

R-Ras による神経軸索形態制御の
分子メカニズムに関する研究

岩澤 成晃

目次

要旨	．．．．．	2
第1章 序論	．．．．．	3
第2章 結果	．．．．．	11
第3章 考察	．．．．．	27
第4章 結論	．．．．．	33
実験方法	．．．．．	34
参考文献	．．．．．	40
謝辞	．．．．．	48

要旨

神経組織の発達期において、神経細胞は遠く離れた標的細胞に向かって軸索を伸長させる。神経ネットワークを正しく構築するために、軸索の伸長、ガイダンス、分枝形成などの形態変化は細胞外の因子や神経細胞に備わるシグナル伝達機構により厳密に制御されている。近年、申請者の所属する研究室において、低分子量 G タンパク質の一つである R-Ras が軸索に局在しており、軸索の決定および成長の制御に重要な役割を担っていることがわかった。しかしながら、R-Ras の下流で軸索の形態制御に働く分子メカニズムの解明はまだ十分ではなく、特に神経細胞における R-Ras の直接のエフェクター分子は、PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 以外明らかとなっていない。また、軸索の形態制御には細胞骨格の再構築が重要であることがわかっているが、微小管骨格制御に関しては R-Ras は PI3K シグナル経路を介して CRMP-2 (colapsin response mediator protein-2) を活性化し、微小管骨格を制御していることがわかっている一方で、R-Ras とアクチン骨格制御との関係はよくわかっていない。

本研究では、まず、神経細胞における R-Ras のエフェクター分子を探索するため、ラット脳 cDNA ライブラリーを用いて酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、F-actin (filamentous-actin) 結合分子である afadin が R-Ras のエフェクター候補分子として得られた。次に R-Ras と afadin の結合実験を行い、R-Ras は活性型特異的に afadin の RA (Ras-association) ドメインと結合すること、および軸索成長期の神経細胞において R-Ras と afadin は結合していることがわかった。続いて、軸索の成長制御における afadin の機能を調べるため、afadin のロックダウンおよび過剰発現を行ったところ、ロックダウンにより軸索分枝が減少する一方、過剰発現により軸索分枝が増加することがわかった。また、RA ドメインを欠失した afadin の変異体の過剰発現では軸索分枝は増加しないこともわかった。さらに、afadin が R-Ras の下流で軸索の分枝形成を制御しているのか調べるため、活性型 R-Ras の過剰発現と afadin のロックダウンを同時に行ったところ、活性型 R-Ras による軸索分枝形成の増加が afadin のロックダウンによって有意に抑制された。次に、R-Ras による afadin の機能制御のメカニズムを調べる目的で、R-Ras が afadin の細胞内局在を制御しているのか検討したところ、活性型 R-Ras は afadin を細胞膜へリクルートする働きがあることがわかった。また、膜移行シグナルを付加した afadin の変異体を過剰発現させると軸索の成長が促進されることがわかった。さらに、Neuro2a 細胞に活性型 R-Ras と afadin を共発現させると各分子の単独発現よりも神経突起の成長が大きく促進されること、およびこの変化には afadin の RA ドメインが必要であることがわかった。次に afadin による軸索分枝形成の制御と F-actin の関係を調べたところ、afadin は軸索先端や分枝形成部位の成長円錐において F-actin と共局在していること、および afadin による分枝形成制御には afadin の F-actin 結合ドメインとアクチン骨格の動的変化が必要であることがわかった。

本研究により申請者は、活性型 R-Ras が afadin を細胞膜へ運び、運ばれた afadin がアクチン骨格の再構築を促すことで軸索分枝形成を制御するという新しい分子メカニズムを明らかにした。

第 1 章 序論

記憶、学習などの高度な脳機能には、複雑な神経ネットワークが正確に形成されることが必要である。このネットワークの構成単位である神経細胞は高度に分化した細胞であり、情報の出力を担う軸索と入力を担う樹状突起という 2 種類の神経突起を持つ。神経細胞は 1 本の軸索と複数本の樹状突起を伸ばし、標的細胞と接続することで情報のやり取りを行う。神経細胞の形態制御メカニズムを調べるためのモデル系として、海馬あるいは大脳皮質神経細胞の初代培養がよく用いられる (Bradke and Dotti, 2000)。初代培養神経細胞の成長に伴う形態変化は、主に 5 つのステージに分けられることがわかっている (Fig 1-1)。まず、神経細胞の辺縁部からラメリポディアが生じ (ステージ 1)、続いて複数の未分化な神経突起が進展する (ステージ 2)。しばらくするとそのうちの 1 本が急激に成長を始め軸索となる (ステージ 3)。その後、他の突起の進展が始まり、突起が分枝化して樹状突起が形成される (ステージ 4)。この樹状突起はさらに複雑に分枝化して成熟した神経細胞となり、他の神経細胞の軸索とシナプスを形成して神経ネットワークを構築する (ステージ 5)。

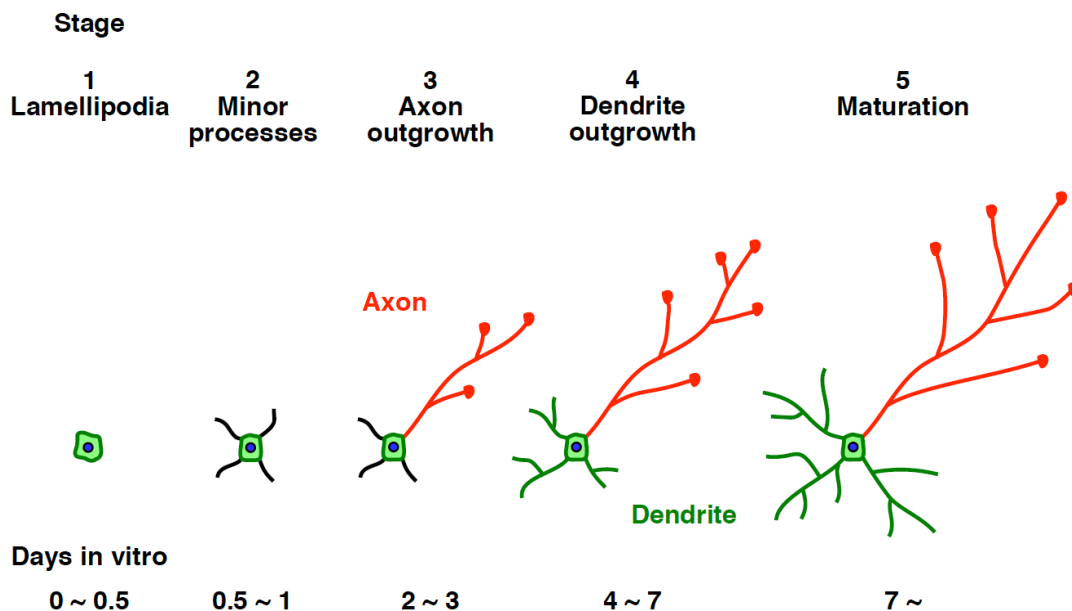


Fig 1-1 初代培養神経細胞の成長過程

神経組織の発達期において、神経細胞は遠く離れた標的細胞に向かって軸索を伸長させる。神経ネットワークを正しく構築するために、軸索の伸長、ガイダンス、分枝形成などの形態変化は細胞外の因子や神経細胞に備わるシグナル伝達機構により厳密に制御されている (O'Donnell et al., 2009; Bilimoria and Bonni, 2013)。これまでの研究により、Ras スーパーファミリー低分子量 G タンパク質 (Ras スーパーファミリー) が軸索の形態制御において重要な役割を担っていることが明らかとなってきた (Hall and Lalli, 2010)。

Ras スーパーファミリーは細胞の増殖や分化、運動、脂質小胞の輸送など、さまざまな細胞機能の調節に関与する分子である。Ras スーパーファミリーには GTP 結合型の活性状態と GDP 結合型の不活性状態が存在し、この2つの構造を往復することで細胞内シグナル伝達における分子スイッチとして機能しており、活性化されるとその特異的なエフェクター分子と結合することで、シグナルをさらに下流へと伝えることができる (Bishop and Hall, 2000)。Ras スーパーファミリーは活性化に働く分子および不活性化に働く分子により、双方向に活性が調節されている。活性化に働く分子である GEF (guanine nucleotide exchange factor) は、GDP の解離とそれに続く細胞質からの GTP の取り込みを促進し、Ras スーパーファミリーを活性化する。一方、不活性化に働く分子として、Ras スーパーファミリーの内在性の GTPase 活性を上昇させる GAP (GTPase-activating protein)、GDP 結合型から GTP 結合型への交換反応を抑制する GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) がある。このような活性制御因子により Ras スーパーファミリーの機能は細胞内で時間的・空間的に厳密に制御されている (Fig 1-2)。

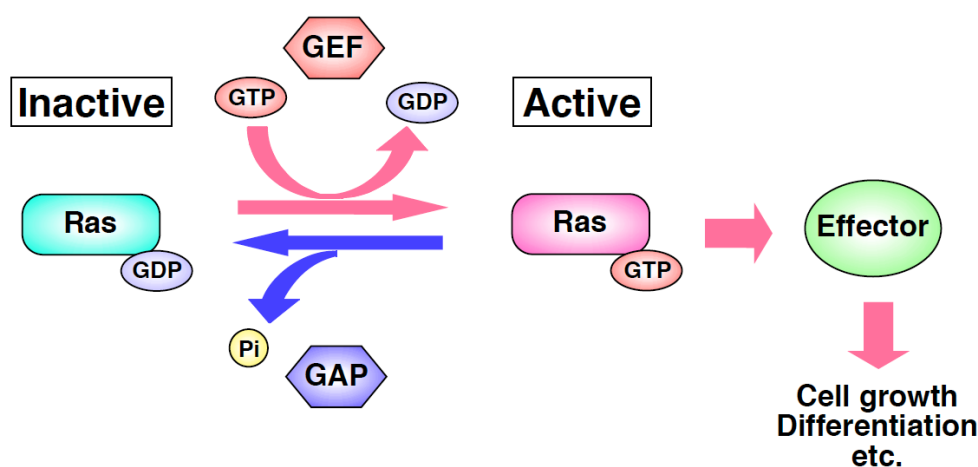


Fig 1-2 Ras スーパーファミリーの機能調節機構

Ras スーパーファミリーは構造および機能面から主に Ras、Rho、Ran、Rab、Arf の 5 種のファミリーに大別される。各ファミリーの代表的な機能として、Ras ファミリーは細胞増殖の制御 (Feramisco et al., 1984)、Rho ファミリーは細胞骨格の制御 (Hall, 1998)、Ran ファミリーは核-細胞質間輸送の制御 (Moore et al., 1994)、Rab および Arf ファミリーは小胞輸送の制御 (D'Souza-Schorey et al., 1995; Stenmark and Olkkonen, 2001) があげられる。このうち、Ras ファミリーにはさらに classical Ras (p21 Ras)、R-Ras、Rap、Ral などのサブファミリーが存在することが知られている (Reuther and Der, 2000)。Ras ファミリーは classical Ras に属する H-Ras、K-Ras、N-Ras の 3 分子について最も研究が進んでおり、その下流には複数のシグナル経路が存在することがわかっている (Kinbara et al., 2003; Schubbert et al., 2007) (Fig 1-3)。一つは MAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路であり、Ras は Raf と結合して活性化し、MEK、ERK を順次活性化することで細胞の増殖や分化などを制御している。二つ目は PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 経路であり、Ras は PI3K を活性化することで AKT などの下流分子を活性化し、細胞の生存や極性形成などを制御している (Suire et al., 2002; Arimura

Fig 1-3 Ras ファミリーの下流シグナル経路

and Kaibuchi, 2007)。三つ目は RalGDS/Ral 経路であり、Ras は RalGDS を介して Ral を活性化し、細胞膜の輸送などを制御している (Hofer et al., 1994; Goi et al., 1999)。その他に、Rac1 を介した細胞骨格の制御や、NORE1 を介したアポトーシスの制御などのシグナル経路および機能が知られている (Khokhlatchev et al., 2002; Yamauchi et al., 2005)。

神経細胞の形態制御における Ras スーパーファミリーの機能については、Rho ファミリー、特に Rac1、Cdc42、RhoA に関して最も研究が進んでいる。神経突起において、Rac1 と Cdc42 はアクチンの重合を促進して突起伸長を促し、RhoA はストレスファイバーの形成を介して突起退縮を引き起こすことが知られている (Dickson, 2001)。また、Ras ファミリーについても神経突起の制御に関与することがわかっているが (Hall and Lalli, 2010)、中でも近年 R-Ras サブファミリーの分子が重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。

R-Ras サブファミリーは比較的高い相同性を持つ R-Ras、TC21 (R-Ras2)、M-Ras (R-Ras3) の 3 分子で構成され、classical Ras とは異なるグループを形成している (Matsumoto et al., 1997) (Fig 1-4)。R-Ras サブファミリーの分子は高い相同性を持つにも関わらず、異なる機能を持つ。例えば、R-Ras は PI3K シグナル経路を活性化するが ERK シグナル経路を活性化する機能はなく、integrin の活性化、細胞運動、血管新生などを制御していることがわかっている (Zhang et al., 1996; Keely et al., 1999; Komatsu and Ruoslahti, 2005)。一方で、M-Ras は B-Raf の活性化を介して ERK シグナル経路を活性化し、PC12 細胞の神経突起伸長を促進することがわかっている (Kimmelman et al., 2002)。神経細胞においては、R-Ras は軸索の形態制御に関与しているのに対し、M-Ras は樹状突起の形態制御に関与していることが明らかとなっている (Ivins et al., 2000; Saito et al., 2009; Tasaka et al., 2012)。

R-Ras は軸索の決定および軸索の成長が起こるステージ 2 とステージ 3 の間で強く活性化され、後に軸索となる 1 本の神経突起に集積し、PI3K シグナル経路を介して軸索の決定を制御していることがわかっている (Oinuma et al., 2007)。また、反発性軸索ガイダンス因子 semaphorin-4D は、その受容体である plexin-B1 を介して R-Ras を不活性化し、軸索先端の成長円錐を崩壊させ、軸索の退縮を引き起こすことが明らかとなっている (Oinuma et al., 2004a)。その後、他の plexin

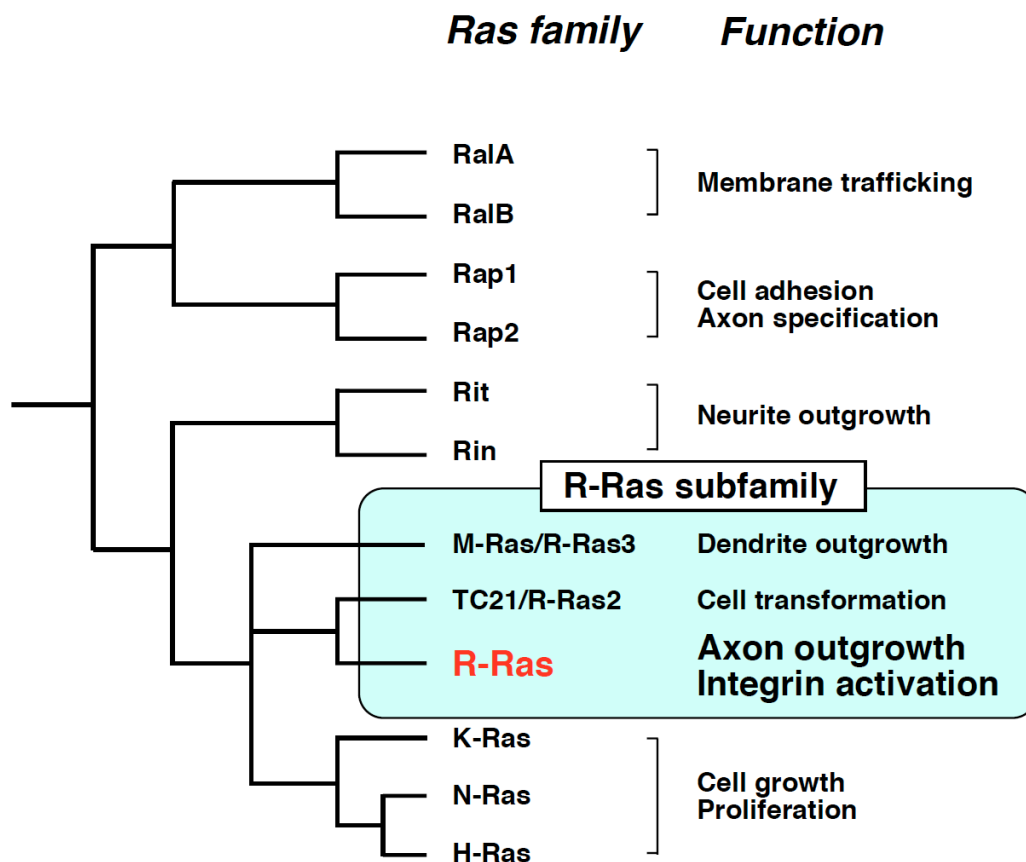


Fig 1-4 Ras ファミリーの樹形図

R-Ras サブファミリーは R-Ras、TC21 (R-Ras2)、および M-Ras (R-Ras3) で構成される。

ファミリー分子においても R-Ras GAP 活性が証明され、R-Ras を介するシグナル伝達が plexin ファミリーにおいて普遍的なものであることが明らかとなっている (Toyofuku et al., 2005; Uesugi et al., 2009)。また、大脳皮質神経細胞において semaphorin-3A は軸索の分枝形成を抑制することがわかっており、R-Ras が軸索の決定および伸長だけでなく、分枝化も制御している可能性が示唆されている (Dent et al., 2004)。このように軸索の形態制御において R-Ras が重要な役割を担っていることが明らかとなってきたが、R-Ras による軸索形態制御の分子メカニズムはごく一部しか解明されていない (Fig 1-5)。特に、直接のエフェクター分子に関しては、非神経細胞においては PI3K 以外に近年 RLIP76 および filamin A が同定されたが (Goldfinger et al., 2006; Gawecka et al., 2010)、神経細胞においては今のところ PI3K 以外明らかとなっていない。また、軸索の形態制御には細胞骨格の再構築が重要であることがわかっているが、微小管骨格制御に関して

