Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

TACE cleaves neogenin to desensitize cortical neurons to the repulsive guidance molecule

岡村，有祐

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2012-09-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲5651
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005651

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

TACE cleaves neogenin to desensitize cortical neurons to the repulsive guidance molecule

TACE は Neogenin を切断することにより皮質ニューロンと軸索再生阻害因子 RGM の反応性を減弱する

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
脳神経外科学
（指導教員：甲村　英二教授）
岡村　有祐

神経軸索は細胞外マトリックスにおいて誘因、反発因子により誘導されている。神経組織に発現する特異的な受容体と結合すると、細胞内シグナルを介して成長円錐の形態変化を引き起こし、同時に神経軸索の伸展方向を調整する。正確な神経ネットワークは、発生期の胎児神経系においてこのようなリガンドと受容体が適切な時期および部位に発現することにより、神経軸索が標的細胞へ正確にガイドされ正しい標的細胞とシナプス結合する事により形成される。

軸索再生阻害蛋白のひとつである RGM はニワトリの網膜視蓋投射において軸索伸長の阻害や成長円錐の虚脱を誘導する GPI アンカー型膜蛋白として発見された。現在では脊椎動物において RGM は RGMa、RGMb、RGMc と 3 種類が認められている。Neogenin は元来、胎生期のニワトリ小脳より DCC ホモログとして発見されていたが、近年 Netrin や軸索再生阻害蛋白 RGM ファミリーの受容体として知られ、神経回路におけるいくつかの重要な形成過程を調整する役割を担っていることも判明している。

RGMa は neogenin と結合することにより神経突起伸長の阻害や、神経成長円錐を虚脱させる作用をもたらすことが知られているが、さらにラット脊髄損傷後に RGMa の発現は増加し、神経軸索伸長を阻害することで運動機能の回復を阻害する。近年、RGMa と neogenin の細胞内シグナル伝達、すなわち RGMa は neogenin と結合することにより、RhoA の活性を抑制し神経突起伸長を阻害することも判明してきた。

今回我々は Yeast two-hybrid 法により neogenin と結合する蛋白として TACE を同定し、この膜貫通型蛋白である TACE が neogenin の細胞外ドメインを切断するすることにより皮質ニューロンと RGMa との反応性を減弱させる結果を得たためこれを報告する。

TACE とは ADAM ファミリーの一つで、人間やマウスの筋肉、精巣、神経組織等、たくさんの組織に発現しており、また胎生期の皮質ニューロンに内因性に発現していることが知られている。

まず、neogenin の細胞外ドメインとリコンビナント TACE を用いて ELISA を行うと、容量依存的に吸光度の上昇を認め、neogenin の細胞外ドメインとリコンビナント TACE が直接結合していることが確認できた。次いで neogenin を形質導入した HEK293T 細胞を用い、培養液内に TACE 投与を行った細胞の培養上清の免疫沈降を施行すると neogenin の細胞外ドメインの増加を認め、さらに TACE の特異的阻害剤である TAPI-1 の投与を行うと増加が認められないため、

neogenin の細胞外ドメインが TACE により切断されることが判明した。さらにラットの胎児皮質ニューロンを使用しリコンビナント TACE にて同様の実験を施行すると neogenin 細胞外ドメインがリコンビナント TACE により切断されていた。

さらに neogenin を形質誘導した HEK293T 細胞およびラットの胎児皮質ニューロンを用いて内因性 TACE を siRNA を用いてノックダウンし、内因性 TACE の neogenin に対する影響を調べると、ノックダウンにより培養上清で回収される neogenin 細胞外ドメインが減少、さらに同様の細胞を用いて、TACE を過剰発現させ実験を行うと、予想通り培養上清に検出される neogenin 細胞外ドメインは増加した。従って、これらの細胞では内因性の TACE にて neogenin が切断されていることが判明した。

次に皮質ニューロンにおいて TACE による neogenin の切断が及ぼす影響を調べるために、神経突起伸長および成長円錐の虚脱について調べた。
まずラット RGMa を発現させた CHO 細胞とラット胎児皮質ニューロンの共培養を行い、TACE および Rho の阻害剤である Y27632 を使用し神経突起伸長を計測した。RGMa による神経突起伸長の阻害作用が Y27632 投与時と同様に TACE の投与によっても打ち消されていた。さらに成長円錐の虚脱については、TACE 投与、TACE の過剰発現および siRNA を用いた TACE ノックダウンそれぞれの実験を行ったが、いずれも TACE により RGMa の成長円錐に対する虚脱作用が打ち消される結果であった。

RGMa の皮質ニューロンに対する軸索再生阻害作用は RGMa が neogenin に結合することで、RhoA の活性化が起こり誘導されることが知られているが、TACE の投与により、この RGMa によるシグナル伝達が打ち消されるかを検討した。
RhoA 活性化の評価については rhotekin を用いた pull down assay にて行った。

ラット胎児皮質ニューロンを用いて TACE および TACE の特異的阻害剤である TAPI-1 投与後の RGMa 刺激による RhoA 活性化を評価すると TACE の投与により RhoA の活性は低下し、TAPI-1 の投与により活性が上昇していた。さらに TACE の過剰発現および TACE を siRNA を用いてノックダウンしたものとそれぞれ検討を行ったが、TACE のノックダウンにより RhoA の活性は増強、過剰発現により活性は低下していた。以上より TACE は neogenin を切断することにより RGMa の neogenin の結合により誘導される細胞内シグナル伝達を抑制し、最終的には RGMa の皮質ニューロンに対する軸索再生阻害作用や成長円錐の虚脱作用を減弱することが証明された。

