

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	いぬつか あゆむ 犬 束 歩
学位（専攻分野）	博 士 （ 理 学 ）
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 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	理学研究科 生物科学 専攻
（学位論文題目） カリキュリンAが誘導する神経突起縮退の解析	
論 文 調 査 委 員	（主査） 藤吉 好則 教授 平野 丈夫 教授 七田 芳則 教授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	犬束 歩
論文題目	カリキュリンAが誘導する神経突起縮退の解析		
(論文内容の要旨)			
神経回路網の形成制御過程で、アクチンフィラメントや微小管などの細胞骨格がダイナミックにその構造を変化させる機構の一つとして、calyculin A (CL-A)による制御機構を研究した。CL-Aは海綿の一種 <i>Discodermia calyx</i> から分離・精製されたプロテインホスファターゼ PP1, PP2A の強力な阻害剤であり、PP1 に属するミオシンホスファターゼを阻害することによりアクトミオシンの活性化をもたらすことが良く知られている。しかし、神経細胞においては微小管関連タンパク質である Tau のリン酸化を介して微小管脱重合を引き起こす、との報告もなされていた。 この神経突起縮退現象における細胞骨格のダイナミクスを、特殊な偏光顕微鏡である LC-PolScope を用いたライブイメージングにより研究した結果、CL-A によって引き起こされる神経突起の縮退過程において、微小管がその重合状態を保ったまま、細胞中心方向へ移動していくことを明らかにした。さらに、微小管の脱重合剤や重合促進剤は CL-A による神経突起の縮退に有意な影響を及ぼさないことも解明した。これらの観察結果は、これまでの報告とは異なり、CL-A による神経突起の縮退が微小管脱重合に依存していないことを示唆している。さらに、アクチンフィラメントの脱重合剤やミオシン II の選択的阻害剤により CL-A による神経突起の縮退が非常に強く阻害されたので、アクトミオシンの活性化がこの縮退にとって必須であることを示す結果を得た。 リン酸化抗体を用いた免疫染色およびウェスタンブロッティングでは、モーター活性の制御に関わることが知られているミオシン軽鎖の Ser19, Thr18 のリン酸化レベルが、CL-A 処理によって大きく上昇していることを確認した。広範なキナーゼ阻害剤である Staurosporine には、この二リン酸化を抑える効果がみられ、CL-A による神経突起縮退を弱める効果も確認された。 以上の実験結果から、CL-A による神経突起縮退における微小管の再編成はアクトミオシンの収縮により引き起こされており、神経突起の生理的な縮退過程においてもこのような機構が制御された形で利用されている可能性を示唆する結果を得た。CL-A による縮退効果の大きさは、ミオシン軽鎖の Ser19 残基と Thr18 残基への二リン酸化がアクトミオシン活性化へ大きく関与していることを示している。また、細胞膜を残した細胞骨格の縮退は、生理的な神経突起の縮退において細胞骨格系だけでなく膜の供給と分解が大きな要素として関与していることも示している。			

(論文審査の結果の要旨)

神経細胞では、その神経突起が各種ガイダンス分子により誘引・反発されることで適切な伸長経路が選択されて、制御された形で神経回路網が形成される。この制御過程では、アクチンフィラメントや微小管などの細胞骨格がダイナミックにその構造を変化させることが鍵となっており、これら細胞骨格分子は互いに影響を及ぼしあっていると考えられる。しかし、これらの制御機構については、未知の部分が多く残されている。

申請者は、海綿の一種 *Discodermia calyx* から分離・精製されたプロテインホスファターゼ PP1, PP2A の強力な阻害剤であり、急速な神経突起の縮退を引き起こすことが報告されている calyculin A (CL-A) を用いて神経細胞の縮退機構の研究を行った。CL-A は PP1 に属するミオシンホスファターゼを阻害することによりアクトミオシンの活性化をもたらすことが良く知られている。神経細胞においては微小管関連タンパク質である Tau のリン酸化を介して微小管脱重合を引き起こす、との報告もなされていた。しかし、申請者は特殊な偏光顕微鏡である LC-PolScope を用いたライブイメージングにより、CL-A によって引き起こされる神経突起の縮退過程において、微小管がその重合状態を保ったまま、細胞中心方向へ移動していくことを観察し、微小管の脱重合剤や重合促進剤は CL-A による神経突起の縮退に有意な影響を及ぼさないことを解明した。これらの観察結果は、CL-A による微小管脱重合が神経突起の縮退を中心的に制御しているわけではないことを示した。さらに、アクチンフィラメントの脱重合剤やミオシン II の選択的阻害剤により CL-A による神経突起の縮退が非常に強く阻害されることも示した。それゆえ、これらの結果から、アクトミオシンの活性化がこの縮退にとって必須であることを示唆した。さらに、リン酸化抗体を用いた免疫染色およびウェスタンブロッティング法により、ミオシン軽鎖の Ser19, Thr18 のリン酸化レベルが、CL-A 処理によって大きく上昇していることを確認した。また、広範なキナーゼ阻害剤である Staurosporine には、この二リン酸化を抑える効果があり、CL-A による神経突起縮退を弱める効果も確認した。

以上の実験結果から、申請者は、CL-A による神経突起縮退における微小管の再編成がアクトミオシンの収縮により引き起こされていると結論付けた。神経突起の生理的な縮退過程においてもこのような機構が制御された形で利用されている可能性があることを解明した。

以上のように、本論文は博士（理学）の学位論文として十分に価値あるものと認める。また、平成 22 年 1 月 20 日論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。