は R-Ras は PI3K シグナル経路を介して CRMP-2 (colapsin response mediator protein-2) を活性化し、微小管骨格を制御していることがわかっている一方で (Ito et al., 2006)、R-Ras とアクチン骨格制御との関係はよくわかっていない。

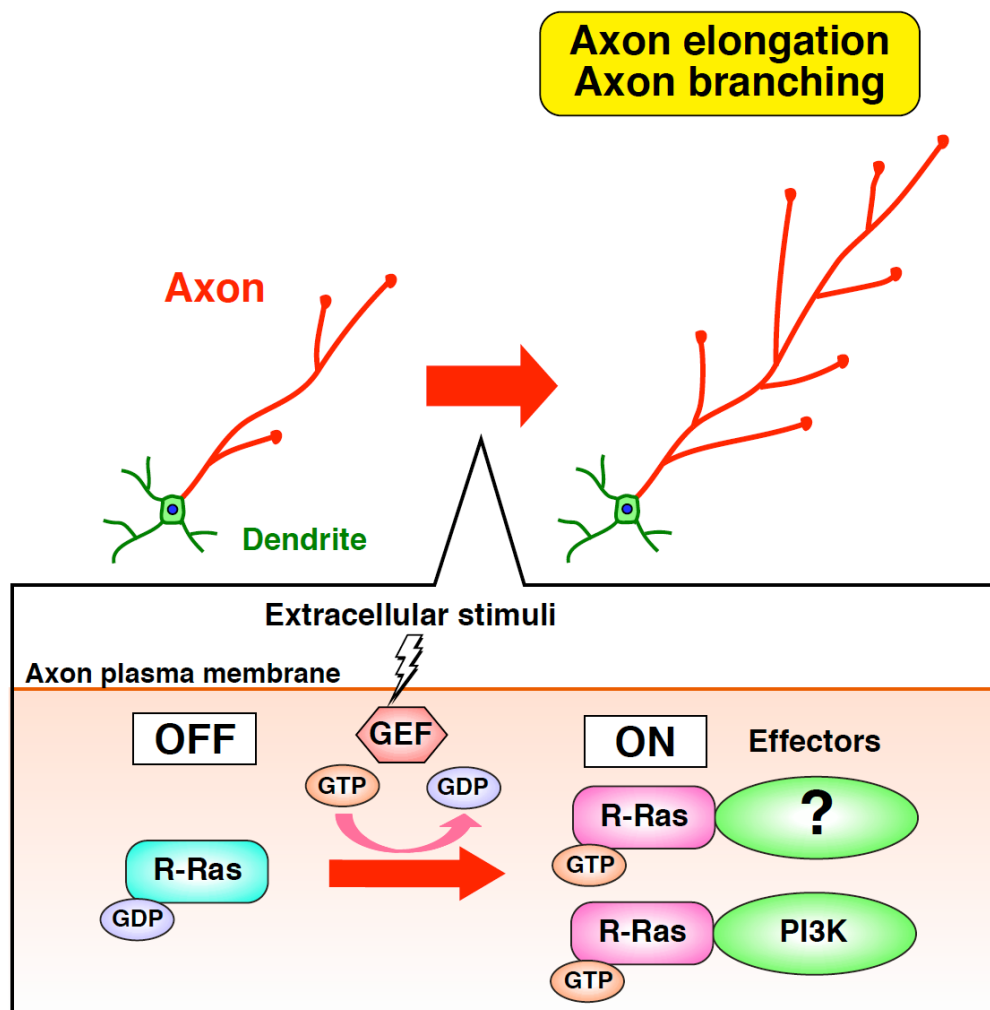


Fig 1-5 R-Ras による軸索形態制御機構のモデル図

軸索において、R-Ras は何らかの細胞外刺激因子および GEF により活性化され、PI3K および未知のエフェクター分子を介して軸索の伸長、分枝形成などを制御していると考えられている。

Afadin (AF-6, canoe, または MLLT4) は RA (Ras-association) ドメイン、PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) ドメインなど、多数のドメイン構造を持つアダプタータン

パク質である (Takai et al., 2008) (Fig 1-6)。Afadin は細胞-細胞間接着部位において F-actin (filamentous-actin) と結合する分子として同定された (Mandai et al., 1997)。上皮細胞において、afadin は細胞接着分子である nectin と結合し、nectin とアクチン骨格のリンカーとして働くことで、細胞-細胞間接着の形成に関与していることがわかっている (Takahashi et al., 1999; Kurita et al., 2011)。Nectin 以外にも、afadin は細胞-細胞間接着の形成および安定化に働く様々な分子と結合することが知られている (Tachibana et al., 2000; Pokutta et al., 2002; Asada et al., 2003)。最近の研究により、afadin は線維芽細胞および乳がん細胞において細胞運動を制御していることもわかっている (Miyata et al., 2009; Fournier et al., 2011)。神経細胞では、afadin は樹状突起スパインの形態を制御していることが in vitro および in vivo の実験系で明らかとなっている (Xie et al., 2005; Beaudoin et al., 2012)。Afadin は樹状突起だけでなく軸索にも局在していることがわかっているが (Lim et al., 2008)、軸索の形態制御における機能はわかっていない。Afadin はアミノ末端領域に 2 つの RA ドメインを持つ。RA ドメインは Raf-1 や PI3K

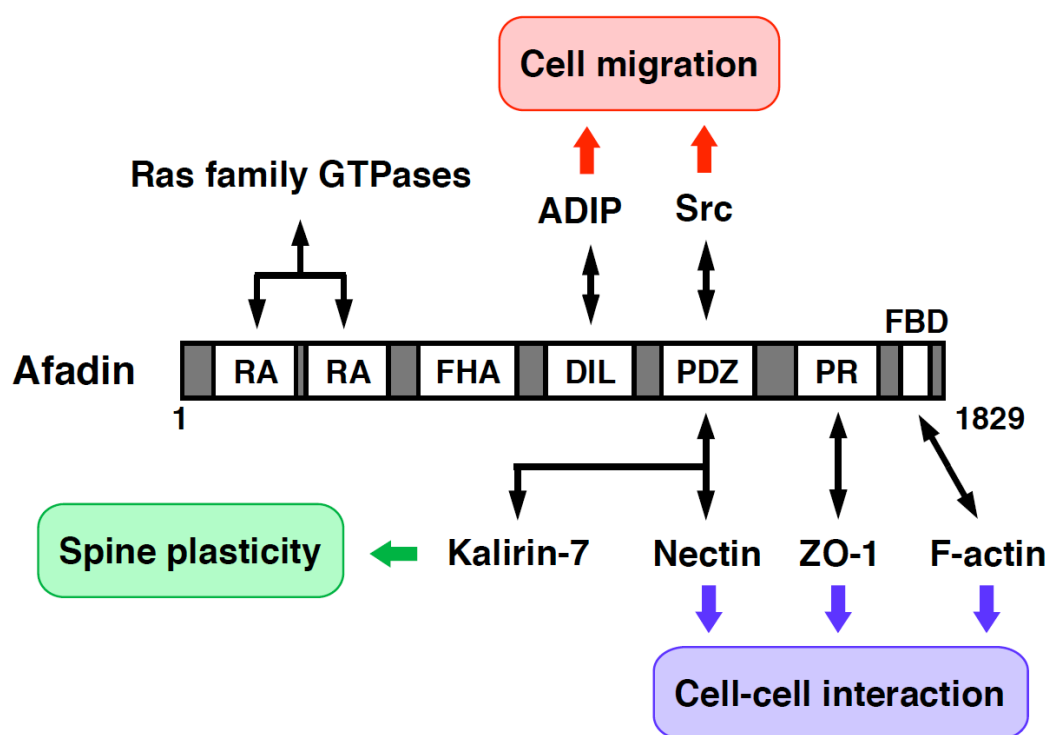


Fig 1-6 Afadin の構造、結合分子、および機能

Afadin のドメイン構造と結合分子、および制御する細胞機能の例を示す (DIL; dilute domain, FBD; F-actin-binding domain, FHA; forkhead-associated domain, PR; proline-rich region, RA; Ras-association domain)。図中の数字はアミノ酸配列を示す。

などの多くの Ras エフェクター分子に見られ、Ras ファミリーが afadin の上流制御分子として機能することも示唆されている (Rodriguez-Viciano et al., 2004)。実際、Ras ファミリーに属する Rap1 は afadin に結合し、その機能を制御することで細胞運動におけるリーディングエッジの形成や樹状突起スパインの可塑性、神経上皮細胞の頂底軸極性形成を制御していることがわかっている (Xie et al., 2005; Miyata et al., 2009; Carmena et al., 2011)。しかしながら、軸索の形態制御における Ras ファミリーと afadin の関係はよくわかっていない。

本研究では、大脳皮質および海馬神経細胞において afadin は R-Ras のエフェクター分子として機能し、R-Ras の下流で軸索の分枝形成を制御していることを明らかにした。

第 2 章 結果

活性型 R-Ras は afadin の RA ドメインと結合する

本研究では、まず神経細胞における R-Ras のエフェクター候補分子を探索するため、ラット cDNA ライブラリーを用いて、酵母ツーハイブリッド法による R-Ras 結合分子のスクリーニングを行った。その結果、いくつかの陽性クローンが得られ、その中に、2つの RA ドメインを持つアダプタータンパク質である afadin のアミノ末端領域を発現するクローンを見出した (Fig 2-1 A)。そこで、R-Ras が全長の afadin と結合するのか、結合するならばそれは R-Ras の活性状態に依存するのか調べるため、HEK293T 細胞に GFP (green fluorescent protein) タグを付加した afadin FL (full length) を発現させ、GDP- β S あるいは GTP- γ S を結合させた GST (glutathione S-transferase) 融合 R-Ras を用いてプルダウンアッセイを行った。その結果、GTP- γ S を結合させた活性型 R-Ras は afadin との結合が見られたが、GDP- β S を結合させた不活性型 R-Ras では afadin との結合は見られなかった (Fig 2-1 B)。このことから、R-Ras は活性型特異的に afadin と結合することがわかった。

次に、細胞内で活性型 R-Ras と afadin が結合するのか調べるため、免疫沈降実験を行った。HEK293T 細胞に Myc タグを付加した R-Ras QL (常時活性型変異体) と GFP タグを付加した afadin FL を発現させ、anti-Myc 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、afadin は R-Ras QL と共沈降されることがわかった (Fig 2-1 C)。このことから、ほ乳類細胞の細胞内においても活性型 R-Ras は afadin と結合することがわかった。

続いて、afadin の R-Ras 結合領域を明らかにするため、HEK293T 細胞に GFP タグを付加した afadin FL あるいは afadin Δ RA (アミノ末端領域の2つの RA ドメインを欠失した変異体) (Fig 2-1 A) を発現させ、GTP- γ S を結合させた GST 融合 R-Ras を用いてプルダウンアッセイを行った。その結果、活性型 R-Ras は afadin FL とは結合したが、afadin Δ RA とは結合しなかった (Fig 2-1 D)。このことから、R-Ras は RA ドメインを介して afadin と結合することがわかった。以上の結果から、R-Ras は活性型特異的に、RA ドメインを介して afadin と結合することがわかった。

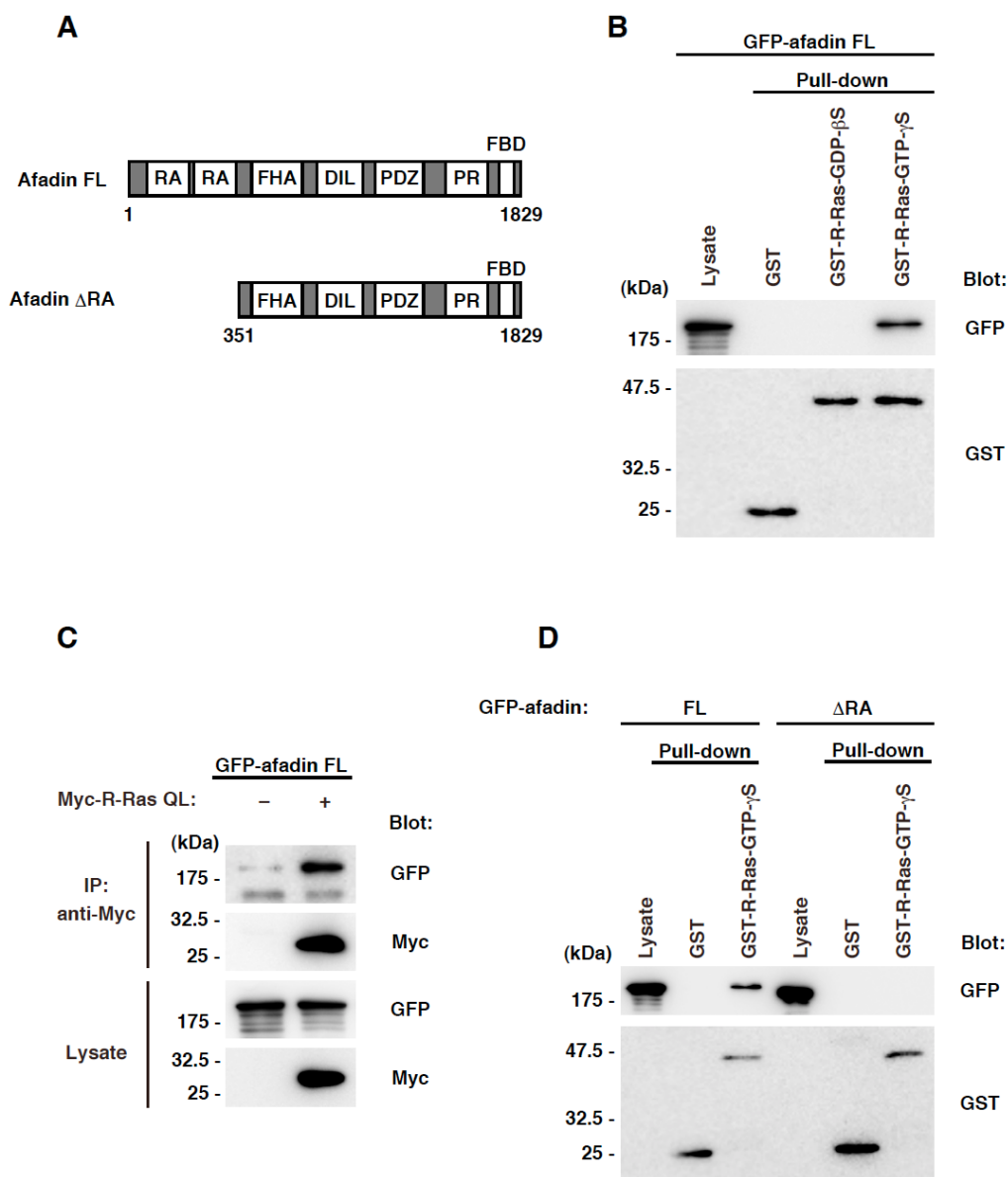


Fig 2-1 活性型 R-Ras は afadin の RA ドメインと結合する

(A) 今回の実験で用いた afadin のコンストラクトの模式図を示す (DIL; dilute domain, FBD; F-actin-binding domain, FHA; forkhead-associated domain, PR; proline-rich region, RA; Ras-association domain)。図中の数字はアミノ酸配列を示す。(B) GFP タグを付加した afadin FL を発現させた HEK293T 細胞のライセートと GST、および GDP- β S あるいは GTP- γ S を結合させた GST 融合 R-Ras を用いてプルダウンアッセイを行った。(C) GFP タグを付加した afadin FL と Myc タグを付加した R-Ras QL を発現させた HEK293T 細胞のライセートと anti-Myc 抗体を用いて免疫沈降を行った。(D) GFP タグを付加した afadin FL あるいは afadin Δ RA を発現させた HEK293T 細胞のライセートと GST、および GTP- γ S を結合させた GST 融合 R-Ras を用いてプルダウンアッセイを行った。