神戸大学大学院医学研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2287号	氏名	岡村 有祐
論文題目 Title of Dissertation	**TACE cleaves neogenin to desensitize cortical neurons to the repulsive guidance molecule** TACE は Neogenin を切断することにより皮質ニューロンと軸索再生阻害因子 RGM の反応性を減弱する		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 寺島俊雄 印 副 査 Vice-Examiner 平田健一 印 副 査 Vice-Examiner 前川信博 印		
審査終了日	平成 24年8月 22日		

（要旨は１，０００字ー２，０００字程度）

軸索再生阻害蛋白 RGM はニワトリの網膜視蓋投射において軸索伸長の阻害や成長円錐の虚脱を誘導する GPI アンカー型膜蛋白として発見された。現在では脊椎動物において RGM は RGMa、RGMb、RGMc と 3 種類が認められている。Neogenin は元来、胎生期のニワトリ小脳より DCC ホモログとして発見されていたが、軸索再生阻害蛋白 RGM ファミリーの受容体であることが示され、いくつかの神経回路における重要な形成過程を調整する役割を担っている。RGMa は neogenin と結合することにより神経突起伸長の阻害や、神経成長円錐を虚脱させる作用をもたらすことが知られているが、さらにラット脊髄損傷後に RGMa の発現は増加し、神経軸索伸長を阻害することで運動機能の回復を阻害する。近年、RGMa と neogenin の細胞内シグナル伝達、すなわち RGMa は neogenin と結合することにより、RhoA の活性を抑制し神経突起伸長を阻害することも判明してきた。我々は Yeast two-hybrid 法により neogenin と結合する蛋白として TACE (TNF-α converting enzyme) を同定した. TACE とは ADAM ファミリーの一つで、人間やマウスの筋肉、精巣、神経組織等、たくさんの組織に発現しており、また胎生期の皮質ニューロンに内因性に発現していることが知られている。この膜貫通型蛋白である TACE が neogenin の細胞外ドメインを切断することにより皮質ニューロンと RGMa との反応性を減弱させる結果を得た。

まず neogenin の細胞外ドメインとリコンビナント TACE を用いて ELISA を行うと、容量依存的に吸光度の上昇を認め、neogenin の細胞外ドメインとリコンビナント TACE が直接結合していることが確認できた。次いで neogenin を形質導入した HEK293T 細胞を用い、培養液内に TACE 投与を行った細胞の培養上清の免疫沈降を施行すると neogenin の細胞外ドメインの増加を認め、さらに TACE の特異的阻害剤である TAPI-1 の投与を行うと増加が認められないため、neogenin の細胞外ドメインが TACE により切断されることが判明した。さらにラットの胎児皮質ニューロンを使用しリコンビナント TACE にて同様の実験を施行すると neogenin 細胞外ドメインがリコンビナント TACE により切断されていた。さらに neogenin を形質誘導した HEK293T 細胞およびラットの胎児皮質ニューロンを用いて内因性 TACE を siRNA を用いてノックダウンし、内因性 TACE の neogenin に対する影響を調べると、ノックダウンにより培養上清で回収される neogenin 細胞外ドメインが減少、さらに同様の細胞を用いて、TACE を過剰発現させ実験を行うと、予想通り培養上清に検出される neogenin 細胞外ドメインは増加した。従って、これらの細胞では内因性の TACE にて neogenin が切断されていることが判明した。

次に皮質ニューロンにおいて TACE による neogenin の切断が及ぼす影響を調べるために、神経突起伸長および成長円錐の虚脱について調べた。まずラット RGMa を発現させた CHO 細胞とラット胎児皮質ニューロンの共培養を行い、TACE および Rho の阻害剤である Y27632 を使用し神経突起伸長を計測した。RGMa による神経突起伸長の阻害作用が Y27632 投与時と同様に TACE の投

与によっても打ち消されていた。さらに成長円錐の虚脱については、TACE 投与、TACE の過剰発現および siRNA を用いた TACE ノックダウンそれぞれの実験を行ったが、いずれも TACE により RGMa の成長円錐に対する虚脱作用が打ち消される結果であった。

RGMa の皮質ニューロンに対する軸索再生阻害作用は RGMa が neogenin に結合することで、RhoA の活性化が起こり誘導されることが知られているが、TACE の投与により、この RGMa によるシグナル伝達が打ち消されるかを検討した。RhoA 活性化の評価については rhotekin を用いた pull down assay にて行った。ラット胎児皮質ニューロンを用いて TACE および TACE の特異的阻害剤である TAPI-1 投与後の RGMa 刺激による RhoA 活性化を評価すると TACE の投与により RhoA の活性は低下し、TAPI-1 の投与により活性が上昇していた。さらに TACE の過剰発現および TACE を siRNA を用いてノックダウンしたものとそれぞれ検討を行ったが、TACE のノックダウンにより RhoA の活性は増強、過剰発現により活性は低下していた。

以上より TACE は neogenin を切断することにより RGMa の neogenin の結合により誘導される細胞内シグナル伝達を抑制し、最終的には RGMa の皮質ニューロンに対する軸索再生阻害作用や成長円錐の虚脱作用を減弱することが証明された。本研究は，膜貫通型蛋白である TACE が neogenin の細胞外ドメインを切断することにより皮質ニューロンと RGMa との反応性を減弱させることを証明したもので、神経再生と神経回路形成の抑制的調節機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。