

氏名	あおきじゅんこ 青木純子
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第520号
学位授与の日付	平成15年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	低分子量Gタンパク質Rhoファミリーによる神経細胞の形態調節機構の研究
論文調査委員	(主査) 教授 根岸 学 教授 市川 厚 教授 川寄敏祐

論文内容の要旨

脳がその機能を発揮するには、神経細胞がシナプスを介して互いに結合し、複雑な神経回路を形成することが必要である。この神経回路の形成には、神経細胞の神経突起の伸長・退縮が必須のステップである。神経突起の伸長・退縮の調節にはRhoファミリーの低分子量Gタンパク質が深く関与していることが知られている。RhoファミリーのGタンパク質は、細胞骨格の調節因子であり、Rhoファミリーの中でも主にRho, Rac, Cdc42について、その機能が詳しく解析されている。神経細胞においては、Rhoは神経突起の退縮を引き起こし、内在性のRhoの活性を抑制すると神経突起の伸長が起こる。一方、RacとCdc42は神経突起の伸長に関与していることが知られている。これらRhoファミリーのGタンパク質の情報伝達経路にかかわる分子の変異が精神遅滞などの重度の神経疾患を引き起こすことが知られており、RhoファミリーのGタンパク質が神経回路形成に重要な役割を担っているものと考えられる。RhoファミリーのGタンパク質を介する細胞内情報伝達経路を解明することは、神経回路形成のメカニズムを明らかにするためにも重要である。私は、Rhoファミリーの中でも代表的なタンパク質であるRhoと、そのRhoに対して抑制的にはたらくとされるRnd1に注目し、神経細胞の形態に対する作用とその分子機構を解析した。

第一章 Rhoを介した神経突起退縮機構

Rhoは、LPA受容体、プロスタグランジンEP3受容体などの、細胞膜に存在する7回膜貫通型受容体のアゴニスト刺激により活性化されて、神経突起の退縮を引き起こす。しかし、このような受容体からRho活性化を介して神経突起の退縮に至る経路において、Rhoの上流および下流でどのような分子が働いているのかはほとんどわがっていなかった。そこで、この経路について、Rhoの下流ではたらくエフェクターと、Rhoの上流で受容体が共役している三量体Gタンパク質を調べた。

(1) Rhoの下流のエフェクターの同定

Rhoは、その下流に位置するエフェクターを活性化してシグナルを伝達する。そこで、Rhoによる神経突起の退縮を起こすエフェクターについて検討した。これまでにRhoのエフェクターが多数見出されているが、その中で、Rho-kinaseはアクチン細胞骨格を調節していることが知られている。Rho-kinaseの常時活性型を神経細胞に導入すると神経突起の退縮が起きた。また、EP3受容体のアゴニスト刺激による神経突起の退縮はRho-kinaseのドミナントネガティブ体によって抑制された。これらのことより、RhoはRho-kinaseの活性化を介して神経突起の退縮を引き起こしていることがわかった。

(2) Rhoを活性化する上流の情報伝達系

次に、EP3受容体が共役する三量体Gタンパク質について検討した。様々な三量体Gタンパク質のうち、Gaq, Gal12, Gal13がそれぞれ別個の経路を介してRhoを活性化した。また、これらのGタンパク質のうち、EP3はGal13に特異的に共役してRhoを活性化し神経突起の退縮を引き起こすことが明らかとなった。

これらの結果より、細胞膜に存在する受容体 EP3 → Gα13 → Rho → Rho-kinase という新しい情報伝達経路が、神経突起の退縮を引き起こすことが明らかとなった。

第二章 新規 Rho ファミリー G タンパク質 Rnd1 の神経細胞における機能

Rho ファミリーの中で新しくクローニングされた Rnd1 は、線維芽細胞において Rho のシグナル伝達経路を抑制することがわかっている。また、Rnd1 は脳に特に多く発現していることより、Rnd1 も Rho ファミリーのほかの G タンパク質と同様に、神経細胞の形態調節作用を持っているのではないかと考えられた。そこで、Rnd1 の神経細胞の形態に対する作用とその機構を調べた。

(1) Rnd1 による神経突起形成とその分子機構

Rnd1 を神経細胞に発現させると、Rnd1 は細胞膜に局在し、非常に細い多数の神経突起の形成を引き起こした。通常、細胞辺縁部には F-アクチンでできた cortical actin filament がバリアとしてはたらき、突起形成を抑制しているが、Rnd1 はこの cortical actin filament を消失させて突起形成を引き起こした。このことは、アクチン重合阻害剤である cytochalasinD 処理による cortical actin filament の解体で、細い多数の突起が形成され、Rnd1 の作用が再現されたことにより強く示唆された。

