

氏 名	まつ お なお き 松 尾 直 毅
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2453 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Characterization of STEF, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1, required for neurite growth に関する研究 (Rac1 のグアニンヌクレオチド交換因子 STEF が神経突起伸長に果たす役割の解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 成 宮 周 教 授 金 子 武 嗣 教 授 鍋 島 陽 一

論 文 内 容 の 要 旨

我々の精神活動の基盤となる神経回路網は、ダイナミックな細胞形態変化を伴う様々な発生段階を経て形成される。近年、この現象にアクチン細胞骨格の制御に中心的な役割を果たす Rho ファミリー G 蛋白質 (Rho, Rac, Cdc42 等) が重要な役割を担っている事が明らかになりつつある。

Rho ファミリー G 蛋白質の活性化は、細胞内でグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) によって、不活性な GDP 結合型から活性のある GTP 結合型に変換されることにより行われていると考えられている。行動異常を示すショウジョウバエの突然変異体の原因遺伝子 *still life* (*sif*) の哺乳類ホモログとして我々の研究室でクローニングされた *stef* 遺伝子は、発生期の中樞神経系に特に強く発現し、Rac1 特異的な GEF をコードしていた。

まず STEF 蛋白質の各ドメインの機能解析により、STEF の分子としての機能が明らかになった。つまり、N 末端側の PH (PH_N) ドメインと TSS ドメインの両方が STEF 蛋白質の膜局在に、DH ドメインが STEF 蛋白質の酵素活性に、C 末端側の PH (PH_C) ドメインが酵素活性の増強に不可欠である事が示された。次に、STEF 蛋白質を N1E-115 神経芽細胞腫細胞に強制発現させたところ、神経突起伸長を抑制する血清存在条件下においても、神経突起様構造を形成した。この突起はアクチン線維のみならず、 β III チュープリン、MAP2、GAP43 といった神経突起のマーカー蛋白質を発現していたことから、STEF には神経突起構造を誘導する能力がある事が示された。更に、PH_N と隣接する TSS ドメインを含む PH_NTSS 蛋白質フラグメントが STEF と、STEF と高い相同性を示す別の Rac1 GEF である Tiam1 の機能を特異的に阻害するドミナントネガティブ体として働く事を明らかにした。この PH_NTSS 蛋白質を N1E-115 細胞に強制発現させたところ、神経突起伸長の抑制が観察された。これらの結果は、STEF・Tiam1 を介した Rac1 の活性化が N1E-115 細胞の神経突起伸長に必要である事を示唆する (Matsuo N. *et al.*; J. Biol. Chem. 2002)。

神経回路網形成過程において、神経突起は先端部の成長円錐に導かれて正しい標的に到達するが、その振る舞いを制御する細胞内情報伝達機構に関しては余り理解が進んでいない。免疫染色法により、海馬の初代培養神経細胞の成長円錐に STEF, Tiam1, RhoA, Rac1, Cdc42 蛋白質の局在が認められたことから、これらの蛋白質が成長円錐内情報伝達において何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。ドミナントネガティブ体を用いた実験により、STEF・Tiam1 が海馬神経細胞の神経突起伸長、更には成長円錐のラメリポディア形成に必要であることを明らかにした。また、STEF・Tiam1 が細胞外マトリックス蛋白質のひとつ Laminin-1 による Rac1 の活性化を制御している事、Cdc42 や RhoA からの細胞内シグナルを統御して Rac1 の活性調節を行っていることも明らかになった。本研究により、哺乳類の神経回路網形成過程において、様々な細胞外からの入力 Rho ファミリー G 蛋白質とその活性化制御因子のひとつ STEF・Tiam1 ファミリーを介して、最終的に成長円錐の形態変化・神経突起伸長として出力される機構の存在が示唆された (Matsuo N. *et al.*; 投稿準備中)。

論文審査の結果の要旨

近年、神経回路網形成に Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 (Rho, Rac, Cdc42 等) が重要な役割を担っている事が示唆されつつあるが、その具体的な働きに関しては未解明の部分が多い。そこで、Rac1 の活性化因子 GEF のひとつで、発生期の中枢神経系に強く発現する STEF 蛋白質の解析を行った。

まず STEF 蛋白質の各ドメインの欠失ミュータント解析により、STEF の分子としての機能を明らかにした。次に、STEF を NIE-115 細胞に強制発現させたところ、神経突起様構造の形成を誘導した。また、STEF と、STEF と高い相同性を示す別の Rac1 GEF である Tiam1 の機能を特異的に阻害するドミナントネガティブ体を NIE-115 細胞や海馬神経細胞に強制発現させたところ、神経突起伸長が抑制された。

更に、免疫染色法により、神経細胞の成長円錐に STEF・Tiam1 蛋白質が存在する事を明らかにした。また、STEF・Tiam1 が成長円錐の形態制御に関与している事、Laminin-1 刺激による Rac1 の活性化に関与している事、Cdc42 等からの細胞内シグナルを統御して Rac1 の活性調節を行っている事を明らかにした。

以上の研究から、哺乳類の神経回路網形成過程において、STEF-Tiam1 による Rac1 活性調節が神経突起伸長に重要な役割を担っている事が示唆され、神経回路網形成の解明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。なお、本学位授与申請者は、平成14年1月22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。