

氏 名	よし ざわ まさ と 吉 澤 匡 人
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2846 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 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	Dynamic and coordinated expression profiles of Dbl-family guanine nucleotide exchange factors in the developing mouse brain. (発生過程のマウス脳に於ける Dbl ファミリーグアニンヌクレオチド交換因子の発現様式)
論文調査委員	(主 査) 教 授 影 山 龍 一 郎 教 授 河 野 憲 二 教 授 湊 長 博

論 文 内 容 の 要 旨

Rho, Rac, Cdc42 を含む Rho 類似 G 蛋白質は細胞内分子スイッチとして働き、細胞外からの刺激に応じて細胞骨格系の再構成を促し細胞形態の変化をもたらす事が知られている。この Rho 類似 G 蛋白質の活性は神経系発生期の神経細胞においても、軸索、樹上突起の適切な形成や細胞の移動過程に関与すると言う知見が蓄積されつつある。しかし、Rho 類似 G 蛋白質はユビキタスに発現し、細胞質全体に存在することから、その活性化機構こそが細胞の適切な振る舞いを制御していると考えられる。申請者は Rho 類似 G 蛋白質を不活性な GDP 結合型から活性型である GTP 結合型へと変換する Dbl-family グアニンヌクレオチド交換因子 (Dbl-GEF) に着目し、Rho 類似 G 蛋白質活性化機構の神経系発生に果たす役割の解明を目指した。まず、データベースのホモロジー検索により、cDNA 断片が入手可能であり、未だ詳細な発現解析がなされていない21種の Dbl-GEF 候補を選出した。Northern 解析を行ったところ、これらの Dbl-GEF ファミリー遺伝子は発生時期に応じた多様な発現パターンを持つことが明らかになり、7つの発現型に分類することができた。*in situ* ハイブリダイゼーションを行った5つの Dbl-GEF についてはそれぞれが全く異なる発現様式を示す事が明らかになった。以上のことから多種類の Dbl-GEF がそれぞれの発現領域、発現時期を細かく制御されていることが示唆された。

上記の発現解析の過程で、発生期大脳皮質において中間帯 (intermediate zone) の移動神経細胞など限られた細胞にのみ発現する、ユニークな発現様式を示す *P-Rex1* 遺伝子を見いだした。*P-Rex1* は既に Welch らにより、血球系においてフォスファチジルイノシトール3リン酸 (PIP₃) 依存性に Rac を活性化する因子として同定されている。

申請者はこの *P-Rex1* に着目し、発生期脳における発現様式と生理的機能の解析を行った。*in situ* ハイブリダイゼーションからは、大脳皮質以外にも後根神経節の神経細胞等様々な細胞でのダイナミックな発現が検出された。大脳皮質中間帯に於ける移動中の神経細胞では、先端突起及びその基部の細胞質に *P-Rex1* 蛋白質の局在が確認された。PC12 細胞に *P-Rex1* を強制発現させた実験からは、*P-Rex1* は NGF--PI3-kinase 経路依存的に活性化され、活性化型 Rac1 を増加させる能力を持つことが示され、さらに、PC12 細胞の NGF 依存性の細胞移動において、著しく細胞移動能を増強することが明らかになった。*P-Rex1* のドメイン解析からは、それぞれのドメインが *P-Rex1* の活性に果たす役割が示されただけでなく、触媒ドメインを欠いた Δ DH-*P-Rex1* がドミナントネガティブ様の活性を持つことが明らかになった。 Δ DH-*P-Rex1* 及び、*P-Rex1* を標的とする siRNA の導入実験からは、内在性の *P-Rex1* が PC12 細胞や初代培養系神経細胞に見られる神経成長因子依存性の細胞移動に関与していることが示された。さらに、子宮内エレクトロポレーション法により、マウス胎仔大脳皮質に Δ DH-*P-Rex1* を導入した実験からは *in vivo* に於ける神経細胞移動にも *P-Rex1* の関与が示唆された。

以上の一連の結果から、発生期の様々な局面で Dbl-GEF が使い分けられている可能性が示唆され、そのうちの一つである *P-Rex1* の解析からは神経細胞移動における Rac 調節機構に新たな知見を与えたと考えられる。

論文審査の結果の要旨

Rho 類似 G 蛋白質は細胞骨格系の再構成を制御することによって、神経系の発生に重要な役割を果たしていると考えられている。本論文ではその Rho 類似 G 蛋白質の活性化因子である Dbl ファミリーグアニンヌクレオチド交換因子 (Dbl-GEF) に着目し、神経系の発生過程での発現解析を行った。まず、データベース検索により、未だ詳細な解析がなされていない22種の Dbl-GEF 遺伝子を選出した。マウス組織を用いた Northern 解析を行ったところ、20種中18種のマウス Dbl-GEF で脳に発現が認められ、それらの発現様式は、発生が進行するに伴い発現が上昇するもの、下降するもの、あるいはどの発生段階においても一定の発現量を保つものなど、様々であった。

さらに5種類の Dbl-GEF について、胎仔あるいは新生マウスに対して *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、大脳皮質においては、脳室帯の細胞のみに発現しているもの、中間帯と皮質板の細胞に発現しているもの、大脳皮質全体に発現しているものなど様々な発現様式が観察された。

以上の研究は、Dbl-GEF の発現様式を解析することで、神経系の発生段階における Rho 類似 G 蛋白質の活性化機構の理解に貢献し、神経発生の分子機構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17年2月8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。