

京都大学	博士（生命科学）	氏名	後藤 明弘
論文題目	Aキナーゼによる低分子量GTP結合タンパク質Rac1の神経組織における時空間的制御機構		
（論文内容の要旨） 神経回路形成の素過程である成長円錐ガイダンスや神経細胞移動（neuronal migration）の分子基盤として細胞骨格のダイナミズムを理解する必要がある。セリンスレオニンリン酸化酵素である cAMP 依存性キナーゼ（Protein kinase A, PKA）は、様々な G タンパク質共役型受容体(GPCR)の情報を細胞内に伝達する分子であり、成長円錐ガイダンスを制御し、中枢神経の再生を促すが、細胞骨格をどのように制御しているかはほとんど解明されていない。本研究では、cAMP-PKA 経路が成長円錐ガイダンスや神経細胞移動を制御する分子機構を、蛍光共鳴エネルギー移動（Fluorescence resonance energy transfer, FRET）バイオセンサーを使って時空間的に明らかにした。 『cAMP-PKA 経路は Rac1 を介して成長円錐ガイダンスを制御する』：副腎髄質由来の PC12D 細胞は成長円錐ガイダンスのモデルとしてよく用いられており、cAMP アナログ処理により神経突起を伸展する。この細胞を用いて cAMP-PKA 経路が細胞骨格を制御する機構を明らかにした。まず細胞骨格制御に重要な低分子量 G タンパク質である Rac1 と PKA の活性変化を cAMP アナログで刺激した PC12D 細胞に FRET バイオセンサーを発現させて解析した。Rac1 と PKA の活性化は共にまず細胞全体で 1 時間ほど観察され、やがて突起先端に局在化した。この PKA 依存性突起進展誘導は、PKA が Rac1 特異的活性化因子である STEF/Tiam2 の Thr749 をリン酸化し、活性化させるためであることを発見した。さらに、G タンパク質共役型受容体(G protein-coupled receptor, GPCR)を介する神経突起を誘導する系においても、この cAMP→PKA→STEF→Rac1 系が重要であることを示した。本研究の成果は、cAMP の関与が知られている神経新生や神経突起伸展のメカニズムの解明に貢献できると期待される。 『cAMP-PKA-Rac1 経路はマウス腸管神経堤由来細胞の運動を制御する』：cAMP-PKA-Rac1 経路が、個体レベルでも機能していることを証明するため、腸管神経堤由来細胞（enteric neural crest-derived cells, ENCCs）が腸管壁上を移動する際の PKA と Rac1 活性変化を観察した。この目的のために、既報の PKA、ERK の FRET バイオセンサー発現マウスに加え、Rac1, Cdc42, JNK の FRET バイオセンサー発現マウスを作成した。腸神経系は、発生期における ENCCs に由来する。ENCCs は神経管より遊出した後、前腸に侵入し、中腸、後腸の後部までの腸管壁を急速に移動しながら神経細胞とグリア細胞へと分化する。そこで、胎生 12 日目に腸管の器官培養を行い、二光子 FRET イメージングを行った。吻側 ENCCs は尾側 ENCCs よりも高速度で移動していることを見出した。興味深いことに、移動速度は PKA 活性と逆相関し、Rac1 活性とは相関を示した。cAMP アナログあるいは PI3 キナーゼ阻害薬を器官培養に投与すると、細胞移動および Rac1 活性が抑制された。これらの結果は PKA が PI3 キナーゼ依存性 Rac1 活性化を介して細胞移動を負に制御することを示しており、PKA が Rac1 と細胞骨格編成を正に制御する PC12D における突起伸展とは異なったメカニズムであることを示している。さらに、間葉系の細胞から分泌され、ENCCs の移動を制御することが知られているグリア細胞由来神経栄養因子(Glial cell-line derived neurotrophic factor, GDNF)とエンドセリン 3 (Endothelin-3, ET-3)の PKA と Rac1 への影響を検討した。GDNF は RET チロシンキナーゼ受容体を、ET-3 は G 蛋白質共役受容体エンドセリン B のリガンドであることが知られている。その結果、GDNF が PKA を不活性化し Rac1 を活性化すること、対照的に ET-3 は PKA を活性化し Rac1 を不活性化することが明らかになった。これらの結果は、間葉系の細胞から分泌される GDNF と ET-3 の勾配のシグナルを PKA が統合して Rac1 依存的な細胞移動を正と負に制御していることを示している。この成果はヒルシュスプルング病などの腸管副交感神経系の異常に起因する腸疾患の解明に寄与すると考えられる。□ 以上の培養株と器官培養での研究の成果により、PKA による Rac1 の制御が、神経組織における細胞骨格編成において中心的な役割を担っていることを示した。また PKA は神経細胞のタイプ、現象に応じて Rac1 を介した細胞骨格編成を正と負の両方に制御しており、神経組織における PKA の機能の多様性を示した。			

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、cAMP-PKA経路が成長円錐ガイダンスや神経細胞移動を制御する分子機構を、蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) バイオセンサーを使って時空間的に明らかにしたものである。

申請者は、まず、FRET バイオセンサーを発現させた PC12 細胞を cAMP アナログで刺激することにより、cAMP-PKA 経路が細胞骨格を制御する機構を解析した。その結果、PKA 依存性突起進展誘導は、PKA が Rac1 特異的活性化因子である STEF/Tiam2 をリン酸化し、活性化させるためであることを発見し、さらに、G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) を介する神経突起を誘導する系においても、この cAMP→PKA→STEF→Rac1 系が重要であることを明らかにした。次に、cAMP-PKA-Rac1 経路が、個体レベルでも機能していることを証明するため、腸管神経堤由来細胞 (enteric neural crest-derived cells, ENCCs) が腸管壁上を移動する際の PKA と Rac1 活性変化を FRET バイオセンサー発現マウスを用いて解析した。その結果、間葉系の細胞から分泌される GDNF と ET-3 の勾配のシグナルを PKA が統合して Rac1 依存的な細胞移動を正と負に制御していることが示唆された。以上の培養細胞株と器官培養での研究の成果により、PKA による Rac1 の制御が、神経組織における細胞骨格編成において中心的な役割を担っていることが示された。

口頭試問においては、神経突起伸展の部位がどのように規定されるかや、嗅球神経突起伸展における cAMP の役割、あるいは得られた結果の生理的意義などについて活発な討論が行われたが、学位申請者は概ね的確に解答し、十分な学識を示した。

以上、cAMP-PKA 経路の神経突起伸展と神経細胞運動における役割を培養細胞とマウス個体を用いた研究により解明した本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。平成 25 年 2 月 8 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