

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	阿部 遥
論文題目	転写因子 Etv1/Er81 による神経活動依存的な小脳顆粒細胞の成熟機構の解明		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>神経細胞は分裂・増殖、移動、分化、成熟の発生段階を経て神経回路を構築し、様々な脳機能を獲得する。これまで、分裂、移動、分化の制御機構については多くの報告があるが、発生の最終段階である成熟の制御機構はほとんど明らかになっていない。成熟段階、すなわち生後早期において、静止膜電位が脱分極状態から過分極状態へと大きく変化することが、小脳顆粒細胞や外側膝状核神経細胞、大脳皮質第 1 層神経細胞を始め多くの神経細胞で報告されている。静止膜電位の変化は、神経細胞の興奮性に大きな影響を与えるため、小脳顆粒細胞、外側膝状核神経細胞、大脳皮質第 1 層神経細胞を始め多くの神経細胞では、神経活動依存的な成熟制御機構が共通して存在する可能性が考えられる。</p> <p>小脳顆粒細胞は生後早期に、静止膜電位を始めとして多くの性質を劇的に変化させながら成熟し、その後小脳回路に組み込まれる。この生後早期の時期に、小脳顆粒細胞は活動電位を起こし始めることが報告されている。静止膜電位の変化は、顆粒細胞の神経伝達物質に対する応答性を高め、効率よく発火させるという役割を担っていると考えられる。</p> <p>以上の背景から、申請者は次の 2 つの課題を解明することを目的として本研究を始めた。1) 多くの神経細胞に共通して見られる静止膜電位の変化は神経細胞の成熟にどのように関与しているのか? 2) 神経細胞の成熟を制御する分子は何か?</p> <p>活動電位と成熟との関係を明らかにするために、申請者は小脳顆粒細胞の初代培養系に電位依存性 Na^+チャンネル阻害剤を添加し成熟遺伝子の発現量を定量したところ、成熟遺伝子の発現量が顕著に減少した。すなわち、小脳顆粒細胞の成熟は神経活動依的に制御されていることが明らかになった。また、グルタミン酸受容体阻害剤の添加、電位依存性 Ca^{2+}チャンネル阻害剤の添加、siRNA による電位依存性 Na^+チャンネル Nav1.2 のノックダウンのいずれにおいても成熟遺伝子の発現量は顕著に減少した。以上の結果から、グルタミン酸受容体の活性化\RightarrowNav1.2 チャンネルを介した活動電位の発生\Rightarrow電位依存性 Ca^{2+}チャンネルからの Ca^{2+}流入、という一連のシグナル経路が顆粒細胞の成熟を制御していることが明らかになった。</p> <p>申請者らは、転写因子 Etv1/Er81 が小脳顆粒細胞の成熟の時期に発現量が顕著に増加することを既に報告している。そこで申請者は、Etv1 が成熟に関与するかを検証するために、初代培養系で Etv1 をノックダウンした。その結果、成熟遺伝子の発現量が顕著に減少した。ここで、電位依存性 Na^+チャンネル阻害剤による成熟遺伝子発現量の減少分と、Etv1 ノックダウンによる成熟遺伝子発現量の減少分を比較したところ、互いに非常に強い相関関係にあることが明らかになった。すなわち、Na^+チャンネルによる活動電位発生と Etv1 による成熟遺伝子の制御は、同じシグナル経路上の現象であることが示唆された。また、申請者は、Etv1 が成熟遺伝子のプロモーターを Etv1 結合モチーフを介して活性化することを明らかにした。さらに申請者は、生後の小脳サンプルを用いて、Etv1 が小脳顆粒細胞の代表的な成熟遺伝子である NR2C と $\text{GABA}_A\text{R}\alpha 6$ のプロモーターに直接結合することを明らかにした。次に、生体内で Etv1 の機能を検証するために、生体内電気穿孔法を用いて生体内の小脳顆粒細胞で Etv1 をノックダウンしたところ、小脳顆粒細胞の形態はほとんど変化しなかったが、成熟遺伝子の発現量は顕著に減少していた。以上の結果より、Etv1 は小脳顆粒細胞の神経活動依存的な成熟プログラムを制御し、小脳顆粒細胞特異的な性質を獲得させる制御因子であることが示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

