

氏名	かとうひろのり 加藤裕教
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論葉博第 629 号
学位授与の日付	平成 12 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	神経細胞における低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho を介した機能及びその作用機序に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 根岸 学 教授 川 寄 敏 祐 教授 市 川 厚

論 文 内 容 の 要 旨

低分子量 GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) の Rho は、細胞外からの刺激により活性化されると、主にアクチン系の細胞骨格を制御し、種々の細胞においてその形態形成や運動などに重要な役割を担っていることが知られている。一方神経細胞においては、Rho が活性化されると成長円錐の消失と共に長く伸長された神経突起の速やかな退縮が見られ、また Rho が神経細胞間のネットワークの形成において重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。ところが、Rho がどのようなメカニズムで神経突起の形成を制御しているかは不明であった。そこで著者は、Rho を介した神経突起の退縮作用においてその作用機序を明らかにすることが、神経回路網の形成における Rho の役割及びそのメカニズムの解明につながると考え、神経細胞のモデル細胞として広く使われている PC12 細胞を用いて解析を行った。

第一章 p160 RhoA-binding kinase ROK α による神経突起の退縮

近年、GTP 結合型すなわち活性型の Rho と直接結合するエフェクターが幾つか報告され、その中のセリン・トレオニンキナーゼである ROK α がミオシンのリン酸化を制御していることが明らかとなった。そこで著者は ROK α が Rho の下流において神経突起の退縮に関与しているかを検討するため、ROK α の常時活性体、及び dominant negative 体として働く変異体を作製し、これらを神経成長因子 nerve growth factor (NGF) によって神経突起を伸長させた PC12 細胞の細胞内に導入することによってその後の形態変化を観察した。その結果、ROK α の常時活性体を導入した細胞において、30 分以内に成長円錐の消失と共に神経突起の退縮が起これ、この作用は Rho を特異的に不活性化する C3 酵素存在下でも見られた。また ROK α のキナーゼ部位に変異を加え、キナーゼ活性を欠失させた変異体では、形態変化は全く見られなかった。一方、ROK α の dominant negative 体を細胞内に導入したところ、三量体 G 蛋白質共役型受容体であるプロスタグランジン EP3 受容体による成長円錐の消失と神経突起の退縮は完全に抑制された。以上の結果から、ROK α は Rho の下流において神経突起の退縮に関与しており、ROK α が活性化されるとおそらくミオシンのリン酸化を制御して、神経突起の退縮を引き起こすものと考えられる。

第二章 三量体 G 蛋白質 G α_{12} 、G α_1^2 、及び G α_q による Rho を介した神経突起の退縮

神経細胞においてある種の三量体 G 蛋白質共役型受容体を活性化させると、Rho を介した神経突起の退縮作用が引き起こされることが知られている。ところが、これらの受容体がどの三量体 G 蛋白質を介して Rho を活性化し、神経突起の退縮を引き起こすかに関しては全く不明であった。そこで著者は、様々な三量体 G 蛋白質 α サブユニットの GTPase 活性を欠失させた常時活性型変異体を作製し、これらを NGF で分化させた PC12 細胞に発現させることにより検討を行った。その結果、常時活性型 G α_{12} 、G α_{13} 、及び G α_q をそれぞれ発現させることにより成長円錐の消失と神経突起の退縮が見られ、これらはすべて Rho を不活性化する C3 酵素により完全に抑制された。ところが、G α_{13} 及び G α_q による神経突起の退縮はチロシンキナーゼ阻害剤である tyrphostin A25 により抑制されたが、G α_{12} による神経突起の退縮は抑制されなかった。一方、G α_q による神経突起の退縮は、細胞外 Ca $^{2+}$ の除去、及びプロテインキナーゼ C の阻害剤により抑制されたが、G α_{12} あるいは G α_{13} による退縮はプロテインキナーゼ C の活性化及び細胞外 Ca $^{2+}$ を必要としなかった。以上の結果から、G α_{12} 、

$G\alpha_{13}$, 及び $G\alpha_q$ はそれぞれ異なる情報伝達経路を介して 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。