軸索成長期の大脳皮質神経細胞において、R-Ras は afadin と結合する

成長初期の神経細胞において、R-Ras は軸索に局在し、軸索の成長を制御していることが明らかとなっている (Oinuma et al., 2007)。そこで、R-Ras による軸索の成長制御に afadin が関与しているのか検討するために、まず afadin が成長初期の神経細胞に発現しているのか調べた。ラットの大脳皮質および海馬の初代培養神経細胞を用いて、イムノブロット法により afadin の発現量を解析した結果、afadin は軸索成長期である 0-3 DIV (days in vitro) において比較的強く発現しており、樹状突起の成長が盛んに起こる 4 DIV 以降は発現が減少することがわかった (Fig 2-2 A)。この結果から、afadin が軸索の成長制御に関与していることが示唆された。

次に、軸索成長の経時的変化をより詳しく調べるため、3 DIV (成長初期) と 6 DIV (成長中期) の大脳皮質神経細胞の軸索の形態を比較した。その結果、0-3 DIV の神経細胞は軸索の伸長よりも分枝形成が活性化されている一方、3-6 DIV の神経細胞は軸索の伸長の方が活性化されていることがわかった (Fig 2-2 B, C)。以上の結果から、afadin の発現時期は軸索の分枝形成が活発に行われている時期と重なっていることがわかった。

続いて、成長初期の神経細胞において内在性の R-Ras と afadin が結合しているのか調べるため、免疫沈降実験を行った。2 DIV の大脳皮質神経細胞を用いて anti-R-Ras 抗血清による免疫沈降を行った結果、afadin が R-Ras と共沈降されることがわかった (Fig 2-2 D)。以上の結果から、R-Ras は軸索成長期の神経細胞において afadin と結合し、軸索の分枝形成を制御している可能性が示唆された。

Afadin のノックダウンにより、軸索の分枝形成が抑制される

次に、軸索の成長制御における afadin の機能を調べるため、shRNA (short hairpin RNA) 発現ベクターを用いたノックダウン実験を行った。まず、2つの異なる領域を標的とする shRNA を作製し、大脳皮質神経細胞を用いて効果を確認した (Fig 2-3 A)。続いて、大脳皮質神経細胞に YFP (yellow fluorescent protein) とこれらの shRNA を培養開始前にトランスフェクションし、3 DIV に固定して軸索の形態を解析した (Fig 2-3 B)。その結果、shRNA による afadin のノックダウンにより、軸索の長さは変化しないが、軸索分枝が減少することがわかった (Fig 2-3 C, D)。以上の結果から、afadin は軸索の伸長ではなく分枝形成を制御していることが示唆された。

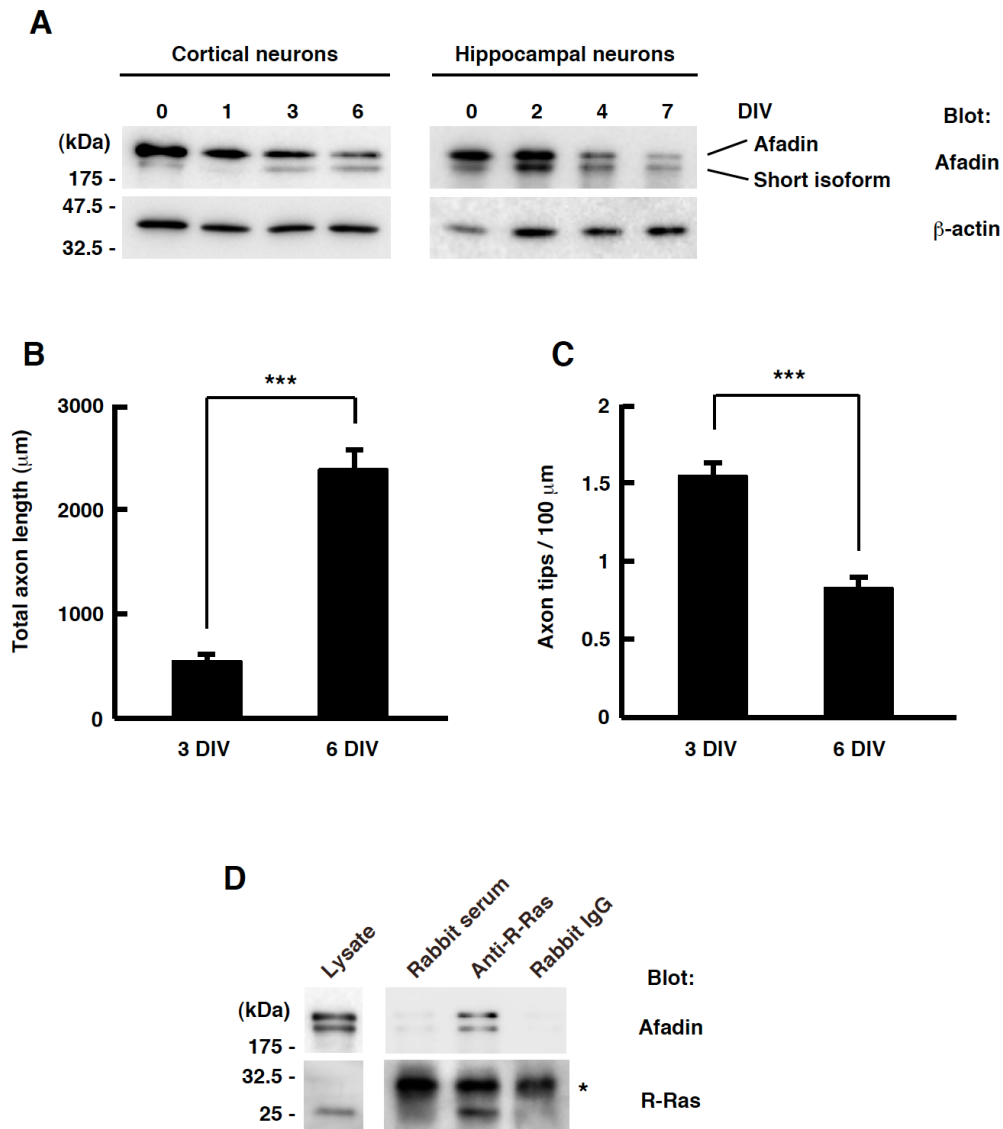


Fig 2-2 軸索成長期の神経細胞において、R-Ras と afadin は結合している

(A) 大脳皮質（左）あるいは海馬（右）の初代培養神経細胞を記述した培養日数でライセート化し、イムノブロット法で検出した。Afadin に関しては、分子量の大きいアイソフォーム (afadin) と分子量の小さいアイソフォーム (short isoform) が検出されている。(B,C) 大脳皮質神経細胞を 3 DIV あるいは 6 DIV で固定し、軸索の総長 (B) および軸索 100 μ m あたりの軸索末端数 (軸索分枝形成の指標) (C) を定量した。3 回の独立した実験結果の平均値をグラフに示す。エラーバーは標準誤差を示す。(n=45; ***p < 0.001, Student t-test)

(D) 大脳皮質神経細胞を 2 DIV にライセート化し、ラビット anti-R-Ras 抗血清を用いて免疫沈降を行った。非免疫ラビット血清およびラビット IgG をコントロールとして用いた。アスタリスクは immunoglobulin の軽鎖を示す。

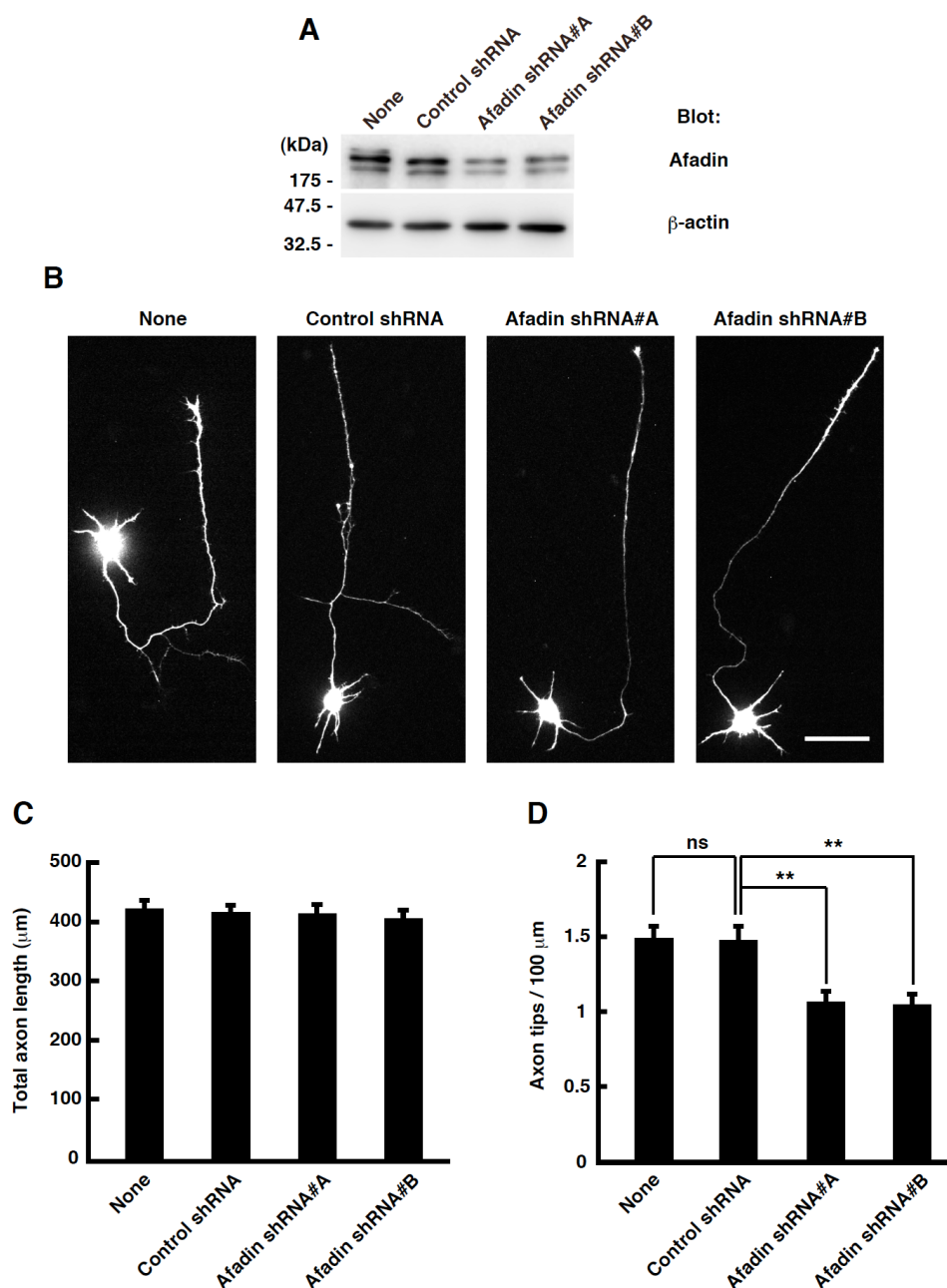


Fig 2-3 Afadin のノックダウンは軸索の分枝形成を抑制する

(A) 培養開始前的大脑皮質神経細胞に YFP と記述した shRNA をトランスフェクションし、3 DIV にライセート化してイムノブロット法で検出した。(B) 培養開始前的大脑皮質神経細胞に YFP と記述した shRNA をトランスフェクションし、3 DIV に固定した。YFP の蛍光写真を示す。スケールバーは 50 μm。(C, D) 軸索の総長 (C) および軸索 100 μm あたりの軸索末端数 (軸索分枝形成の指標) (D) を定量した。3 回の独立した実験結果の平均値をグラフに示す。エラーバーは標準誤差を示す。(n=60; ns, not significant; **p < 0.01, one-way ANOVA[analysis of variance], Dunnett T3 post hoc test)

Afadin による軸索分枝形成の制御には RA ドメインが必要である

Afadin が軸索の分枝形成を制御していることを確かめると共に、その制御に RA ドメインが必要かどうか検討するため、afadin FL および afadin Δ RA の過剰発現による軸索の形態変化を調べた。1 DIV の大脳皮質神経細胞に、YFP と Myc タグを付加した afadin FL あるいは afadin Δ RA をトランスフェクションし、3 DIV に固定して軸索の形態を解析した (Fig 2-4 A)。その結果、afadin FL の過剰発現により、軸索の長さは変化しないが、軸索分枝が増加することがわかった。一方で、afadin Δ RA の過剰発現により、軸索の長さは変化せずに軸索分枝が減少することがわかった (Fig 2-4 B, C)。以上の結果から、afadin による軸索分枝形成の制御には、アミノ末端領域の RA ドメインが必要であることが示唆された。

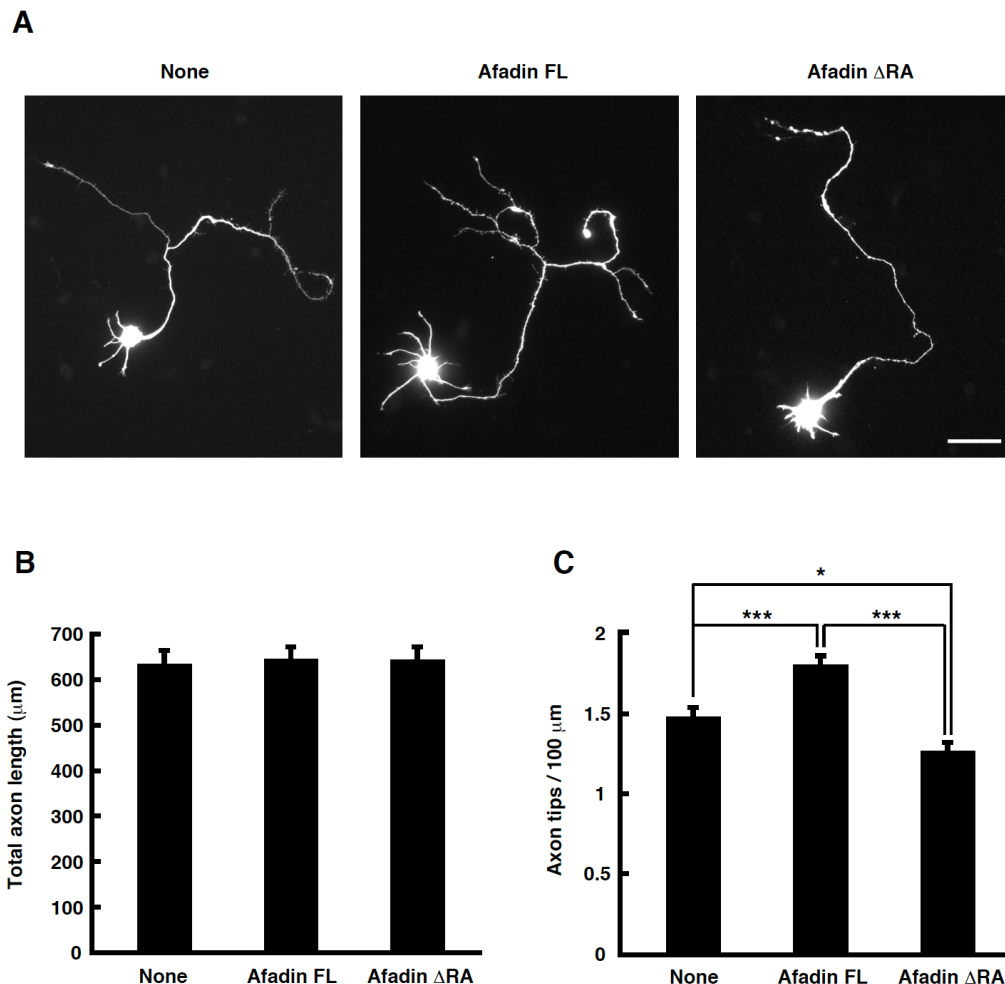


Fig 2-4 Afadin による軸索分枝形成の制御には RA ドメインが必要である

(A) 大脳皮質神経細胞 (1 DIV) に YFP と Myc タグを付加した afadin FL あるいは afadin

Δ RA をトランスフェクションし、3 DIV に固定した。YFP の蛍光写真を示す。スケールバーは 50 μ m。 (B, C) 軸索の総長 (B) および軸索 100 μ m あたりの軸索末端数 (軸索分枝形成の指標) (C) を定量した。3 回の独立した実験結果の平均値をグラフに示す。エラーバーは標準誤差を示す。 (n=60; *p < 0.05; ***p < 0.001, one-way ANOVA, Dunnett T3 post hoc test)