神経細胞の成熟段階、すなわち生後早期において、静止膜電位が脱分極状態から過分極状態へと大きく変化することが、小脳顆粒細胞や外側膝状核神経細胞、大脳皮質第1層神経細胞を始め多くの神経細胞で報告されている。また、成熟に伴う静止膜電位の変化が起きるとほぼ同時期に、神経細胞の活動電位の頻度が顕著に増加することも報告されている。しかしながら、静止膜電位の変化や活動電位の頻度がどのように成熟に関与しているのかはほとんど明らかになっていない。本論文では、

1) 多くの神経細胞に共通して見られる静止膜電位の変化は神経細胞の成熟にどのように関与しているのか？

2) 神経細胞の成熟を制御する分子は何か？

という2つの課題を設け、小脳顆粒細胞をモデル系として以下の点を明らかにした。

a) 顆粒細胞初代培養(低カリウム培養)で Ca^{2+} イメージングを行った結果、低カリウム培養では活動電位に応答した Ca^{2+} スパイクが観察された。この時、 Na^+ チャンネル阻害剤であるテトロドトキシン(TTX)やNMDA受容体およびAMPA受容体阻害剤(それぞれCPP、NBQX)を同時に添加するとこの Ca^{2+} スパイクがほとんど起こらなくなった。

b) TTX添加により活動電位を阻害したサンプルで成熟遺伝子の発現をマイクロアレイで解析した結果、申請者が以前に報告した全ての小脳顆粒細胞の成熟遺伝子(以下成熟遺伝子)の発現がTTXにより顕著に減少した。

c) 低カリウム培養時に、活動電位を阻害するためにTTX添加、CPP+NBQX添加、 Na^+ チャンネルであるNav1.2ノックダウン、および活動電位に伴う Ca^{2+} 流入を阻害するために Ca^{2+} チャンネル阻害剤を添加した結果、いずれの処理においてもすべての成熟遺伝子の発現が顕著に減少した。

d) TTX添加、CPP+NBQX添加、Nav1.2ノックダウン、 Ca^{2+} チャンネル阻害剤添加時による成熟遺伝子の発現減少の程度を比較した結果、各処理で強い相関関係が認められた。

e) 申請者の属する研究室で以前に同定された、小脳で発達とともに発現上昇する転写Etv1をノックダウンした結果、成熟遺伝子の発現が顕著に減少した。また、TTX添加およびEtv1ノックダウンによる成熟遺伝子の発現量の減少には、強い相関関係が認められた。

f) Etv1と成熟遺伝子プロモーターを用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果、Etv1は成熟遺伝子のプロモーター活性を上昇させた。

g) 生体小脳サンプルでEtv1抗体を用いてChIPアッセイを行った結果、Etv1は成熟遺伝子プロモーターに直接結合していた。

h) *In vivo* electroporation法を用いて生体内でEtv1をノックダウンした結果、顆粒細胞の形態的な成熟にはほとんど影響しなかったが、顆粒細胞の成熟遺伝子の発現は顕著に減少した。

以上のa)~d)の結果は、課題1)に対して「グルタミン酸受容体活性化→ Na^+ チャンネルNav1.2による活動電位発生→電位依存性 Ca^{2+} チャンネルからの Ca^{2+} 流入」が成熟遺伝子発現を制御する一連のシグナル経路を構築していることを明らかにし、一方、e)~h)の結果は、課題2)に対して、転写因子Etv1が成熟遺伝子のactivity-dependentな発現を統一的に制御することを明らかにした。

以上、本論文は、多くの神経細胞で共通に見られる静止膜電位の変化という現象が活動電位を誘導して神経細胞の成熟を促進するという、神経細胞の成熟制御機構に対し極めて重要な知見を提供したものとして、博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成23年8月4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。