第三章 プロスタグランジン EP3 受容体による Rho を介した神経突起の退縮

プロスタグランジン E (PGE) 受容体 EP3 サブタイプは, PGE 受容体の神経系における主要なサブタイプであり, PGE_2 の神経系における作用発現に重要な役割を担っていると考えられるが, その役割及び作用機構の詳細な解析は行われていない。そこで著者は, EP3 受容体の神経細胞における作用メカニズムを解明する目的で, EP3 受容体を安定に発現させた PC12 細胞を樹立し, その細胞を用いて解析を行った。その結果, EP3 受容体を安定に発現させた PC12 細胞を NGF で分化させたのち, EP3 受容体のアゴニストである M & B28767 で処理すると, 成長円錐の消失と共に伸長した神経突起の退縮が見られ, この作用は Rho を不活性化する C3 酵素により完全に抑制された。また, EP3 受容体による神経突起の退縮は, 百日咳毒素, 細胞外 Ca^{2+} の除去, 及びプロテインキナーゼ C の不活性化によって阻害されなかったが, チロシンキナーゼ阻害剤である tyrphostin A25 により EP3 受容体による神経突起の退縮は抑制された。これらの結果は第二章の結果とあわせると, EP3 受容体は神経系において $G\alpha_{13}$ と共役して Rho を活性化し, 神経突起の退縮を引き起こしていると考えられる。

以上本研究は, 神経細胞における Rho を介した神経突起退縮作用について, その上流及び下流の情報伝達経路を明らかにしたものであり, 複雑な神経回路網の形成における Rho の役割及びそのメカニズムの解明に寄与するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

低分子量 G 蛋白質 Rho は, テクチン系の細胞骨格を制御し, 神経細胞において, Rho が活性化されると成長円錐の消失と共に長く伸長された神経突起の速やかな退縮が見られ, また, Rho が神経細胞間のネットワークの形成において重要な役割をになっていることが明らかになりつつあるが, その分子レベルでの機構は全く不明であった。本論文は, 神経回路網の形成における Rho の役割を明らかにするため, Rho を介した神経突起の退縮作用の分子レベルでのメカニズムを解明したものである。

第一章では, Rho の下流に存在し, Rho による神経突起退縮に関わるエフェクター分子を解析し, ミオシンの磷酸化を制御することが知られているセリン・スレオニンキナーゼの $ROK\alpha$ が神経突起の退縮に関与していることを明らかにした。更に, $ROK\alpha$ の活性型のみで突起退縮が引き起こされ, 神経突起退縮には Rho による $ROK\alpha$ の活性化のみで十分であることが分かった。このことから, $ROK\alpha$ は Rho の下流において活性化されると, おそらくミオシンの磷酸化を制御して, 神経突起の退縮を引き起こすものと推定した。

第二章では, ある種の三量体 G 蛋白質共役型受容体が Rho を介して神経突起の退縮を引き起こすが, Rho の上流に存在し, 受容体からのシグナルを受けて Rho を活性化する三量体 G 蛋白質の種類とその活性化経路を明らかにした。種々の三量体 G 蛋白質の中で, G_{12} , G_{13} 及び G_q の三種類のみが Rho を活性化し, 神経突起の退縮を引き起こすことを示した。また, これら三種類の G 蛋白質による Rho 活性化経路は異なり, G_{13} はチロシンキナーゼの活性化を介して, G_{12} はチロシンキナーゼを必要とせず, G_q は C キナーゼの活性化を介して Rho を活性化することを明らかにした。

第三章では, プロスタグランジン E (PGE) 受容体, EP3 サブタイプが従来知られていた G_i を介したアデニル酸シクラーゼの抑制系ではなく, 別の経路で神経突起の退縮を引き起こすことを明らかにした。EP3 受容体は, 上述した Rho を活性化できる 3 種類の三量体 G 蛋白質うち, G_{13} に特異的に共役し, Rho- $ROK\alpha$ の系を介して神経突起の退縮を引き起こすことを見いだした。このことは, EP3 受容体は従来の G_i との共役を介した神経機能に加えて, 全く新しい情報伝達経路である G_{13} -Rho- $ROK\alpha$ の系路を介して神経細胞の形態調節を行っている可能性を示唆するものである。

以上, 著者は, 神経細胞における Rho を介した神経突起退縮作用について, その上流及び下流の情報伝達経路を明らかにしたものであり, 複雑な神経回路網の形成における Rho の役割及びそのメカニズムの解明に寄与するものと考えられる。

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12年4月13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。