活性型 R-Ras は afadin を介して軸索の分枝形成を促進する

次に、afadin が R-Ras の下流で軸索の分枝形成を制御しているのか検討した。大脳皮質神経細胞に YFP、Myc タグを付加した R-Ras QL、および afadin 特異的な shRNA を培養開始前にトランスフェクションし、3 DIV に固定して軸索の形態を解析した (Fig 2-5 A)。その結果、R-Ras QL の過剰発現により軸索の長さおよび軸索分枝が増加し、afadin のノックダウンにより R-Ras QL による軸索分枝の増加が抑制された。一方で、afadin のノックダウンは R-Ras QL による軸索の伸長には影響を与えなかった (Fig 2-5 B, C)。大脳皮質神経細胞の代わりに海馬神経細胞を用いた実験においても同様の結果が得られた (Fig 2-5 D, E)。以上の結果から、大脳皮質および海馬神経細胞において、afadin は R-Ras の下流で軸索の伸長ではなく、分枝形成を制御していることが示唆された。

R-Ras は afadin を細胞膜へリクルートする

以前の報告により、afadin による線維芽細胞の運動性の制御や神経細胞の樹状突起スパインの形態制御には、afadin の細胞内局在の制御が重要であることが明らかとなっている (Xie et al., 2005; Miyata et al., 2009)。そこで、R-Ras が afadin の細胞内局在を制御しているのか、免疫細胞染色法を用いて調べた。マウス神経芽細胞腫由来の細胞株である Neuro2a 細胞に GFP タグを付加した afadin のコンストラクトと HA (hemagglutinin) タグを付加した R-Ras QL を発現させ、各タンパク質の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察した。R-Ras QL と afadin のコンストラクトを独立に発現させた場合では、R-Ras QL は細胞の周辺部に局在しており (Fig 2-6 B)、afadin FL および afadin Δ RA は主に細胞質に局在していることがわかった (Fig 2-6 C, E)。一方で、R-Ras QL と afadin のコンストラクトを共発現させた場合では、afadin FL は細胞の周辺部へ局在が変化した (Fig 2-6 D)。このような変化は GFP および afadin Δ RA では見られなかった (Fig 2-6 B, F)。

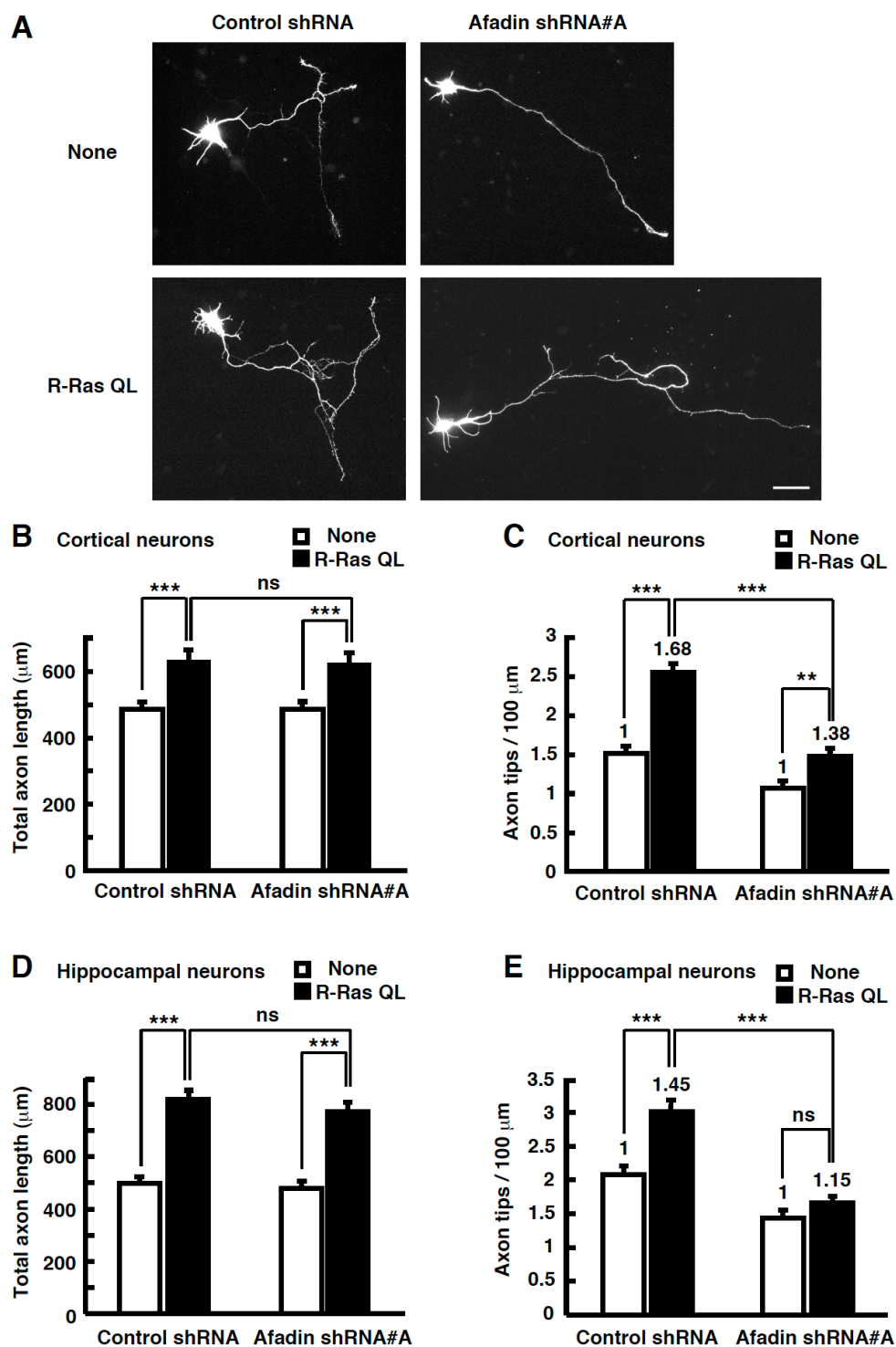


Fig 2-5 Afadin のノックダウンは活性型 R-Ras による軸索の分枝形成を抑制する

(A) 培養開始前的大脑皮質神経細胞に YFP と記述した shRNA、および Myc タグを付加した R-Ras QL をトランスフェクションし、3 DIV に固定した。YFP の蛍光写真を示す。スケールバーは 50 μm 。(B, C) 軸索の総長 (B) および軸索 100 μm あたりの軸索末端数 (軸索

分枝形成の指標) (C) を定量した。(D, E) 海馬神経細胞を用いて A と同様の実験を行い、軸索の総長 (D) および軸索 100 μm あたりの軸索末端数 (軸索分枝形成の指標) (E) を定量した。3 回の独立した実験結果の平均値をグラフに示す。エラーバーは標準誤差を示す。
($n=60$; ns, not significant; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$, one-way ANOVA, Dunnett T3 post hoc test)
カラム上の数値は、R-Ras QL の過剰発現による軸索分枝形成の相対的な増加率を示す。

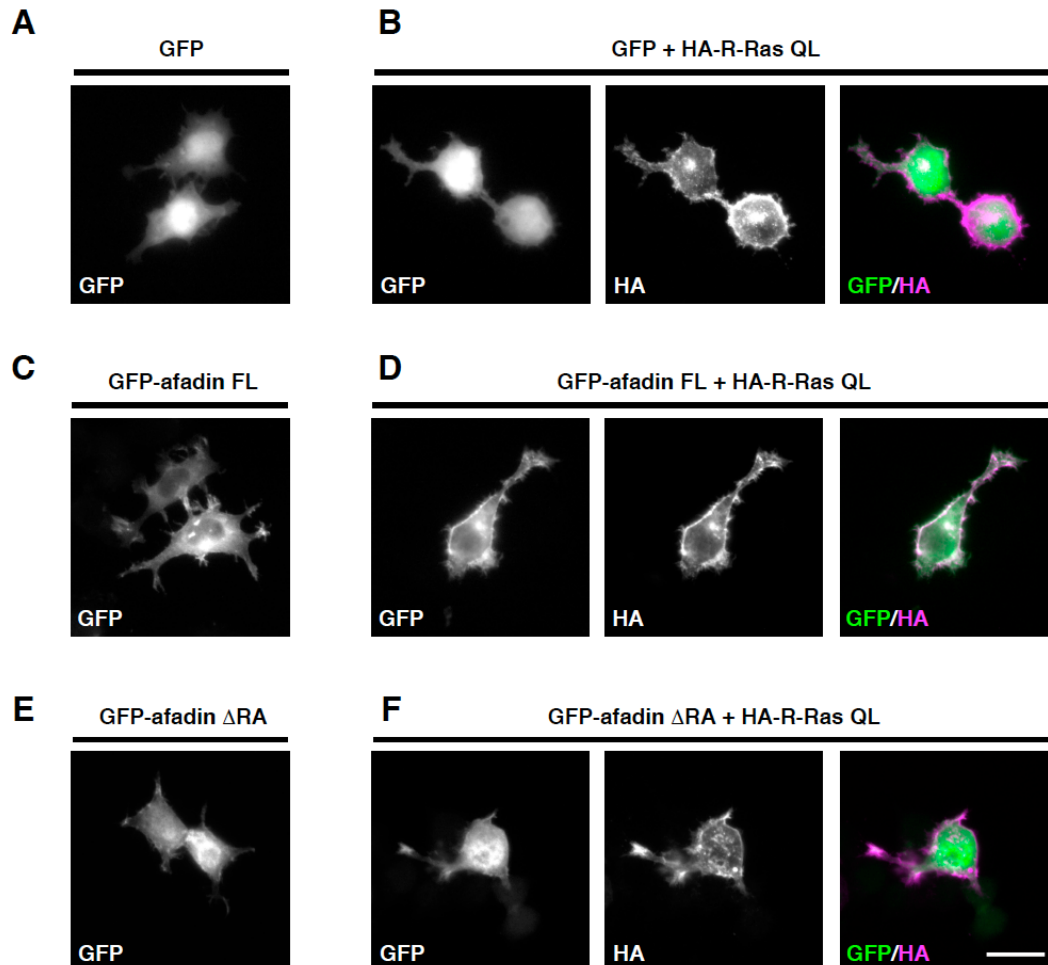


Fig 2-6 活性型 R-Ras は afadin FL を細胞膜ヘリクルートする

Neuro2a 細胞に GFP (A)、GFP および HA-R-Ras QL (B)、GFP-afadin FL (C)、GFP-afadin FL および HA-R-Ras QL (D)、GFP-afadin ΔRA (E)、GFP-afadin ΔRA および HA-R-Ras QL (F) をトランスフェクションし、1 日後に固定した。GFP の蛍光写真 (A-F, green in merge) および anti-HA 抗体による免疫細胞染色写真 (B, D, F, magenta in merge) を示す。スケールバーは 25 μm 。

R-Ras による afadin の細胞内局在の変化をさらに確かめるため、細胞分画法による生化学的な解析を行った。GFP タグを付加した afadin のコンストラクトと HA タグを付加した R-Ras QL を発現させた Neuro2a 細胞を用いて細胞分画を行い、細胞質画分と膜画分を調整し、イムノブロット法を用いて解析した。その結果、免疫細胞染色の結果と同様に、R-Ras QL が共発現していない場合では、afadin FL および afadin Δ RA は主に細胞質に局在しており、R-Ras QL を共発現させると afadin FL のみ一部が膜画分へ移行することがわかった (Fig 2-7)。以上の結果から、R-Ras は RA ドメインを介して afadin と結合することで、afadin を細胞膜にリクルートすることが示唆された。

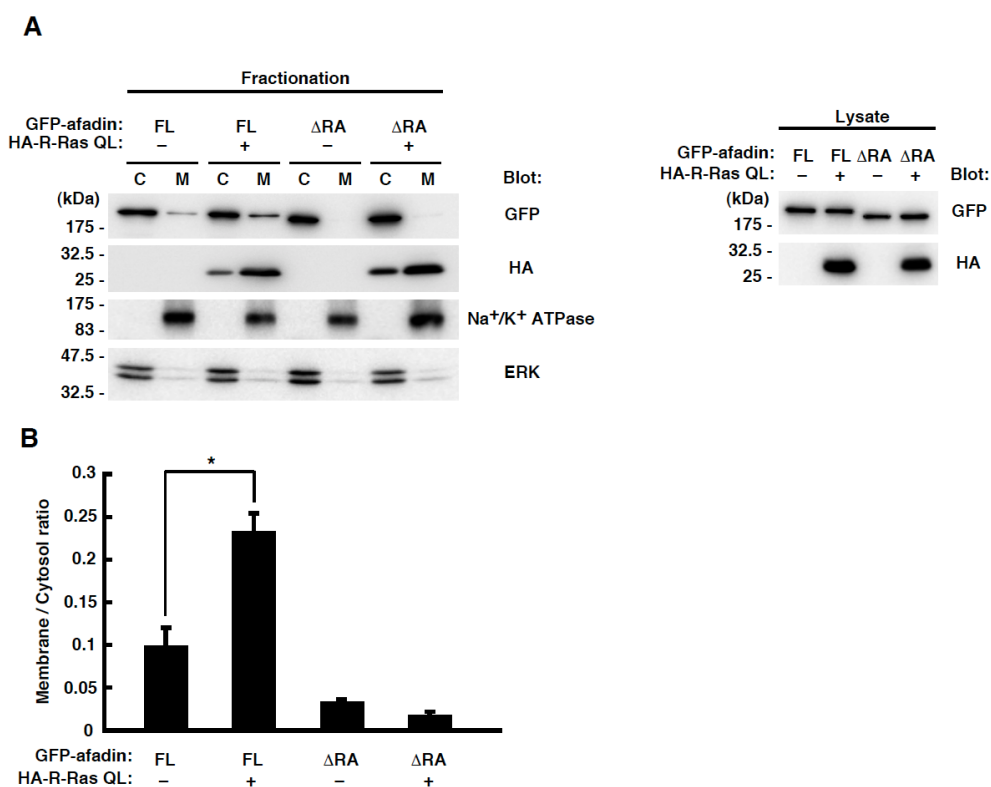


Fig 2-7 Afadin は RA ドメイン依存的に活性型 R-Ras によって膜へ移行する

(A) GFP タグを付加した afadin FL あるいは afadin Δ RA と HA タグを付加した R-Ras QL を発現させた Neuro2a 細胞を用いて細胞分画を行い、細胞質画分 (C) および膜画分 (M) をイムノブロット法で解析した。Na⁺/K⁺-ATPase および ERK はそれぞれ膜画分および細胞質画分のマーカーとして用いた。各コンストラクトの発現レベルは細胞ライセートを用いてイムノブロット法で確認した (右)。(B) GFP タグを付加した afadin の膜画分/細胞質画分比を定量した。3 回の独立した実験結果の平均値をグラフに示す。エラーバーは標準誤差を示す。(*p < 0.05, one-way ANOVA, Dunnett T3 post hoc test)

Afadin は膜へ移行することで軸索の形態を制御する

次に、afadin の膜への移行と afadin による軸索分枝形成の制御との関係を調べた。まず、強制的に afadin を膜へ局在化させるため、afadin FL および afadin Δ RA のカルボキシル末端に K-Ras の CAAX モチーフを付加した変異体 (afadin FL-CAAX および afadin Δ RA-CAAX) を作製した (Fig 2-8 A)。これらのコンストラクトの局在を確認するため、細胞分画法による解析を行った。Myc タグを付加した afadin のコンストラクトを発現させた Neuro2a 細胞を用いて細胞分画を行い、イムノブロット法を用いて解析した結果、CAAX モチーフの付加により afadin FL、afadin Δ RA 共に膜への局在が増加することがわかった (Fig 2-8 B)。続いて、1 DIV の大脳皮質神経細胞に YFP および afadin の CAAX 変異体をトランスフェクションし、3 DIV に固定して軸索の形態を解析した (Fig 2-8 C)。その結果、afadin FL-CAAX については、afadin FL に比べて軸索の長さおよび軸索分枝が増加し、afadin Δ RA-CAAX についても、軸索の長さおよび軸索分枝が afadin FL-CAAX と同程度まで増加した (Fig 2-8 D, E)。以上の結果から、afadin は膜へ移行することで軸索の形態を制御すること、および afadin は軸索の分枝形成だけでなく伸長を制御する機能も潜在的に有していることが示唆された。