(2) Rnd1 による Rho シグナル伝達経路の抑制

神経細胞において Rho を抑制すると cortical actin filament が消失して神経突起の形成が起きること、また、線維芽細胞で Rnd1 が Rho の経路を抑制することより、神経細胞における Rnd1 による突起形成は、Rho の経路を抑制することによるものではないかと考えられた。Rho を活性化する経路として、Gα13 → RhoGEF → Rho という経路がよく知られている。そこで、Rnd1 がこの経路のどこに作用して Rho の作用を抑制するかを、GTP 結合型 Rho の量を測定し、検討した。その結果、Rnd1 は Gα13 による Rho の活性化を抑制したが、RhoGEF による Rho の活性化は抑制しなかった。このことより、Rnd1 による Rho の活性抑制の作用点は、Gα13 → RhoGEF → Rho という経路において Gα13 と RhoGEF の間であることが明らかとなった。

これらのことより、Rnd1 は、神経細胞において細い多数の神経突起の形成を引き起こすはたらきがあり、この Rnd1 による神経突起形成は、Rho の抑制を通して細胞辺縁部の cortical actin filament を解体することによるものであると考えられる。また、Rnd1 による Rho シグナル伝達経路の抑制点志 Gα13 と RhoGEF の間に位置する。

以上本研究は、これまで不明な点が多かった Rho ファミリーによる神経突起形成の制御機構を明らかにしたものであり、神経回路形成のメカニズムの解明という、神経科学の重要な課題に迫ることができる。そして、神経回路形成の機構の解明は、脳組織の再生や重度の神経障害などに対する困難な治療法の確立への道を切り開くのに大きな役割を果たすと期待される。

論文審査の結果の要旨

Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質は、細胞骨格の制御などを介して多彩な生理機能を調節する重要な分子である。近年、Rho ファミリー G 蛋白質が神経細胞の突起形成において重要な役割をしていることが明らかとなり、その分子機構の研究が進められている。Rho ファミリーの中で、特に RhoA, Rac1, Cdc42 は非常によく研究され、RhoA は神経突起退縮や突起形成の阻害を、Rac1 と Cdc42 は神経成長円錐の伸展や神経突起伸長に深く関わっていることが明らかとなった。しかし、どのような機構で Rho ファミリー G 蛋白質の機能が調節されているのか、また、他の多くの Rho ファミリー G 蛋白質の機能についてはほとんど解明されていない。本論文は、RhoA による神経突起退縮作用の情報伝達経路と脳神経系に主に発現している新規の Rho ファミリー G 蛋白質、Rnd1 の神経機能を分子レベルで研究したものであり、神経突起形成における Rho ファミリーの役割を解明したものである。

第一章では、RhoA を活性化するプロスタグランジン受容体の 1 つ、EP3 受容体による RhoA を介した神経突起退縮作用の情報伝達経路の解析に関する研究である。RhoA は三量体 G 蛋白質の中で、G12, G13, Gq によりそれぞれ異なる経路で活性化され、神経突起の退縮を引き起こす。EP3 受容体がどの経路を介するかを検討した結果、G13 に特異的に共役し、RhoA を活性化することがわかった。また、G13 による RhoGEF を介した RhoA の活性化と、RhoA が Rho-キナー

ゼを介した神経突起退縮にはそれぞれ異なる 2 種類のチロシンキナーゼの活性が必要であることがわかった。これらのことから、EP3 受容体-G13-RhoA-Rho キナーゼという新しい情報伝達経路により神経突起の退縮が制御されていることが明らかとなった。

第二章では、中枢神経系に主に発現していてその神経機能が全く不明な Rho ファミリー G 蛋白質, Rnd1 の神経機能を解析したものである。Rnd1 は常時活性化型で繊維芽細胞や上皮細胞において RhoA のシグナルを抑制することが知られている。Rnd1 を PC12 細胞に発現させると、短くて細い多数の神経突起の形成を引き起こした。この作用は、細胞膜周辺にある cortical actin filament を消失させることによるものであり、RhoA の活性を抑制する C3 酵素によっても同様の結果が得られた。このことから、cortical actin filament が細胞膜からの神経突起形成を阻害しており、これを崩壊させることにより、突起が形成されることが推察される。さらに、Rnd1 による Rho シグナルの抑制機構を検討した結果、Rnd1 は G13 と RhoGEF の結合を阻害することにより抑制することがわかった。

以上本研究は、神経突起形成の調節における RhoA と脳神経系の主要な G 蛋白質, Rnd1 の神経機能を明らかにしたものであり、Rho ファミリーの神経機能のメカニズムの解明に寄与するものと思われる。よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成15年2月24日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。