

京都大学	博士（生命科学）	氏名	西村 嘉晃
論文題目	発生期大脳皮質におけるロコモーション様式の神経細胞移動に関わる制御因子の解析		
（論文内容の要旨） 神経細胞移動は正常な大脳皮質形成や脳機能に必須であり、この移動に異常が生じると精神遅滞やてんかんなどの神経疾患が惹起されることが知られている。神経細胞移動には、初期段階の多極性様式などの移動、ロコモーション様式の移動、最終段階のターミナルトランスロケーション様式の移動といったいくつかの連続的な段階がある。その中でも「ロコモーション様式の移動」は移動過程の最も長い距離を占めており、大脳皮質形成において非常に重要な役割を担っていると考えられている。しかしながら、これまでロコモーション様式の移動を制御する分子機構を直接解析することは困難であった。その理由の一つとして、移動の初期段階において神経細胞は様々な形態変化を呈し、軸索形成や先導突起形成といった複雑な神経成熟過程を経るため、従来の実験方法では移動の初期段階における異常の二次的な影響を排除することが出来ず、ロコモーション様式の移動そのものの分子機構の解析が難しかったという点が挙げられる。 そこで本研究では、マウス胎仔大脳皮質のスライス培養系においてロコモーション様式で移動している神経細胞を可視化し、この実験系を用いて阻害剤スクリーニングを行うことによりロコモーション様式の神経細胞移動の制御機構を直接的に解析する方法を確立した。培養スライス組織に Cdk5 に対する阻害剤である Roscovitine、Src ファミリーキナーゼに対する阻害剤である PP2をそれぞれ添加するとロコモーション細胞の移動速度が低下した。さらに、RNA 干渉法によって Cdk5、および Src ファミリーキナーゼの一つである Fynをノックダウンすると、どちらも遺伝子導入細胞の多くはロコモーション細胞に転換することなく移動の初期段階で留まったが、一部の細胞はロコモーション細胞の形態を呈し、これらは阻害剤による解析と同じく移動速度が低下した。また、本研究では PKCδに対する特異的な阻害剤として広く使われている Rottlerin がロコモーション様式の移動を抑制することも見出した。しかし、PKCδのドミナントネガティブ体および RNA 干渉は、ターミナルトランスロケーション様式の移動に影響を与えたもののロコモーション様式の移動にほとんど影響を与えなかった。この結果より、Rottlerin は PKCδ非依存的にロコモーション細胞の移動を抑制した可能性が考えられたので、次に Rottlerin の標的分子について調べた。大脳皮質の初代培養神経細胞に Rottlerinを添加すると JNK のリン酸化が低下した。また大脳皮質スライスに、JNK 阻害剤、および PKCδを阻害しないが JNK の活性を抑制する低濃度の Rottlerinを添加すると、どちらもロコモーション細胞の移動速度が低下したことから、Rottlerin の下流でロコモーション様式の移動を制御している分子の候補として、JNK もしくはその上流制御因子が見出された。 本研究ではロコモーション様式の移動の分子機構を直接的に解析する手法を確立し、その結果 Cdk5、Src ファミリーキナーゼ、および JNK 経路の制御因子がロコモーション様式の移動に関与していることを明らかにした。また、移動の初期段階における Fyn の新たな役割、移動の最終段階における PKCδの役割も示唆された。これらの結果から、これまで直接的な解析が困難であったロコモーション様式の移動を中心とした神経細胞移動の各段階に関与する制御因子が明らかとなった。			

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、発生期の脳皮質における「ロコモーション様式」の神経細胞移動の制御機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

神経細胞移動には、初期段階の多極性様式などの移動、ロコモーション様式の移動、最終段階のターミナルトランスロケーション様式の移動といった連続的な段階があり、その中でも「ロコモーション様式の移動」は移動過程の最も長い距離を占めていることから脳皮質形成において非常に重要な役割を担っていると考えられている。申請者は「ロコモーション様式の移動」の制御機構を明らかにすることに興味を持ち、研究を進めた。従来、脳皮質形成における神経細胞移動の分子機構は、ノックアウトマウスや子宮内エレクトロポレーション法を用いた機能抑制実験などによって解析されてきた。しかし、これらの実験方法では移動のより早い段階での異常の二次的な影響を排除できなかったため、「ロコモーション様式の移動」についての直接的な解析は困難であった。そこで、まず神経細胞移動の初期段階での異常の影響を受けず、ロコモーション様式の移動そのものの制御機構を解析できる実験系が必要であった。そのために、脳皮質のスライス培養系と機能阻害剤によるスクリーニングを組み合わせた実験系を構築し、ロコモーション様式の移動を制御する分子を解析することに成功した。この実験系により、Cdk5、Src ファミリーキナーゼがロコモーション様式の移動に関与していることを見出した。さらに、各機能阻害剤が非特異的に他の分子の機能を阻害している可能性を考え、スライス培養系による実験と RNA 干渉実験とを組み合わせることにより、Cdk5、および Src ファミリーキナーゼの一つである Fyn がロコモーション様式の移動に関与していることを明らかにした。また、PKCδ に対する特異的な阻害剤として広く使われている Rottlerin がロコモーション様式の移動を抑制することを見出した。しかし、PKCδ のドミナントネガティブ体および RNA 干渉は、移動の最終段階のターミナルトランスロケーションには影響を与えたものの、ロコモーション様式の移動にはほとんど影響を与えなかった。Rottlerin は PKCδ 非依存的にロコモーション様式の移動を抑制した可能性が考えられるので、Rottlerin の標的分子について調べた。脳皮質の初代培養神経細胞に Rottlerin を添加すると JNK のリン酸化が低下し、また脳皮質スライスに、JNK 阻害剤、および PKCδ を阻害しないが JNK の活性を抑制する低濃度の Rottlerin を添加すると、どちらもロコモーション細胞の移動速度が低下したことから、Rottlerin の下流でロコモーション様式の移動を制御している分子の候補として、JNK 経路の制御因子を見出した。以上の実験により、申請者はこれまで直接的な解析が困難であったロコモーション様式の移動に関与する制御因子を解析する実験系を構築し、いくつかの分子の関与を明らかにした。

本研究の着眼点、問題解決策、得られた知見から判断して、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。また、平成 22 年 1 月 27 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