活性型 R-Ras と afadin は協調的に神経突起の成長を促進する

Neuro2a 細胞は dbcAMP (dibutyryl cAMP) やレチノイン酸などの刺激により分化し、神経突起を伸長させることが知られており (Prasad and Hsieh, 1971; Shea et al., 1985)、この分化した Neuro2a 細胞は神経細胞のモデルとして、神経突起の成長制御の解析に用いられている。この分化した Neuro2a 細胞を用いて、afadin が R-Ras 依存的に神経突起の成長を引き起こすのか調べた。Neuro2a 細胞に YFP、Myc タグを付加した afadin のコンストラクト、および HA タグを付加した R-Ras QL を発現させた後、dbcAMP で分化を誘導し、刺激開始から 2 日後に固定して各細胞の最も長い神経突起について形態の解析を行った (Fig 2-9 A)。その結果、afadin FL については、変化は小さいものの過剰発現により神経突起の長さと同分枝が増加し、その効果は R-Ras QL の共発現により大きく増大することがわかった。一方で、afadin Δ RA については、過剰発現により神経突起の長さが少し増加するものの、R-Ras QL の共発現による変化は見られなかった (Fig 2-9 B, C)。これらの結果から、R-Ras と afadin は協調的に神経突起の形態を制御することが示唆された。

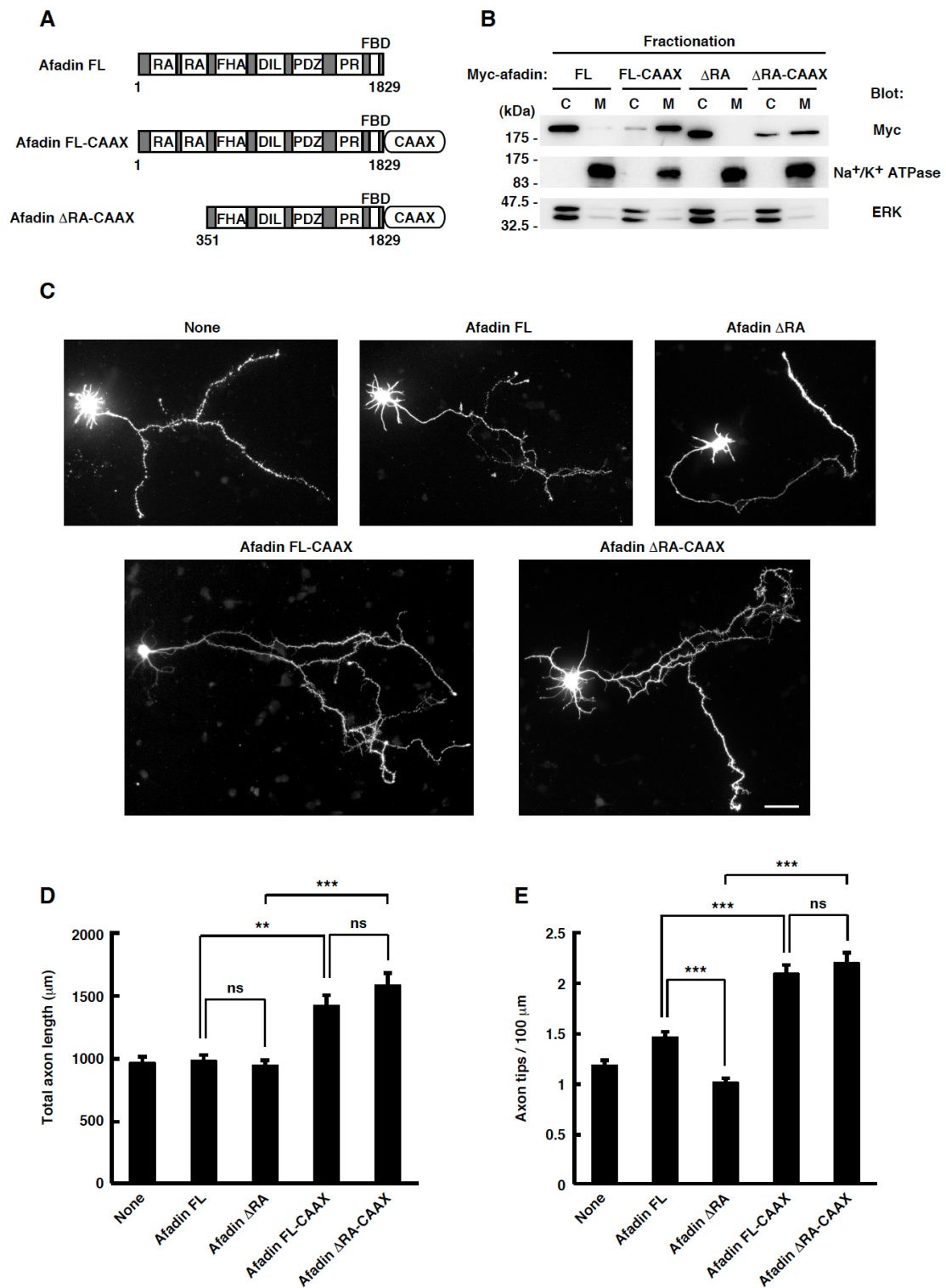


Fig 2-8 Afadin は膜へ移行することで軸索の形態を制御する

(A) 今回の実験で用いた afadin のコンストラクトの模式図を示す。(B) Myc タグを付加した afadin のコンストラクトを発現させた Neuro2a 細胞を用いて細胞分画を行い、細胞質画分 (C) および膜画分 (M) をイムノブロット法で解析した。Na⁺/K⁺-ATPase および ERK は

それぞれ膜画分および細胞質画分のマーカーとして用いた。(C) 大脳皮質神経細胞 (1 DIV) に YFP と Myc タグを付加した afadin のコンストラクトをトランスフェクションし、3 DIV に固定した。YFP の蛍光写真を示す。スケールバーは 50 μm 。(D, E) 軸索の総長 (D) および軸索 100 μm あたりの軸索末端数 (軸索分枝形成の指標) (E) を定量した。3 回の独立した実験結果の平均値をグラフに示す。エラーバーは標準誤差を示す。(n=40; ns, not significant; **p < 0.01; ***p < 0.001, one-way ANOVA, Dunnett T3 post hoc test)

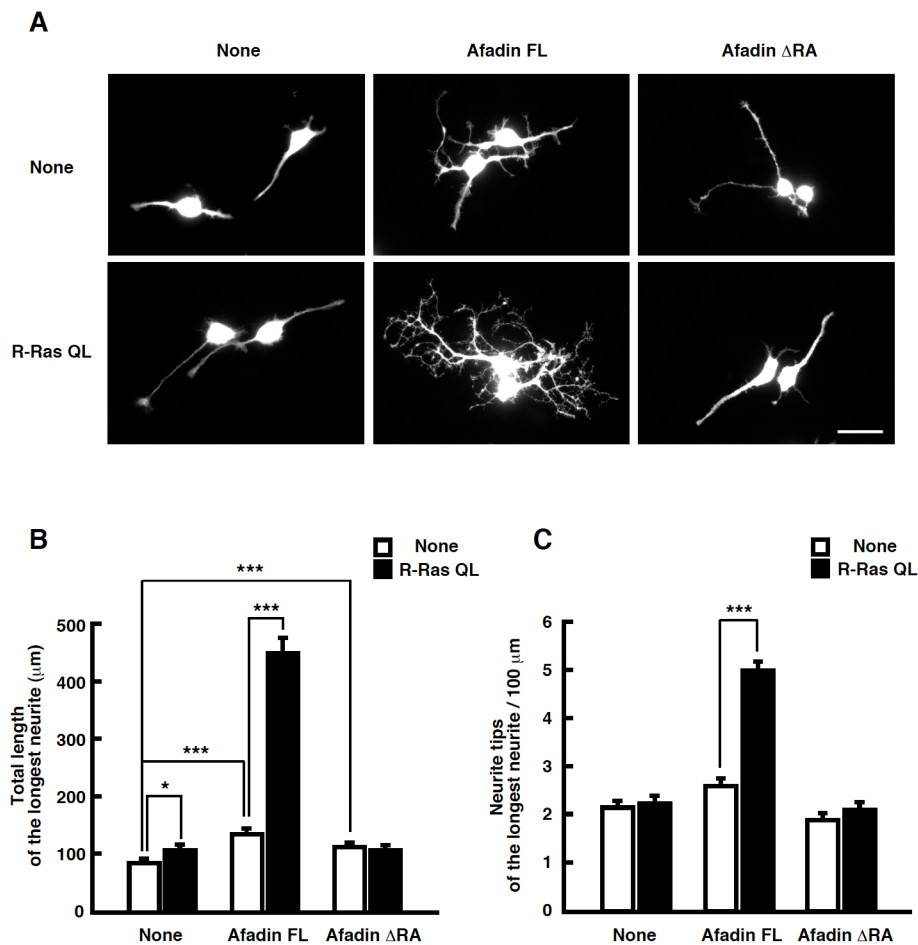


Fig 2-9 活性型 R-Ras と afadin は協調的に神経突起の成長を促進する

(A) Neuro2a 細胞に YFP と Myc タグを付加した afadin のコンストラクト (上段)、あるいは YFP と Myc タグを付加した afadin のコンストラクト、および HA タグを付加した R-Ras QL (下段) をトランスフェクションし、1 mM dbcAMP で 48 時間刺激して分化させた後に固定した。YFP の蛍光写真を示す。スケールバーは 50 μm 。(B, C) 細胞の持つ最も長い神経突起の総長 (B) および 100 μm あたりの神経突起末端数 (分枝形成の指標) (C) を定量した。3 回の独立した実験結果の平均値をグラフに示す。エラーバーは標準誤差を示す。(n=60; *p < 0.05; ***p < 0.001, one-way ANOVA, Dunnett T3 post hoc test)

Afadin はアクチン骨格依存的に軸索の分枝形成を引き起こす

次に、afadin による軸索分枝形成制御の分子メカニズムを調べた。Afadin は多数のドメインを持つアダプタータンパク質であり、そのカルボキシル末端領域で F-actin と直接結合することが明らかとなっている (Mandai et al., 1997)。そこで、afadin による軸索分枝形成の制御とアクチン骨格との関係を調べるため、2 DIV の大脳皮質神経細胞を用いて、ファロイジン染色および免疫細胞染色法により神経細胞における F-actin と内在性 afadin の局在を調べた。その結果、afadin は軸索の先端や分枝形成部位の成長円錐に集積しており、その成長円錐において F-actin と共局在していることがわかった (Fig 2-10)。

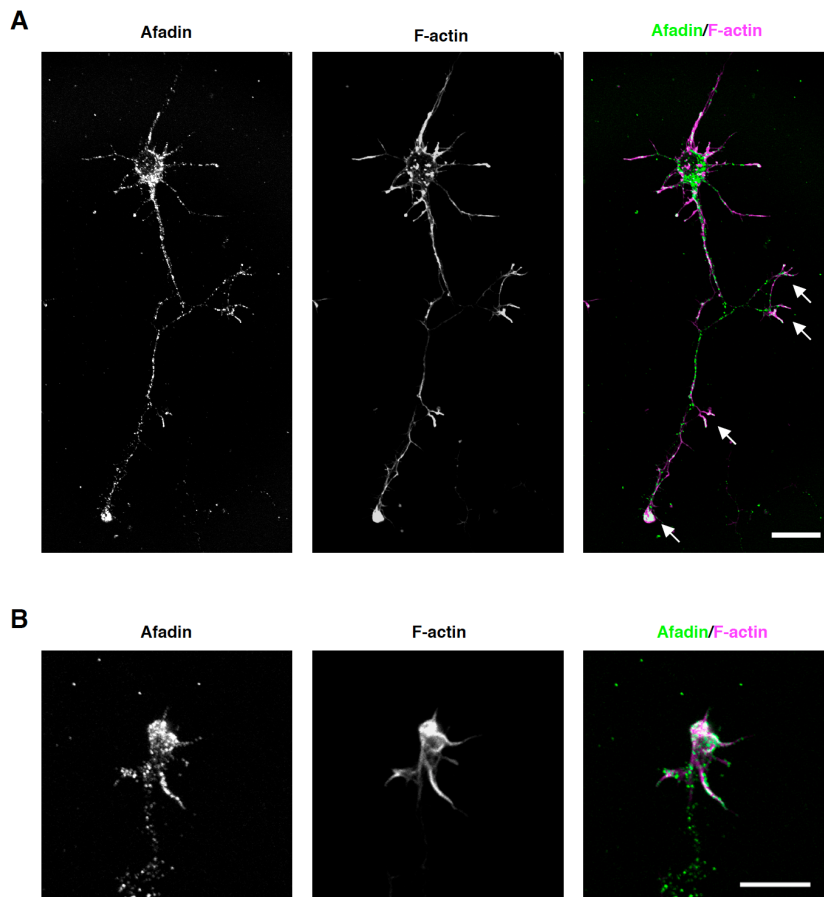


Fig 2-10 Afadin は軸索の先端や分枝形成部位の成長円錐に集積しており、その成長円錐において F-actin と共局在している

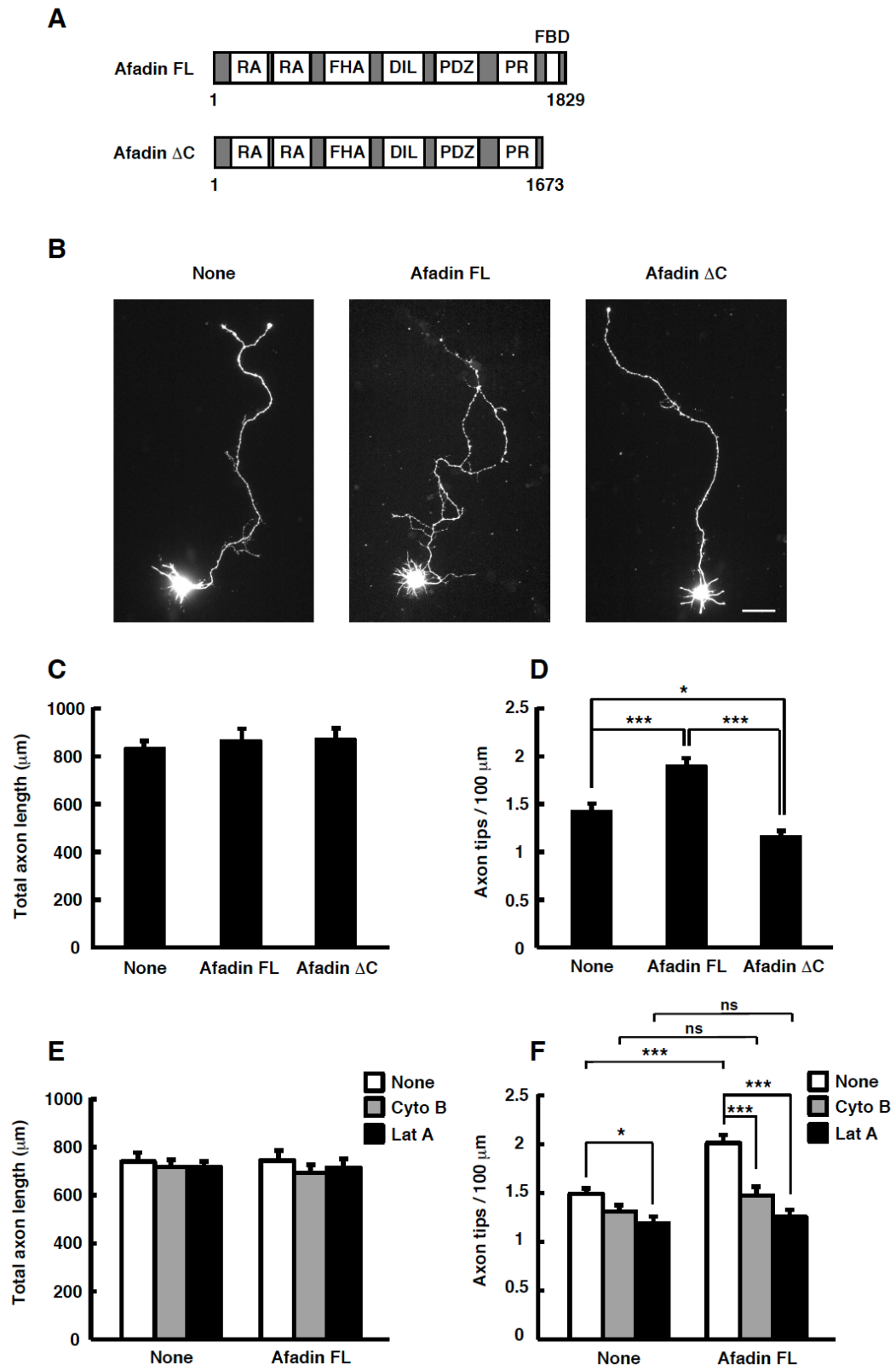
(A, B) 大脳皮質神経細胞 (2 DIV) の内在性 afadin の細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察した。神経細胞は anti-afadin 抗体 (green in merge) と phalloidin (magenta in merge) で共染色した。矢印は成長円錐を示す。(B) 成長円錐の高倍率画像を示す。スケールバーはそれぞれ 20 μm (A) および 10 μm (B)。

