

京都大学	博士（生命科学）	氏名	藤本 聡志
論文題目	マウス大脳皮質発達における低分子量Gタンパク質RhoGの役割		
(論文内容の要旨)			
大脳皮質は哺乳類において特に発達しており、近年、スライス培養やin vivo遺伝子導入法、ノックアウトマウスの解析、イメージング技術の進歩により、その回路構造や発達過程などが明らかになりつつある。大脳皮質の発達初期において神経前駆細胞は脳室帯で増殖する。神経前駆細胞が一度ニューロンへと分化するとそれ以上増殖することができない。したがって、この自己増殖か分化かを決定するプロセスの時間的、空間的制御は、大脳皮質のニューロンの総数を決定し機能的な大脳皮質を形成する過程において重要な要素である。 Rhoファミリー低分子量Gタンパク質RhoGは、他の低分子量Gタンパク質と同様に細胞内において分子スイッチとして働き、主に細胞骨格系を制御することにより培養細胞において細胞運動や神経突起の伸長を促進することが知られている。しかし、RhoGが生体内でどのような役割を担っているのかはあまり明らかになっていない。 本研究では、マウス大脳皮質発達におけるRhoGの役割について解析を行った。まず、in situハイブリダイゼーションを行って胎児脳におけるRhoGの発現分布を調べたところ、脳室帯に強い発現が見られた。そこで申請者は、子宮内エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入を行い、脳室帯に存在する神経前駆細胞でのRhoGの役割を解析しようと試みた。常時活性化型のRhoG (RhoG-V12) を導入すると神経前駆細胞の増殖は促進された。一方でRhoGに対するショートヘアピンRNA (shRNA) を導入してRhoGをノックダウンすると神経前駆細胞の増殖は抑制された。また、細胞周期のS期の細胞に取り込まれるブロデオキシウリジン (BrdU) を用いてラベリングを行うと、BrdU陽性細胞の割合が RhoG-V12を導入した神経前駆細胞で増加し、RhoG shRNAを導入した細胞では減少した。また、増殖細胞のマーカーであるKi67に対する抗体で組織染色を行った場合も、Ki67陽性細胞の割合が RhoG-V12を導入した神経前駆細胞で増加し、RhoG shRNAを導入した細胞では減少した。また、RhoGのノックダウンにより神経前駆細胞の細胞死が誘導されることはなかった。一方、神経前駆細胞のマーカーであるNestinに対する抗体で染色を行うと、RhoG-V12ではNestin陽性細胞の割合が増加したが、RhoG shRNAを導入しても変化はなかった。 これまでの培養細胞における知見から、RhoGは特異的エフェクターであるELMOとRac特異的なGEFであるDock180を介してRacを活性化し、神経突起の伸長や細胞運動を制御し、一方でPI3Kの制御サブユニットであるp85αを介してAktのリン酸化を起こすことによって細胞の生存に関与していることが知られている。そこで申請者は、神経前駆細胞の増殖におけるRhoGの下流で、どちらのシグナル経路がRhoGによる神経前駆細胞の増殖制御に関与しているのかを調べることにした。その結果、PI3Kを介したAktのリン酸化を引き起こすことができるが、ELMOに結合することのできない常時活性化型変異体であるRhoG-V12A37を過剰発現させると、RhoG-V12と同程度にBrdU陽性細胞の増加がみられた。さらに、RhoG-V12によるBrdU陽性細胞およびNestin陽性細胞の増加はPI3Kの阻害剤であるLY294002で処理することによって抑制された。 以上の結果から、RhoGは脳室帯に発現しており、神経前駆細胞の増殖を正に制御していること、およびRhoGによる神経前駆細胞の増殖制御にはPI3Kの活性が必要であることが明らかとなった。			

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、低分子量GTP結合タンパク質のなかでも、生体内における機能が未だよくわかっていないRhoGについて、その発生過程における大脳皮質形成への関与とその分子メカニズムについて初めて明らかにした研究である。

RhoGは未だその生理機能があまりわかっておらず、本研究がRhoGの生体内での働きを明らかにした点でその意義は非常に大きいと思われる。RhoGは大脳皮質の神経前駆細胞に発現しており、その増殖を促進していることが示された。またその機能にはPI3キナーゼの活性が必要であることも明らかにしている。本研究では子宮内エレクトロポレーション法という、非常に技術的にも難度の高い研究法を習得し、本論文の実験結果の大部分をこの技術を用いて行っている。この方法では神経前駆細胞という非常に限られた細胞群にのみ遺伝子を導入できる利点があり、また遺伝子が導入された細胞での変化のみを観察できる点など、他の遺伝子導入法と比較しても非常に有効な方法であると思われた。本論文の内容とそれに関連した口頭試問でも取り上げられたように、RhoGによる神経前駆細胞の増殖促進作用とは具体的にどういうことが引き起こされているのか、例えば、実際に様々な遺伝子を導入した神経前駆細胞の細胞周期の長さを測定し比較することで細胞周期の長さが変化しているのかなど、もう少し詳細に調べるべき点が幾つかあることが挙げられた。また、各細胞周期に存在する神経前駆細胞の割合や、大脳皮質の脳室帯と中間帯での結果の違いなど、さらに詳しく調べていくべき点も考えられた。本論文の実験結果から、神経前駆細胞においてRhoGの発現量を低下させた場合に見られる、BrdUの取り込みの低下とcell cycle exitの割合の低下が論理的に成り立つかどうかについては具体的に示されておらず、さらなる考察すべき点である。以上幾つか挙げられた点を考慮しても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