので、DH (Db1 homology) 領域にて GDP-GTP 交換反応を促進する。もう1つのグループは CDM ファミリーと呼ばれ、DH 領域を持たず、代わりに DHR2 領域を持つ。RhoGEF10 は、前者に属し、DH 領域を持つが PH 領域は持たない構造を呈している。RhoGEF10 は、精神発達遅延を伴うてんかんに関する原因染色体 8p23 に存在する遺伝子の一つとして報告された分子であり、また統計学的解析によって部分アミノ酸変異を持つ RhoGEF10 の個体では、末梢神経における髄鞘形成不全を引き起こす事が報告されている。

しかしながら、Sema4D-PlexinB1-RhoGEF10 のシグナル伝達系のメカニズムや RhoGEF10 の生理的作用については、不明な点が多い。本研究では、RhoGEF10 の性状解析を通して、Sema4D-PlexinB1-RhoGEF10 のシグナル伝達系の解析、および RhoGEF10 による末梢神経における髄鞘形成不全のメカニズムについての検討について行った。

2. 結果

(1)RhoGEF10DH 領域と PlexinB1 の in vitro における結合

現在までに、Yeast two hybrid 法により、RhoGEF10 が PlexinB1 の細胞内領域と相互作用する事が明らかになっている。さらに RhoGEF10 と PlexinB1 細胞内領域との結合を、アフィニティー結合実験により検討した。その結果、RhoGEF10 は、PlexinB1 細胞内領域中央部と結合することが明らかになった。

(2)RhoGEF10 の部分アミノ酸変異体による細胞形態の変化

RhoGEF10 の 332 番目スレオニンのイソロイシンへのアミノ酸変異導入し、RhoGEF10 部分アミノ酸変異体を作製した (RhoGEF10T332I)。RhoGEF10T332I を HEK293 細胞に過剰発現させると、細胞形態の円形化が認められた。

(3)細胞の円形化の意義

RhoGEF10T332I から DH 領域を欠損させると、円形化が認められなくなった。このことより、細胞の円形化は GEF 活性に関与している事が示唆された。また、RhoGEF10 wild type から N 末端を欠損させると、円形化が認められた事より、N 末端が DH 領域に対して抑制的に作用している事が示唆された。

(4)Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質に対する RhoGEF10 の GEF 活性

RhoGEF10 の Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質に対する GEF 活性を解析した結果、RhoGEF10 Δ Nにて GEF 活性 (RhoA) が認められた。この事は、「Sema4D-PlexinB1-RhoGEF10-Rho ファミリー」のシグナル伝達経路の存在を示すものである。

(5)RhoGEF10 の各 mutant における蛋白質発現

RhoGEF10 の各 deletion mutant を用いて、HEK293 細胞に導入し、ウェスタンブロット法にて蛋白質の発現を確認すると、C 末端を欠損させた mutant について蛋白質の発現の増加が認められた。このことは C 末端に、ユビキチン・プロテアソーム系が働いている可能性が考えられる。

3. まとめ

以上の結果より、PlexinB1-RhoGEF10-Rho ファミリーという新たなシグナル伝達系が存在する事が示唆された。また、RhoGEF10 は細胞の形態制御に関与し、さらには髄鞘形成不全まで引き起こす可能性が示唆された。今後、シェワン細胞を用いて、RhoGEF10 の発現や細胞形態について検討を加える必要がある。

論文審査の結果の要旨

本研究では、RhoGEF10 の機能解析を通して、Sema4D-PlexinB1-RhoGEF10-Rho ファミリー G 蛋白質のシグナル伝達系の解明を目的として検討を行った結果、PlexinB1-RhoGEF10-Rho ファミリー G 蛋白質という新たなシグナル伝達系が存在することや、RhoGEF10 が細胞の形態制御に関わっていることを明らかにした。これらの結果は、RhoGEF10 の異常により引き起こされる髄鞘形成不全や神経伝達異常のメカニズムの一端を示すものである。

この論文は、PlexinB1-RhoGEF10-Rho ファミリー G 蛋白質という新たなシグナル伝達系の発見という意味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。