この結果から、afadin による軸索分枝形成の制御に F-actin が関与している可能性が示唆された。そこで、カルボキシル末端領域にある F-actin 結合ドメインが afadin による軸索分枝形成の制御に必要なのか調べるため、F-actin 結合ドメインを欠失した変異体である afadin Δ C (Fig 2-11 A) を作製し (Mandai et al., 1997)、神経細胞に発現させて形態を観察した。1 DIV の大脳皮質神経細胞に YFP と afadin FL あるいは afadin Δ C をトランスフェクションし、3 DIV に固定して軸索の形態を解析した (Fig 2-11 B)。その結果、afadin FL の過剰発現による軸索分枝の増加が afadin Δ C では見られないことがわかった (Fig 2-11 C, D)。

続いて、afadin による軸索分枝形成の制御にアクチン骨格が必要なのかさらなる検討を行った。以前の報告により、大脳皮質神経細胞をアクチンフィラメントの重合の阻害剤で処理すると、軸索の長さを減少させることなく、分枝形成を選択的に抑制できることが明らかとなっている (Dent and Kalil, 2001)。そこで、アクチン重合の阻害剤で処理することで afadin による軸索分枝形成が変化するか調べた。YFP と Myc タグを付加した afadin FL を発現させた大脳皮質神経細胞をアクチン重合阻害剤である cytochalasin B あるいは latrunculin A で処理した結果、軸索の伸長には変化が起こらない一方で、afadin FL の過剰発現による軸索分枝の増加が抑制された (Fig 2-11 E, F)。以上の結果より、afadin は F-actin 結合ドメインでアクチン骨格と結合し、アクチン骨格の動的変化に依存するメカニズムを介して軸索の分枝形成を制御していることが示唆された。

Fig 2-11 Afadin はアクチン骨格依存的に軸索の分枝形成を引き起こす

(A) 今回の実験で用いた afadin のコンストラクトの模式図を示す。(B) 大脳皮質神経細胞 (1 DIV) に YFP と Myc タグを付加した afadin のコンストラクトをトランスフェクションし、3 DIV に固定した。YFP の蛍光写真を示す。スケールバーは 50 μ m。(C, D) 軸索の総長 (C) および軸索 100 μ m あたりの軸索末端数 (軸索分枝形成の指標) (D) を定量した。3 回の独立した実験結果の平均値をグラフに示す。エラーバーは標準誤差を示す。(n=45; *p < 0.05; ***p < 0.001, one-way ANOVA, Dunnett T3 post hoc test) (E, F) 大脳皮質神経細胞に YFP と Myc タグを付加した afadin FL をトランスフェクションし、cytochalasin B (Cyto B; 1 μ M) あるいは latrunculin A (Lat A; 0.25 μ M) あるいは DMSO (dimethyl sulfoxide、溶媒コントロール) で処理した後、3 DIV に固定した。阻害剤は固定前に 3 時間作用させた。軸索の総長 (C) および軸索 100 μ m あたりの軸索末端数 (軸索分枝形成の指標) (D) を定量した。3 回の独立した実験結果の平均値をグラフに示す。エラーバーは標準誤差を示す。(n=33; ns, not significant; *p < 0.05; ***p < 0.001, one-way ANOVA, Dunnett T3 post hoc test)



第 3 章 考察

神経軸索のガイダンスや伸長、分枝形成は細胞外の因子や神経細胞に備わるシグナル伝達機構により厳密に制御されており、軸索の形態変化には微小管やアクチン骨格などの細胞骨格の再構築が必要である (O'Donnell et al., 2009; Bilimoria and Bonni, 2013)。軸索の形態制御に関して、近年 Ras ファミリー低分子量 G タンパク質の一つである R-Ras が軸索の決定や成長を制御していることが明らかとなった (Oinuma et al., 2007)。活性型 R-Ras は PI3K シグナル経路の活性化を介して微小管重合の活性化分子である CRMP-2 を活性化し、微小管の再構築を促すことで軸索の形態を制御していることがわかっている (Ito et al., 2006)。一方で、R-Ras とアクチン骨格制御との関係は明らかになっていなかった。本研究により申請者は、アクチン骨格に結合するアダプタータンパク質である afadin が R-Ras のエフェクター分子として機能し、軸索の分枝形成を制御していることを明らかにした。

初代培養神経細胞において、活性型 R-Ras の過剰発現により軸索の伸長および分枝形成が促進され、同時に afadin のノックダウンを行うことにより R-Ras による軸索の伸長は変化せずに分枝形成の促進が抑制された。加えて、afadin の過剰発現は軸索の分枝形成を促進したが、軸索の伸長には影響がなかった。これらの結果から、afadin は R-Ras の下流で軸索の伸長よりも分枝形成を主に制御しており、R-Ras による軸索の伸長は別のメカニズムによって制御されていると考えられる。軸索の伸長と分枝形成は協調的ではあるが独立した成長プロセスであり、両者に共通の制御システムと一方に選択的に関わる制御システムが存在することが明らかになっている。R-Ras は軸索の決定、伸長といった多くの成長ステップにおいて重要な役割を担う分子であることがわかっている (Ivins et al., 2000; Oinuma et al., 2007)。本研究において、afadin は活性型 R-Ras に特異的に結合し、R-Ras のエフェクター分子として軸索の分枝形成を制御することを明らかにした。PI3K などの様々な R-Ras のエフェクター分子の中で、afadin は R-Ras による軸索分枝形成の制御に関与するグループに属するものであると考えられる。一方で、大脳皮質神経細胞に afadin の膜移行型変異体を過剰発現すると軸索の分枝形成だけでなく伸長も促進された。また、Neuro2a を用いたモデル系に

において、活性型 R-Ras と afadin を共発現させると神経突起の分枝形成、伸長共に増加した。これらの結果から、R-Ras/afadin シグナル経路は神経突起の伸長を制御する機能も潜在的に有しているが、軸索の伸長においてはその寄与は小さいと考えられる。一方で、樹状突起においては、afadin のノックダウンによって樹状突起の長さが減少することが最近の研究で明らかとなり、afadin が樹状突起の伸長を制御していることが示唆されている (Srivastava et al., 2012)。R-Ras は軸索に選択的に局在することから、樹状突起においては M-Ras など他の Ras ファミリーが afadin の機能を制御することで樹状突起の伸長を制御している可能性が考えられる。

活性型 R-Ras による軸索分枝の増加は afadin のノックダウンによって抑制されるが、完全には抑制されず、その効果は部分的であった。これは shRNA による afadin の発現の抑制が部分的であることが原因である可能性が考えられるが、もう一つの可能性として、R-Ras/afadin シグナル経路以外に R-Ras の下流で軸索の分枝形成を制御しているメカニズムが存在していることも考えられる。実際に、R-Ras の活性化により PI3K/AKT シグナル経路を介して GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β) の 9 番目のセリン残基がリン酸化されて不活性化されることがわかっており (Oinuma et al., 2007)、PI3K/AKT シグナル経路の活性化および GSK-3 β の不活性化は軸索分枝形成の制御に関与していることが示唆されている (Yoshimura et al., 2005; Drinjakovic et al., 2010)。R-Ras は afadin を介する経路および PI3K シグナル経路を含む複数のシグナル経路を協調的に働かせることで、軸索の分枝形成を制御していると考えられる。

これまでの報告により、様々な細胞外因子や神経細胞の活動性が軸索の形態変化に影響を与えることがわかっている (Dent and Kalil, 2001; Yamada et al., 2010; Bilimoria and Bonni, 2013)。そういった細胞外因子の中で、netrin-1 および fibroblast growth factor-2 は軸索の分枝形成を促進し、反発性軸索ガイダンス因子の semaphorin-3A は逆に分枝形成を抑制すること、およびこれら 3 つの因子は軸索の伸長には影響しないことが大脳皮質神経細胞を用いた研究によって明らかになっている (Dent et al., 2004)。また、反発性軸索ガイダンス因子の ephrin も軸索の分枝形成に関与していることがわかっている (Bilimoria and Bonni, 2013)。Semaphorin の受容体である plexin は R-Ras を直接不活性化することが明らかと

なっている (Oinuma et al., 2004a, 2004b; Toyofuku et al., 2005; Uesugi et al., 2009)。さらに、ephrin は Eph 受容体を介して R-Ras を不活性化することで軸索の退縮を引き起こすことも報告されている (Dail et al., 2006)。また、神経細胞において、netrin-1 は adenosine A2b 受容体を介して細胞内での cAMP 濃度を上昇させることがわかっており (Corset et al., 2000)、非神経系の培養細胞において、cAMP 濃度の上昇は EPAC の活性化を介して R-Ras の活性上昇を引き起こすことがわかっており (López De Jesús et al., 2006)。これらの報告から、R-Ras/afadin シグナル経路は軸索分枝形成を制御する細胞外因子の下流シグナル経路として機能している可能性が考えられる。

細胞の接着には細胞-基質間接着および細胞-細胞間接着の 2 つのタイプが存在し、どちらも細胞の形態制御に関与していることが知られている。細胞-基質間接着は細胞表面に存在する integrin が fibronectin などの細胞外基質と結合することによって形成されており、integrin が細胞外基質と強く結合するためには integrin が活性化され、かつ細胞内においてアクチン骨格と結合することが必要である (Liddington and Ginsberg, 2002)。細胞外基質タンパク質は軸索の分枝形成の制御に関与していることが報告されている (Féréol et al., 2011)。また、培養細胞を用いた研究によって、R-Ras は $\beta 1$ integrin を活性化することで細胞-基質間接着を強めることがわかっている (Zhang et al., 1996)。さらに、視神経細胞において、R-Ras は integrin を介する神経突起の伸長および細胞外基質への接着を促進することも明らかとなっている (Ivins et al., 2000)。Afadin は細胞-基質間接着への関与はよくわかっていないが、細胞膜に存在する nectin と結合することで細胞-細胞間接着の制御に関与していることがわかっている (Takai et al., 2008)。また、最近の研究により、軸索の伸長および分枝形成には細胞外基質に対して軸索が強く接着することが必要であり、この接着力は細胞内のアクチン骨格による牽引力によって調節されていることが示唆されている (Féréol et al., 2011)。これらの報告から、R-Ras/afadin シグナル経路は軸索において integrin とアクチン骨格とを繋ぐシグナル経路として働き、細胞-基質間接着を調節することで軸索の形態を制御している可能性が考えられる。

本研究において、R-Ras による afadin の機能制御メカニズムの解析も行った。Afadin は足場タンパク質として働く分子であり、その機能発現には膜への移行が

重要であることがわかっている。以前の報告で、方向性を持った細胞運動や樹状突起スパインの形態制御に、低分子量 G タンパク質 Rap1 による afadin の膜への移行が関与していることが明らかとなっている (Xie et al., 2005; Miyata et al., 2009)。本研究では、活性型 R-Ras は afadin の RA ドメインに結合して afadin を細胞膜へリクルートすること、およびこの膜への移行が Neuro2a 細胞の神経突起の伸長ならびに分枝形成に関係していることを示唆する結果を得た。また、大脳皮質神経細胞において、膜移行型 afadin を過剰発現することで軸索の伸長、分枝形成が促進されることを明らかにした。Afadin はカルボキシル末端領域で F-actin と結合することがわかっており (Mandai et al., 1997)、また、軸索の分枝形成部位において F-actin の集積が微小管の突起への侵入に先立って起こることも報告されている (Kalil et al., 2000)。培養系において、大脳皮質神経細胞の軸索分枝形成は成長円錐の形態変化を通じて起こることがわかっている (Szebenyi et al., 1998)。Szebenyi らは初代培養の大脳皮質神経細胞を用いて、高分解能のタイムラプスイメージングを行い、軸索の成長円錐は伸長と停止を繰り返しており、成長円錐が停止した部位から後に分枝が形成されることを見出した。また、彼らは成長円錐が停止した部位の軸索のシャフトに成長円錐の残滓としてフィロポディアあるいはラメリポディアが残り、これらが残る部位から分枝形成が起こることも示した。本研究では、afadin は軸索の先端および分枝形成部位の成長円錐に集積しており、その成長円錐において F-actin と共局在していることを明らかにした。さらに、afadin による軸索分枝形成の制御にはカルボキシル末端領域の F-actin 結合ドメインが必要であること、およびアクチン重合の阻害剤で処理することによって afadin FL の過剰発現による軸索分枝形成の促進が抑制されることを示した。以上の結果および報告から、F-actin と結合した afadin が活性型 R-Ras によって膜へ運ばれ、膜近傍においてアクチン骨格の再構築を促すことで軸索の分枝形成を制御していることが示唆される (Fig 3)。しかしながら、afadin は F-actin と結合するが、afadin 自体には F-actin を架橋し、束構造や編目構造を形成する機能はなく、アクチン重合にも影響を与えないことが明らかとなっている (Mandai et al., 1997)。したがって、afadin は分枝形成が起こる場所に F-actin を集める働きをしており、他の分子によってアクチン重合あるいは F-actin のクロスリンクが引き起こされて軸索の分枝形成が起こると考えられる。また、afadin は F-actin 以外にも Src キナーゼや α -catenin などの細胞骨格の制御分子を含む多数の分子と結合することが知られている (Tachibana et al., 2000;

Pokutta et al., 2002; Radziwill et al., 2007)。したがって、R-Ras と afadin の結合により、F-actin だけでなく、細胞骨格の制御に働く様々な afadin 結合分子が膜へ運ばれることも軸索分枝形成に関与している可能性がある。R-Ras/afadin の上流および下流で軸索分枝形成の制御に働く分子メカニズムを明らかにするためには、更なる研究が必要である。

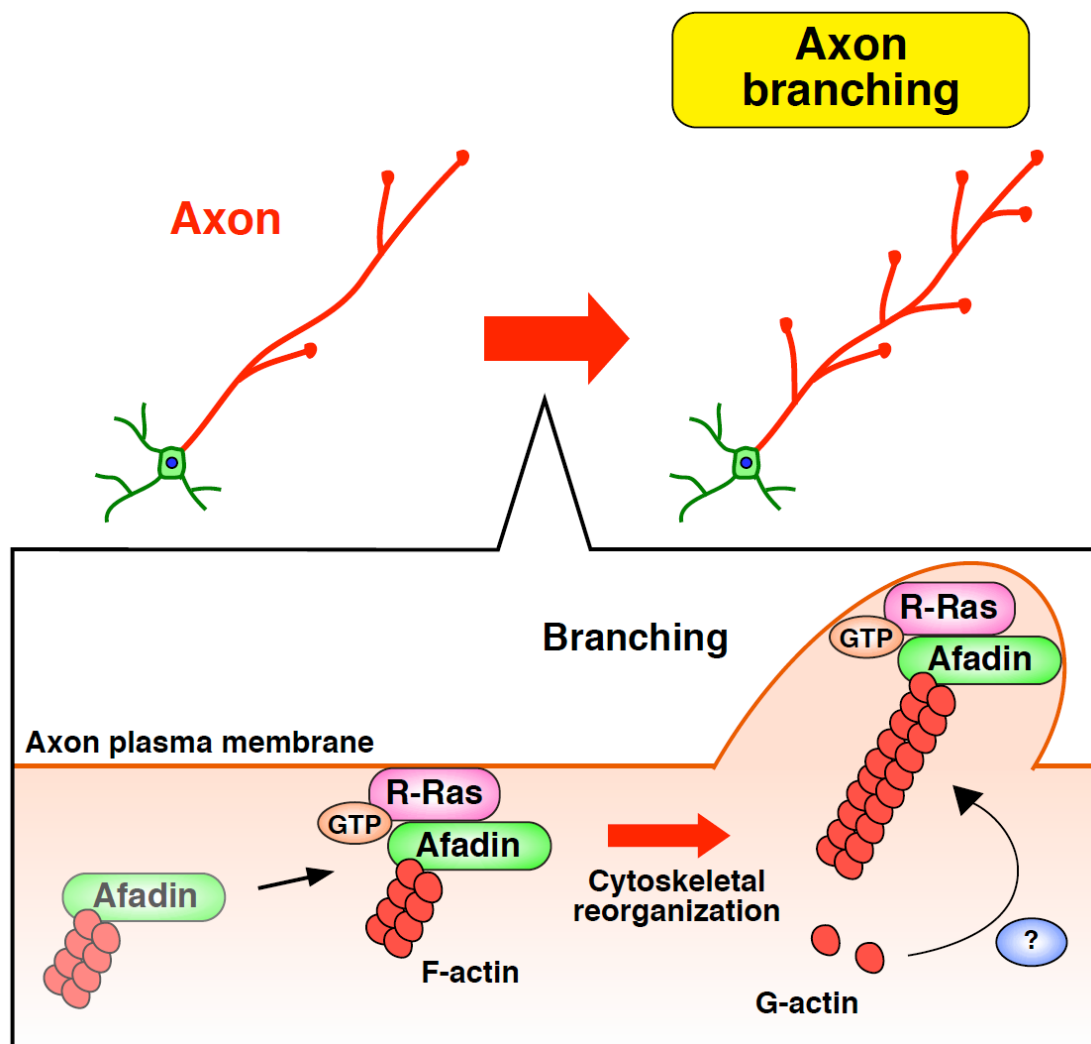


Fig 3 R-Ras/afadin シグナル経路による軸索分枝形成制御のモデル図

活性化された R-Ras は afadin および F-actin を細胞膜へ運び、運ばれた F-actin が何らかの分子によって重合あるいは架橋されることでアクチン骨格の再構築が起こり、軸索の分枝形成が引き起こされると考えられる。

