

京都大学	博士（医学）	氏名	豊田 洋輔
論文題目	<p>EphA4-dependent axon retraction and midline localization of Ephrin-B3 are disrupted in the spinal cord of mice lacking mDia1 and mDia3 in combination (mDia1 と mDia3 の両方を欠損させたマウスでは EphA4 による神経軸索の退縮と脊髄での Ephrin-B3 の正中線局在が損なわれる)</p>		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>神経回路が正常に形成されるには神経突起伸展における適切なガイダンスが必要である。この際、誘引性あるいは反発性をもつ種々の軸索ガイダンス分子が軸索先端部の成長円錐に作用することにより、時空間特異的に細胞骨格の再編成が誘引される。低分子量 G 蛋白質 Rho はアクチン線維の主な制御因子であり、ROCK や mDia などの下流エフェクター分子との結合を介して機能を発揮する。これまでの研究により Rho は様々な細胞でアクチン線維の再編成や、反発性軸索ガイダンス因子による軸索の退縮に寄与していることが知られている。しかしながら、神経発生において mDia がどのように軸索ガイダンスに関連しているかは分かっていない。mDia は Rho により制御されるアクチン重合因子で、mDia1、mDia2、mDia3 の3つのアイソフォームから成る。このうち mDia1 と mDia3 がマウスの脳内に発現している。mDia1 および mDia3 単独欠損マウスでは神経系には顕著な異常は認められないことから、mDia1 と mDia3 の二重欠損マウスを作出した。本研究では、成熟した mDia1 と mDia3 の二重欠損マウスが左右の両足を揃えて歩く rabbit-like 歩行を呈することを見出した。反発性軸索ガイダンス分子である Ephrin-B3 やその受容体 EphA4 の遺伝子欠損マウスでも同様の rabbit-like 歩行が報告されていることから、歩行制御を担う脊髄介在神経細胞や皮質脊髄神経細胞での EphA による軸索反発作用における mDia の役割を解析した。まず、新生仔脊髄の片側腹側に蛍光トレーサーを注入し、脊髄介在神経細胞の軸索を標識したところ、mDia1/3 二重欠損マウスでは脊髄正中線を異常に交叉する軸索が観察された。同様に、成体の大脳皮質へのトレーサー注入により皮質脊髄線維を標識したところ、mDia1/3 二重欠損マウスでは脊髄正中線を異常に交叉する軸索が観察された。次に、mDia の EphA による軸索退縮への関与を調べるために、初代培養神経細胞を用い、EphA リガンドに対する応答性をライブイメージングと免疫染色により解析した。野生型の神経細胞では、EphA 活性化により、成長円錐の膜波打ち静止と、それに引き続いて軸索退縮が誘導される。一方、mDia1/3 二重欠損神経細胞では、成長円錐の膜波打ち静止は起こるものの、軸索退縮は起こらず、Ephrin による軸索退縮における mDia の関与が示された。同時に、mDia1/3 二重欠損マウスの脊髄では、通常正中線に沿って局在する Ephrin-B3 の一部が消失しており、この異常に合致して、脊髄形成の初期に神経上皮の破綻と脳室周囲異形成が起こることも見出した。</p> <p>以上の結果より、Rho エフェクター分子 mDia は、EphA による軸索退縮や EphrinB3 の脊髄正中線における局在化に関与し、軸索ガイダンスや左右協調性の歩行制御に寄与することが示された。</p>			

<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>神経回路の正常な形成には軸索ガイダンス分子による成長円錐での細胞骨格制御が必要であるが、その詳細な分子機序は不明である。mDiaは低分子量G蛋白質Rhoにより制御されるアクチン重合因子であり、脳内にはmDia1とmDia3の二つのアイソフォームが発現する。本研究ではmDia1とmDia3の二重欠損マウス(mDia-DKOマウス)を用いて、神経回路形成におけるmDiaの役割を解析した。mDia-DKOマウスでは、歩行時の左右の四肢の協調運動に異常が観察された。歩行制御に関わる脊髄介在神経細胞や皮質脊髄路神経細胞の軸索投射を蛍光トレーサーにより調べたところ、mDia-DKOマウスでは脊髄正中線を越える異常な軸索投射を認めた。反発性ガイダンス分子であるEphrin-B3やその受容体EphA4の欠損でも同様の異常が誘導されることから、EphAを介した軸索退縮におけるmDiaの役割を解析した。野生型の初代培養神経細胞ではEphAリガンドにより成長円錐の膜波打ちの静止とそれに続く軸索退縮が観察された。一方mDia-DKOの神経細胞では、EphA刺激により膜波打ちは静止するが、軸索退縮は起こらなかった。また、mDia-DKOマウスでは正中線に沿ったEphrin-B3の発現が一部消失しており、この異常に合致して、脊髄形成の初期に神経上皮の破綻と脳室周囲異形成が起こることも見出した。以上の結果から、mDiaはEphAを介した軸索退縮と脊髄正中線におけるEphrin-B3の局在に関与し、軸索ガイダンスや歩行時の左右協調性に寄与することが示された。</p> <p>以上の研究は神経回路形成を担う細胞骨格制御の解明に貢献し、神経発生学に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は平成26年1月31日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
