

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	田坂 元一
論文題目	軸索ガイダンス因子 Semaphorin による樹状突起形態調節に関わるシグナル伝達経路の解明		
(論文内容の要旨) 記憶や学習、運動などの高次脳機能には、正確な神経回路が必要不可欠である。神経回路は、特異な極性を示す神経細胞がその軸索と樹状突起を伸長し、接着により形作る正確で複雑なシステムである。神経軸索は、様々な軸索ガイダンス分子に導かれて正確にターゲット細胞に到達し、神経回路を形成する。軸索ガイダンス分子には誘因性の分子と反発性の分子があり、Semaphorinは代表的な反発性の分子であり、その特異的な受容体Plexinに結合し、反発作用を発揮する。Semaphorinファミリーの1つ、Sema4Dの受容体、Plexin-B1は、細胞膜1回貫通型の受容体でその細胞内領域に、細胞膜の進展や神経突起伸長を促進する機能があるRasファミリー低分子量G蛋白質、R-RasおよびM-Rasに対するGAPが直接コードされており、R-Rasの活性を抑制し、神経軸索の成長円錐の崩壊を引き起こし、M-Rasの活性を抑制することにより樹状突起の退縮を引き起こす。軸索におけるSema/Plexinの下流シグナル伝達経路については精力的に研究されているが、M-Rasに対するGAP活性を介した樹状突起におけるシグナル伝達経路はあまり明らかになっていない。そこで、本研究において申請者は、軸索ガイダンス分子、Sema4D/Plexin-B1のM-Ras GAP活性を介した樹状突起形態調節作用におけるシグナル伝達機構に焦点を当てて解明を試みた。 初代培養大脳皮質神経細胞において、Sema4Dは樹状突起の退縮を誘導するが、そのとき突起先端部でF-actinの消失を引き起こした。このF-actinの消失は常時活性型のM-Rasの過剰発現により抑制されたことから、樹状突起の形態制御におけるM-Rasの下流で働くアクチン骨格制御分子の探索を行ったところ、アクチン重合促進蛋白質Ena/VASPの結合分子であるLpd (Lamellipodin) が樹状突起におけるM-Rasの新奇エフェクターであることがわかった。Lpdは樹状突起のF-actinが豊富な突起先端部に局在しており、Lpdのノックダウンは樹状突起の成長を抑制した。また、常時活性型のM-Rasによる樹状突起の成長促進はLpdのノックダウンによって抑制されたことから、M-Rasによる樹状突起の成長には下流でLpdが必要であることがわかった。細胞分画実験から、活性型M-RasはLpdを細胞質から細胞膜へ移行させ、Sema4DはLpdの細胞膜移行を抑制し、このSema4DによるLpdの膜移行の抑制にはSema4D/Plexin-B1のM-Ras GAP活性が必要であることがわかった。また、LpdのEna/VASP結合ドメインはLpdによる樹状突起の成長促進に必要であり、Ena/VASP結合ドメインの膜移行型変異体はSema4Dによる樹状突起の退縮を抑制した。さらに、Sema4Dによる樹状突起先端部でのF-actinの消失はLpdのEna/VASP結合ドメインの膜移行型変異体によって抑制されたことから、Sema4Dは、M-Ras-Lpdシグナル伝達経路を抑制的に制御することで樹状突起の形態調節を行っていることが示唆された。 さらに、子宮内エレクトロポレーション法を用いたマウス 大脳皮質での発現実験結果から、PlexinのGAP活性によるM-Ras-Lpdシグナル経路の制御は大脳皮質神経細胞の正常な樹状突起形成に必要であることがわかった。 以上のように、本研究を通して申請者は、反発性の軸索ガイダンス因子が樹状突起でアクチン骨格を制御するという新たな知見を得るとともに、Sema4D/Plexin-B1の下流においてM-Ras-Lpdがアクチン骨格の重合調節を介して樹状突起の形態制御を行うという新しいシグナル伝達経路の存在を明らかにした。			

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、**Ras**ファミリー低分子量 **G**蛋白質のなかでもその機能がほとんど不明な**R-Ras**サブファミリーのメンバー、**M-Ras**の樹状突起形態調節に関わる**M-Ras**の新奇エフェクターの同定と、神経軸索ガイダンス分子、**Sema4D/Plexin-B1**による**M-Ras** **GAP**活性を介した樹状突起の形態の調節機構を明らかにし、神経回路形成における重要なステップである樹状突起形成に関わる分子機構の1つを解明した研究である。

神経回路形成において、樹状突起形成は神経軸索ガイダンスと共に重要なステップであるが、その分子機構には不明な点が多い。軸索ガイダンスに関してはすでに多くのガイダンス分子やそれらの受容体が同定され、そのシグナル伝達機構も徐々に明らかにされている。軸索形成における分子機構として、**Ras**ファミリーのメンバーである**R-Ras**が軸索に局在し、インテグリンを活性化して軸索の伸長を制御していることがすでに明らかにされている。一方、軸索ガイダンス分子として同定された分子が樹状突起形成の調節にも関与することが報告されたが、その分子機構はほとんど不明であった。本研究では **R-Ras**サブファミリーのメンバーの1つ、**M-Ras**がアクチン重合促進蛋白質**Ena/VASP**の結合因子である**Lpd**に結合し、**Lpd**を細胞膜へ移行させることにより樹状突起の成長を促進すること、また、軸索ガイダンス分子である**Sema4D**がその受容体**Plexin-B1**に結合し、**M-Ras** **GAP**活性を介して**M-Ras-Lpd**シグナル伝達経路を抑制的に制御することにより、樹状突起の退縮を引き起こすことを明らかにした。

本研究は、**R-Ras**サブファミリーのメンバーの1つ、**M-Ras**の新奇エフェクターとして**Lpd**を同定し、**M-Ras**が**Lpd**に結合することによりアクチン骨格の制御を行うこと、また、代表的な反発作用を有する**Sema4D**の受容体**Plexin-B1**が**M-Ras**に対する**GAP**活性を介して**M-Ras-Lpd**シグナル伝達経路を負に制御することにより樹状突起の成長抑制をおこなうことを見だし、ガイダンス因子による樹状突起形成の分子制御機構を明らかにした研究であり、神経科学の重要な解明課題の1つである神経回路形成の分子機構の解明に寄与するものであると考えられる。以上の研究成果の意義に加えて本論文は全体を通して内容もよく、学位論文としては特に問題ない。

よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。さらに、平成25年1月22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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日