複雑な神経ネットワークを正確に構築するためには、軸索が正しく枝分かれし、複数の標的細胞とシナプス接続を形成することが必要である。網膜神経節細胞や大脳皮質神経細胞において、軸索分枝形成の場所および時期が厳密に制御されていることがわかっている (Gilbert, 1983; Callaway, 1998; Yates et al., 2001)。また、神経ネットワークが構築された後にも外部環境からの刺激や神経活動により軸索分枝の再構築が起こることが知られている (Hall et al., 2000; Hua et al., 2005)。さらに、海馬歯状回および嗅球の神経細胞の軸索分枝形成異常が、側頭葉性てんかんおよびカルマン症候群の発症にそれぞれ関与していることが示唆されている (Soussi-Yanicostas et al., 2002; Koyama and Ikegaya, 2005)。これらのことから、軸索分枝形成の分子メカニズムを理解することは重要な課題であり、本研究はこの課題の解決に貢献するものであると考える。

第 4 章 結論

本研究により得られた知見をまとめると以下の通りである。

- ・ 軸索成長期の神経細胞において、活性型 R-Ras は afadin と結合する。
- ・ 活性型 R-Ras は afadin を細胞膜へリクルートする。
- ・ R-Ras は afadin を介して軸索の分枝形成を制御する。
- ・ Afadin による軸索分枝形成の制御には、アクチン骨格との結合およびアクチン骨格の再構築が必要である。

本研究により R-Ras による軸索形態制御の新しい分子メカニズムが明らかになった。

実験方法

プラスミドの構築

GST 融合ヒト R-Ras および HA タグを付加した R-Ras QL (Q87L) は以前の報告の通り構築された (Oinuma et al., 2004a)。Myc タグを付加した R-Ras QL は pcDNA3 (Invitrogen) に組み込んだ。GFP タグを付加したラット afadin FL (1-1829aa [amino acid]) および Δ RA (351-1829aa) は神戸大学の高井義美博士に提供していただいた。F-actin 結合ドメインを欠失した afadin Δ C (1-1673aa) は PCR 法を用いて作製した。CAAX モチーフは afadin FL および Δ RA の C 末端に、以前の報告の通りに付加した (Kato et al., 2002)。Myc タグを付加した afadin のコンストラクトは pCXN2 に組み込んだ。YFP を組み込んだ pCAG ベクターは大阪大学の宮崎純一博士および千葉大学の斎藤哲一郎博士より提供していただいた。酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングのため、マウス TC21 および TC21 GV (G23V、常時活性型変異体) を PCR 法を用いて作製した。その後、CAAX モチーフを欠失した R-Ras QL Δ C および TC21 GV Δ C を PCR 法を用いて作製し、pGBKT7 (Clontech) に組み込んだ。ラット afadin を標的とする shRNA は pSilencer2.1 (Ambion) に組み込んだ。標的配列は以下の通りである。Afadin shRNA#A (塩基配列 308-326、5'-GATTGGACATTGATGAGAA-3')、afadin shRNA#B (塩基配列 2862-2880、5'-CATTCCAAATGGTTTACAA-3')。ラット R-Ras を標的とし、R-Ras のノックダウン効果がなく、軸索の形態にも影響を与えないことがわかっている R-Ras shRNA (塩基配列 426-444、5'-CAAGGCAGATCTGGAGACA-3') を control shRNA として用いた (Oinuma et al., 2007)。

抗体と試薬

本研究で使用した抗体は以下のとおりである。マウスモノクローナル anti-Myc 抗体 (9E10)、anti-GFP 抗体 (B-2)、anti-afadin 抗体 (clone-35)、ラビットポリクローナル anti-HA 抗体 (Y-11) を Santa Cruz Biotechnology より購入した。ラビットポリクローナル anti-ERK 抗体を Cell Signaling Technology より購入した。ラットモノクローナル anti-HA 抗体 (3F10) を Roche Applied Science より購入した。マウスモノクローナル anti-Na⁺/K⁺-ATPase α subunit 抗体、ラビットポリ

クローナル anti-GST 抗体 (Ab-1) を Millipore より購入した。マウスモノクローナル anti- β -actin 抗体を Sigma Aldrich より購入した。ラビット anti-R-Ras 抗血清を BD Biosciences より購入した。HRP (horseradish peroxidase) 標識二次抗体は DakoCytomation より購入した。Clean-Blot IP Detection Reagent は ThermoFisher Scientific より購入した。Alexa Fluor 488 標識 anti-GFP 抗体と Alexa Fluor 488, 594 および 647 標識二次抗体は Invitrogen より購入した。Poly-L-lysine、dbcAMP、cytochalasin B は Sigma Aldrich より購入した。Latrunculin A は Invitrogen より購入した。

酵母ツーハイブリッドスクリーニング

pACT2 ベクター (Clontech) の GAL4 活性化ドメインに融合させたラット脳 cDNA ライブラリーを対象に、pGBKT7 に組み込んだ R-Ras QL Δ C および TC21 GV Δ C をベイトとして、酵母 AH109 株を用いて添付文書に従ってスクリーニングを行った。ベイトタンパク質とライブラリータンパク質の結合により、*HIS3*、*Ade*、*lacZ* の 3 つのレポーター遺伝子の発現が活性化される。 1.4×10^7 個のクローンをスクリーニングし、728 個のコロニーがヒスチジンおよびアデニンを欠く選択培地上に形成され、これらはすべて β -ガラクトシダーゼ活性陽性であった。この陽性クローンの中に *afadin* のアミノ末端領域の配列をコードするものが含まれていた。 β -ガラクトシダーゼ活性の測定は以前の報告の通り行われた (Katoh et al., 2002)。

細胞培養と遺伝子導入

HEK293T 細胞および Neuro2a 細胞は、4 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin、および、10% FBS (fetal bovine serum) を添加した DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) を用いて、インキュベータ内 (5% CO₂、37 °C、加湿) で培養した。トランスフェクションは、HEK293T 細胞は Lipofectamine (Invitrogen) および Plus reagent (Invitrogen) を、Neuro2a 細胞は Lipofectamine 2000 (Invitrogen) をそれぞれ用い、添付文書に従って行われた。神経突起の観察については、プラスミドをトランスフェクションした Neuro2a 細胞とトランスフェクションしていない細胞を 1:4 の割合で混合し、poly-L-lysine でコートしたカバーガラス (直径 13 mm、Matsunami Glass) 上にまいた後、1 mM dbcAMP、5% FBS を添加した DMEM で 48 時間培養して分化させた。

大脳皮質および海馬神経細胞の初代培養には胎生 19 日齢のラットを用いた。まず、母ラットを麻酔下断頭し、胎児を摘出して氷冷 HBSS (Hanks' balanced salt solution; Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 無添加) 中に回収した。その胎児の脳から大脳皮質および海馬を摘出し、HBSS でウォッシュした後、0.25% trypsin と 0.1% DNase を含む HBSS で 10 分間、37 °C でインキュベートした。その大脳皮質および海馬を HBSS でウォッシュした後、ピペッティングにより分散し細胞懸濁液を得た (Ishikawa et al., 2003)。その後、poly-L-lysine でコートしたカバーガラス (直径 13 mm、 2×10^4 個) あるいはディッシュ (60 mm または 100 mm) を用いて、4 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin、および 10% FBS (fetal bovine serum) を添加した DMEM を用いて、インキュベータ内 (5% CO_2 、37 °C、加湿) で培養した。4 時間後、2%あるいは 4% B-27 supplement (Invitrogen)、0.5 mM GlutaMAX (Invitrogen)、50 units/ml penicillin、及び 0.05 mg/ml streptomycin を添加した Neurobasal medium (Invitrogen) に培養液を交換した。Afadin コンストラクトの過剰発現を行う際は、1 DIV に Lipofectamine 2000 を用いて添付文書に従ってトランスフェクションを行った。ノックダウン実験および 3 DIV と 6 DIV の軸索形態比較を行う際には、Rat Neuron Nucleofector Kit (Lonza) を用いて添付文書に従ってトランスフェクションを行った。Cytochalasin B および latrunculin A は DMSO に溶解し、阻害剤による処理は 1 μM cytochalasin B、0.25 μM latrunculin A の濃度条件で固定前に 3 時間行った。すべての動物実験は京都大学動物実験委員会のガイドラインに従って行われた。

イムノブロット解析

タンパク質を SDS-PAGE によって分離した後、PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜 (Millipore) に転写した。この膜を 3% スキムミルクを含む TBS (Tris-buffered saline) でブロッキングし、一次抗体、続いて HRP 標識二次抗体と反応させ、ECL 検出キット (Chemi-lumi One; Nacalai Tesque もしくは ECL Plus Western Blotting Detection System; GE Healthcare) を用いて検出した。画像は LAS3000 analyzer (Fujifilm) と Science Lab software (Fujifilm) を用いて取得した。

ブルダウンアッセイ

実験で用いた GST 融合リコンビナントタンパク質は、*E. coli* を用いて以前の報告の通りに精製した (Katoh et al., 2002)。得られたタンパク質の濃度は、

SDS-PAGE の後、CBB (Coomassie Brilliant Blue) 染色法によって BSA (bovine serum albumin) の検量線と比較し、決定した。Afadin が活性型の R-Ras に結合するのか調べる際には、100 μ M の GTP- γ S または GDP- β S を含む loading buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0、150 mM NaCl、5 mM EDTA、0.5 mg/ml BSA、1 mM DTT [dithiothreitol]、10% glycerol) で 30 °C、10 分間インキュベートした。その後、MgCl₂ を最終濃度が 10 mM になるように加え、ヌクレオチドの取り込み反応を停止させた。

プルダウンアッセイの際には、HEK293T 細胞に GFP タグを付加した afadin FL あるいは afadin Δ RA を発現させ、細胞を TBS でウォッシュした後、氷冷した cell lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0、150 mM NaCl、4 mM MgCl₂、1% NP-40、10% glycerol、1 mM PMSF [phenylmethylsulfonyl fluoride]、10 μ g/ml aprotinin、10 μ g/ml leupeptin、1 mM DTT) で溶解した。その後 16,000 $\times$ g、4 °C で 10 分間遠心分離し、上清に 5 μ g の GST タンパク質および glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare) を加えて 4 °C で 1.5 時間インキュベートした。その後、glutathione-Sepharose beads を氷冷した wash buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0、150 mM NaCl、4 mM MgCl₂、0.5% NP-40、10% glycerol) でウォッシュした後、結合したタンパク質を Laemmli sample buffer で溶出し、SDS-PAGE とイムノブロットにより検出した。

免疫沈降法

記述したプラスミドをトランスフェクションした HEK293T 細胞を TBS でウォッシュした後、氷冷した IP buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0、150 mM NaCl、4 mM MgCl₂、1% NP-40、10% glycerol、1 mM PMSF、10 μ g/ml aprotinin、10 μ g/ml leupeptin) で溶解した。その後 16,000 $\times$ g、4 °C で 5 分間遠心分離し、上清に anti-Myc マウスモノクローナル抗体 (9E10) を添加し、4 °C で 2 時間インキュベートした後、protein G Sepharose beads (GE Healthcare) を加えて、さらに 1 時間インキュベートした。Protein G Sepharose beads を氷冷した IP buffer でウォッシュした後、結合したタンパク質を Laemmli sample buffer で溶出し、SDS-PAGE とイムノブロット法で検出した。

内在性タンパク質の結合を検出する際には、初代培養の大脳皮質神経細胞を 2 DIV に TBS でウォッシュした後、氷冷した IP buffer で溶解した。その後 16,000 $\times$ g、4 °C で 10 分間遠心分離し、上清に anti-R-Ras 抗血清を添加して 4 °C で 1

時間インキュベートした後、protein G Sepharose beads を加えて、さらに 1 時間インキュベートした。Protein G Sepharose beads を氷冷した IP buffer でウォッシュした後、結合したタンパク質を Laemmli sample buffer で溶出し、SDS-PAGE とイムノブロット法で検出した。

細胞分画法

細胞質画分と膜画分の分画は以前の報告の通り行われた (Hiramoto-Yamaki et al., 2010)。記述したプラスミドをトランスフェクションした Neuro2a 細胞を TBS でウォッシュした後、氷冷した buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.5、150 mM NaCl、50 mM NaF、1 mM Na_3VO_4 、1 mM PMSF) で回収した。その後、液体窒素による急速凍結と水浴による解凍により細胞膜を穏やかに破壊し、 $16,000\times g$ 、4 °C で 10 分間遠心分離した。得られた上清を細胞質画分とし、沈殿は氷冷した buffer A でウォッシュした後、1% Triton X-100 を含む氷冷した buffer A で懸濁して膜画分を抽出した。その後、 $10,000\times g$ 、4°C で 10 分間遠心分離し、得られた上清を膜画分とした。細胞質画分および膜画分は SDS-PAGE とイムノブロットにより検出した。なお、膜画分に存在する afadin の CAAX 変異体は可溶化されにくかったため、CAAX 変異体の局在確認の際には、1% Triton X-100 および 0.25% sodium deoxycholate を含む buffer A を用いて膜画分の抽出を行った。

免疫細胞染色および観察

カバーガラス上の培養細胞を 4% paraformaldehyde で室温 20 分間固定し、50 mM NH_4Cl を含む PBS (phosphate-buffered saline) で 10 分、0.2% Triton X-100 を含む PBS で 10 分間処理した後、10% FBS を含む PBS で 30 分間ブロッキングを行った。続いて、一次抗体を希釈した 10% FBS を含む PBS 溶液で室温 1 時間インキュベートした後、蛍光標識された二次抗体を希釈した 10% FBS を含む PBS 溶液で室温 1 時間インキュベートした。その後、0.1% *p*-phenylenediamine dihydrochloride を含む 90% glycerol/PBS で封入した。蛍光顕微鏡観察は Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon) と Leica DC350F digital camera system (Leica) を用いて行った。

大脳皮質神経細胞を用いて内在性 afadin の免疫染色を行う際には、固定および膜透過処理を行った細胞を 1% Blocking Reagent (Roche Applied Science) で 30 分間ブロッキングを行った。続いて、anti-afadin 抗体 (clone-35) を希釈した Can

Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution A (Toyobo) で室温 1 時間インキュベートした後、Alexa-488 で標識された二次抗体を希釈した Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution A で室温 1 時間インキュベートした。F-actin の染色を行う際には、Alexa-594 で標識された phalloidin (Invitrogen) を希釈した Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution A で室温 1 時間インキュベートした。染色後、Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen) で封入した。Z 軸平面画像の取得は、laser-scanning confocal imaging system (FluoView FV1000-D, Olympus) と、60 倍/開口数 1.35 および 100 倍/開口数 1.40 の油浸レンズ (Olympus) を搭載した IX81-S confocal microscope (Olympus) を用いて行った。

データ解析

イムノブロット画像の定量は Multi Gauge version 3.1 (Fujifilm) を用いて行った。軸索の形態の定量については、以前の報告 (Schwamborn and Püschel 2004; Yin et al., 2008; Sepúlveda et al., 2009) を参考に、他の突起より 2 倍以上長く、かつ細胞体の直径の 2 倍以上長い突起を軸索と判断し、その長さおよび突起先端数を測定した。Neuro2a 細胞の神経突起の定量については、以前の報告 (Cowley et al., 1994; Sepúlveda et al., 2009) を参考に、細胞体の直径の 2 倍以上長い突起を持つ細胞を分化した細胞と判断し、最も長い神経突起についてその長さおよび突起先端数を測定した。蛍光画像の定量は Image J software (National Institute of Health) を用いて行った。

突起については、5 μm 以上の突起を定量し、その数を「突起先端数 (tip number)」とした (Marler et al., 2008)。突起の長さは細胞体の端あるいは分岐点から突起先端までを測定し、一つの細胞から伸びた軸索あるいは最も長い神経突起の分枝を含めた突起長の総和を、それぞれ「軸索の総長 (total axon length)」および「最長神経突起の総長 (total length of the longest neurite)」とした。統計学的な検定は SPSS software version 16.0 (IBM) を使用し、Student t-test あるいは ANOVA (analysis of variance) および Dunnett T3 post hoc test を用いて行った。検定の結果、 $p < 0.05$ となったものを有意と判断した。

参考文献

- Arimura, N. and Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 194-205.
- Asada, M., Irie, K., Morimoto, K., Yamada, A., Ikeda, W., Takeuchi, M., and Takai, Y. (2003). ADIP, a novel Afadin- and alpha-actinin-binding protein localized at cell-cell adherens junctions. *J. Biol. Chem.* 278, 4103-4111.
- Beaudoin, GM 3rd., Schofield, CM., Nuwal, T., Zang, K., Ullian, EM., Huang, B., and Reichardt, LF. (2012). Afadin, a ras/rap effector that controls cadherin function, promotes spine and excitatory synapse density in the hippocampus. *J. Neurosci.* 32, 99-110.
- Bilimoria, PM. and Bonni, A. (2013). Molecular control of axon branching. *Neuroscientist.* 19, 16-24.
- Bishop, AL. and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348, 241-255.
- Bradke, F. and Dotti, CG. (2000). Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 574-581.
- Callaway, EM. (1998). Local circuits in primary visual cortex of the macaque monkey. *Annu Rev Neurosci.* 21, 47-74.
- Carmena, A., Makarova, A., and Speicher, S. (2011). The Rap1-Rgl-Ral signaling network regulates neuroblast cortical polarity and spindle orientation. *J. Cell Biol.* 195, 553-562.
- Corset, V., Nguyen-Ba-Charvet, KT., Forcet, C., Moyse E., Chédotal, A., and Mehlen, P. (2000). Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. *Nature* 407, 747-750.
- Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., and Marshall, CJ. (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77, 841-852.
- Dail, M., Richter, M., Godement, P., and Pasquale, EB. (2006). Eph receptors inactivate R-Ras through different mechanisms to achieve cell repulsion. *J. Cell Sci.* 119, 1244-1254.
- Dent, EW. and Kalil, K. (2001). Axon branching requires interactions between dynamic

- microtubules and actin filaments. *J. Neurosci.* *21*, 9757-9769.
- Dent, EW., Barnes, AM., Tang, F., and Kalil, K. (2004). Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton. *J. Neurosci.* *24*, 3002-3012.
- Dickson, BJ. (2001). Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol.* *11*, 103-110.
- Drinjakovic, J., Jung, H., Campbell, DS., Strohlic, L., Dwivedy, A., and Holt, CE. (2010). E3 ligase Nedd4 promotes axon branching by downregulating PTEN. *Neuron* *65*, 341-357.
- D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, MI., and Stahl, PD. (1995). A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science*. *267*, 1175-1178.
- Feramisco, JR., Gross, M., Kamata, T., Rosenberg, M., and Sweet, RW. (1984). Microinjection of the oncogene form of the human H-ras (T-24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells. *Cell* *38*, 109-117.
- Féréol, S., Fodil, R., Barnat, M., Georget, V., Milbreta, U., and Nothias, F. (2011). Micropatterned ECM substrates reveal complementary contribution of low and high affinity ligands to neurite outgrowth. *Cytoskeleton* *68*, 373-388.
- Fournier, G., Cabaud, O., Josselin, E., Chaix, A., Adélaïde, J., Isnardon, D., Restouin, A., Castellano, R., Dubreuil, P., Chaffanet, M., Birnbaum, D., and Lopez, M. (2011). Loss of AF6/afadin, a marker of poor outcome in breast cancer, induces cell migration, invasiveness and tumor growth. *Oncogene* *30*, 3862-3874.
- Gawecka, JE., Griffiths, GS., Ek-Rylander, B., Ramos, JW., and Matter, ML. (2010). R-Ras regulates migration through an interaction with filamin A in melanoma cells. *PLoS One.* *5*, e11269.
- Gilbert, CD. (1983). Microcircuitry of the visual cortex. *Annu Rev Neurosci.* *6*, 217-247.
- Goi, T., Rusanescu, G., Urano, T., and Fei, LA. (1999). Ral-specific guanine nucleotide exchange factor activity opposes other Ras effectors in PC12 cells by inhibiting neurite outgrowth. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1731-1741.
- Goldfinger, LE., Ptak, C., Jeffery, ED., Shabanowitz, J., Hunt, DF., and Ginsberg, MH. (2006). RLIP76 (RalBP1) is an R-Ras effector that mediates adhesion-dependent Rac activation and cell migration. *J Cell Biol.* *174*, 877-888.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* *279*, 509-514.

- Hall, A. and Lalli, G. (2010). Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001818.
- Hall, AC., Lucas, FR., and Salinas, PC. (2000). Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* 100, 525-535.
- Hiramoto-Yamaki, N., Takeuchi, S., Ueda, S., Harada, K., Fujimoto, S., Negishi, M., and Katoh, H. (2010). Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependent mechanism. *J. Cell Biol.* 190, 461-477.
- Hofer, F., Fields, S., Schneider, C., and Martin, GS. (1994). Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 91, 11089-11093.
- Hua, JY., Smear, MC., Baier, H., and Smith, SJ. (2005). Regulation of axon growth in vivo by activity-based competition. *Nature*. 434, 1022-1026.
- Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2003). A role of Rnd1 GTPase in dendritic spine formation in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 23, 11065-11072.
- Ito, Y., Oinuma, I., Katoh, H., Kaibuchi, K., and Negishi, M. (2006). Sema4D/plexin-B1 activates GSK-3b through R-Ras GAP activity, inducing growth cone collapse. *EMBO Rep.* 7, 704-709.
- Ivins, JK., Yurchenco, PD., and Lander, AD. (2000). Regulation of neurite outgrowth by integrin activation. *J. Neurosci.* 20, 6551-6560.
- Kalil, K., Szebenyi, G., and Dent, EW. (2000). Common mechanisms underlying growth cone guidance and axon branching. *J. Neurobiol.* 44, 145-158.
- Katoh, H., Harada, A., Mori, K., and Negishi, M. (2002). Socius is a novel Rnd GTPase-interacting protein involved in disassembly of actin stress fibers. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2952-2964.
- Keely, PJ., Rusyn, EV., Cox, AD., and Parise, LV. (1999). R-Ras signals through specific integrin alpha cytoplasmic domains to promote migration and invasion of breast epithelial cells. *J. Cell Biol.* 145, 1077-1088.
- Khokhlatchev, A., Rabizadeh, S., Xavier, R., Nedwidek, M., Chen, T., Zhang, XF., Seed, B., and Avruch, J. (2002). Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway. *Curr. Biol.* 12, 253-265.
- Kimmelman, AC, Nuñez Rodriguez, N., and Chan, AM. (2002). R-Ras3/M-Ras induces neuronal differentiation of PC12 cells through cell-type-specific activation of the

- mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5946-5961.
- Kinbara, K., Goldfinger, L.E., Hansen, M., Chou, FL., and Ginsberg, MH. (2003). Ras GTPases: integrin's friends or foes? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 767-776.
- Komatsu, M. and Ruoslahti, E. (2005). R-Ras is a global regulator of vascular regeneration that suppresses intimal hyperplasia and tumor angiogenesis. *Nat. Med.* 11, 1346-1350.
- Koyama, R. and Ikegaya, Y. (2005). To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus. *Neuroscientist* 11, 282-287.
- Kurita, S., Ogita, H., and Takai, Y. (2011). Cooperative role of nectin-nectin and nectin-afadin interactions in formation of nectin-based cell-cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 286, 36297-36303.
- Liddington, RC. and Ginsberg, MH. (2002). Integrin activation takes shape. *J. Cell Biol.* 158, 833-839.
- Lim, ST., Lim, KC., Giuliano, RE., and Federoff, HJ. (2008). Temporal and spatial localization of nectin-1 and l-afadin during synaptogenesis in hippocampal neurons. *J. Comp. Neurol.* 507, 1228-1244.
- López De Jesús, M., Stope, MB., Oude Weernink, PA., Mahlke, Y., Börgermann, C., Ananaba, VN., Rimmbach, C., Roskopf, D., Michel, MC., Jakobs, KH., and Schmidt, M. (2006). Cyclic AMP-dependent and Epac-mediated activation of R-Ras by G protein-coupled receptors leads to phospholipase D stimulation. *J. Biol. Chem.* 281, 21837-21847.
- Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Obaishi, H., Wada, M., Nishioka, H., Itoh, M., Mizoguchi, A., Aoki, T., Fujimoto, T., Matsuda, Y., Tsukita, S., and Takai, Y. (1997). Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. *J. Cell Biol.* 139, 517-528.
- Marler, KJ., Becker-Barroso, E., Martínez, A., Llovera, M., Wentzel, C., Poopalasundaram, S., Hindges, R., Soriano, E., Comella, J., and Drescher, U. (2008). A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis. *J. Neurosci.* 28, 12700-12712.
- Matsumoto, K., Asano, T., and Endo, T. (1997). Novel small GTPase M-Ras participates in reorganization of actin cytoskeleton. *Oncogene* 15, 2409-2417.
- Miyata, M., Ogita, H., Komura, H., Nakata, S., Okamoto, R., Ozaki, M., Majima, T.,

- Matsuzawa, N., Kawano, S., Minami, A., Waseda, M., Fujita, N., Mizutani, K., Rikitake, Y., and Takai, Y. (2009). Localization of nectin-free afadin at the leading edge and its involvement in directional cell movement induced by platelet-derived growth factor. *J. Cell Sci.* 122, 4319-4329.
- Moore, MS. and Blobel, G. (1994). A G protein involved in nucleocytoplasmic transport: the role of Ran. *Trends Biochem Sci.* 19, 211-216.
- O'Donnell, M., Chance, RK., and Bashaw, GJ. (2009). Axon growth and guidance: receptor regulation and signal transduction. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 383-412.
- Oinuma, I., Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2004a). The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. *Science* 305, 862-865.
- Oinuma, I., Katoh, H., and Negishi, M. (2004b). Molecular dissection of the semaphorin 4D receptor plexin-B1-stimulated R-Ras GTPase-activating protein activity and neurite remodeling in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 24, 11473-11480.
- Oinuma, I., Katoh, H., and Negishi, M. (2007). R-Ras controls axon specification upstream of glycogen synthase kinase-3 β through integrin-linked kinase. *J. Biol. Chem.* 282, 303-318.
- Pokutta, S., Drees, F., Takai, Y., Nelson, WJ., and Weis, WI. (2002). Biochemical and structural definition of the α -afadin- and actin-binding sites of α -catenin. *J. Biol. Chem.* 277, 18868-18874.
- Prasad, KN. and Hsie, AW. (1971). Morphologic differentiation of mouse neuroblastoma cells induced in vitro by dibutyl adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Nat. New Biol.* 233, 141-142.
- Radziwill, G., Weiss, A., Heinrich, J., Baumgartner, M., Boissguerin, P., Owada, K., and Moelling, K. (2007). Regulation of c-Src by binding to the PDZ domain of AF-6. *EMBO J.* 26, 2633-2644.
- Reuther, GW. and Der, CJ. (2000). The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 157-165.
- Rodriguez-Viciana, P., Sabatier, C., and McCormick, F. (2004). Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4943-4954.
- Saito, Y., Oinuma, I., Fujimoto, S., and Negishi, M. (2009). Plexin-B1 is a GTPase

- activating protein for M-Ras, remodelling dendrite morphology. *EMBO Rep.* 10, 614-621.
- Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 295-308.
- Schwamborn, JC. and Püschel, AW. (2004). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat. Neurosci.* 7, 923-929.
- Sepúlveda, MR., Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., Mata, AM., and Wuytack, F. (2009). Silencing the SPCA1 (secretory pathway Ca^{2+} -ATPase isoform 1) impairs Ca^{2+} homeostasis in the Golgi and disturbs neural polarity. *J. Neurosci.* 29, 12174-12182.
- Shea, TB., Fischer, I., and Sapirstein, VS. (1985). Effect of retinoic acid on growth and morphological differentiation of mouse NB2a neuroblastoma cells in culture. *Brain Res.* 353, 307-314.
- Soussi-Yanicostas, N., de Castro, F., Julliard, AK., Perfettini, I., Chédotal, A., and Petit, C. (2002). Anosmin-1, defective in the X-linked form of Kallmann syndrome, promotes axonal branch formation from olfactory bulb output neurons. *Cell* 109, 217-228.
- Srivastava, DP., Copits, BA., Xie, Z., Huda, R., Jones, KA., Mukherji, S., Cahill, ME., VanLeeuwen, JE., Woolfrey, KM., Rafalovich, I., Swanson, GT., and Penzes, P. (2012). Afadin is required for maintenance of dendritic structure and excitatory tone. *J. Biol. Chem.* 287, 35964-35974.
- Stenmark, H. and Olkkonen, VM. (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biol.* 2, REVIEWS, 3007.
- Suire, S., Hawkins, P., and Stephens, L. (2002). Activation of phosphoinositide 3-kinase gamma by Ras. *Curr. Biol.* 12, 1068-1075.
- Szebenyi, G., Callaway, JL., Dent, EW., and Kalil, K. (1998). Interstitial branches develop from active regions of the axon demarcated by the primary growth cone during pausing behaviors. *J. Neurosci.* 18, 7930-7940.
- Tachibana, K., Nakanishi, H., Mandai, K., Ozaki, K., Ikeda, W., Yamamoto, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S., and Takai, Y. (2000). Two cell adhesion molecules, nectin and cadherin, interact through their cytoplasmic domain-associated proteins. *J. Cell Biol.* 150, 1161-1176.
- Takahashi, K., Nakanishi, H., Miyahara, M., Mandai, K., Satoh, K., Satoh, A., Nishioka,

- H., Aoki, J., Nomoto, A., Mizoguchi, A., and Takai, Y. (1999). Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. *J. Cell Biol.* *145*, 539-549.
- Takai, Y., Ikeda, W., Ogita, H., and Rikitake, Y. (2008). The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *24*, 309-342.
- Tasaka, G., Negishi, M., and Oinuma, I. (2005). Semaphorin 4D/Plexin-B1-mediated M-Ras GAP activity regulates actin-based dendrite remodeling through Lamellipodin. *J Neurosci.* *32*, 8293-8305
- Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Hori, M., and Kikutani, H. (2005). FARP2 triggers signals for Sema3A-mediated axonal repulsion. *Nat. Neurosci.* *8*, 1712-1719.
- Uesugi, K., Oinuma, I., Katoh, H., and Negishi, M. (2009). Different requirement for Rnd GTPases of R-Ras GAP activity of Plexin-C1 and Plexin-D1. *J. Biol. Chem.* *284*, 6743-6751.
- Xie, Z., Huganir, RL., and Penzes, P. (2005). Activity-dependent dendritic spine structural plasticity is regulated by small GTPase Rap1 and its target AF-6. *Neuron* *48*, 605-618.
- Yates, PA., Roskies, AL., McLaughlin, T., and O'Leary, DD. (2001). Topographic-specific axon branching controlled by ephrin-As is the critical event in retinotectal map development. *J Neurosci.* *21*, 8548-8563.
- Yamada, A., Uesaka, N., Hayano, Y., Tabata, T., Kano, M., and Yamamoto, N. (2010). Role of pre- and postsynaptic activity in thalamocortical axon branching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *107*, 7562-7567.
- Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Tanoue, A., Shooter, EM., and Chan, JR. (2005). Ras activation of a Rac1 exchange factor, Tiam1, mediates neurotrophin-3-induced Schwann cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *102*, 14889-14894.
- Yin, DM., Huang, YH., Zhu, YB., and Wang, Y. (2008). Both the establishment and maintenance of neuronal polarity require the activity of protein kinase D in the Golgi apparatus. *J Neurosci.* *28*, 8832-8843.
- Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K. (2005). GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity.

Cell 120, 137-149.

Zhang, Z., Vuori, K., Wang, H., Reed, J.C., and Ruoslahti, E. (1996). Integrin activation by R-ras. Cell 85, 61-69.

謝辞

本研究の終わりに臨み、本研究の機会を賜り、終始有益な御助言ならびに御指導を賜りました、京都大学大学院 生命科学研究科 生体システム学分野 教授 根岸 学 先生 に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究の全般を通じて懇切なる御指導と的確な御助言を頂いた、京都大学大学院 生命科学研究科 生体システム学分野 准教授 加藤 裕教 先生 に深く感謝いたします。

さらに、本研究の全般を通じて直接の御指導を賜り、常に励まし有益な御助言を頂いた、京都大学 生命科学研究科 生体システム学分野 助教 生沼 泉 先生 に深く感謝いたします。

研究を通じて活発な議論を交わして頂いた、京都大学大学院 生命科学研究科 生体システム学分野の皆様 に深く感謝いたします。

最後に、常に温かく見守り励ましてくれた家族に、心から感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Nariaki Iwasawa, Manabu Negishi, and Izumi Oinuma

R-Ras controls axon branching through afadin in cortical neurons

Molecular Biology of the Cell, 23(14), 2793-2804, 2012