

氏名	鈴木 篤史
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博甲第 7895 号
学位授与年月	平成 28 年 4 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	神経突起伸長における細胞膜ダイナミクスによる細胞骨格制御機構

主査	筑波大学教授	医学博士	久武 幸司
副査	筑波大学講師	博士 (理学)	塩見 健輔
副査	筑波大学助教	博士 (神経科学)	小金澤 禎史
副査	筑波大学教授	理学博士	志賀 隆

論文の内容の要旨

(目的)

神経細胞は高度に分化した軸索や樹状突起と呼ばれる神経突起を介して情報伝達を行う。神経突起の形成メカニズムを解明する鍵は、神経突起先端部にある成長円錐にある。成長円錐は、成長因子などによるシグナルを感知し、Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質を介したアクチン細胞骨格の再構築により形態を変化させ、神経突起の伸長速度や方向性を決定する。これまでの研究により、Rho ファミリーの下流にあるシグナル伝達系は明らかになってきたが、その上流にある細胞外シグナルがどのように Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質を制御しているのかは不明な点が多い。

細胞膜は脂質二重層を形成し、その主要構成成分はリン脂質である。リン脂質の膜内分布は二重膜の内層と外層で異なっており、ホスファチジルエタノールアミン (PE) は主に細胞膜内層に分布する。近年、PE が細胞膜の内層から外層に移動することにより Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の活性を制御することが発見された。このことから神経突起伸長時においても、リン脂質の細胞膜内での移動が成長円錐での細胞骨格系の再構築に関わっている可能性が考えられる。

本研究は、神経突起の伸長における細胞膜の挙動に着目し、Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質を介した細胞骨格系の調節機構の解明を目的とした。

(対象と方法)

マウス個体および初代培養海馬神経細胞を用いた生化学的・分子細胞学的解析によって Rho フ

ファミリー低分子量 G 蛋白質を介した細胞骨格系の調節機構の解析を行った。

(結果)

神経突起の伸長部位において PE の細胞膜内での分布を検討するため、PE に特異的に結合する蛍光標識分子プローブ SA-Bio-Ro (修飾型 Ro09-0198) を用いて PE の分布を観察した。その結果、成長円錐において、アクチン骨格の重合部位で、PE が細胞膜外層に露出していることが分かった。さらに SA-Bio-Ro を用いて PE を細胞膜外層に固定すると、Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の一つである Cdc42 の活性が上昇し、また成長円錐のアクチン細胞骨格の再構築が制御されることが明らかとなった。また、この PE の細胞膜外層への移動は、成長因子である BDNF やガイダンス因子である Netrin-1 や細胞外 Ca^{2+} の流入によって促進された。

細胞膜内の PE は、細胞膜内層から外層へだけでなく、内層と外層間を両方向に移動することが報告されている。そこで PE を細胞膜外層から内層へと輸送するフリッパーゼの神経細胞内での局在を検討すると、P4-ATPase ファミリーのうち ATP9A のみが、神経突起伸長時の成長円錐に局在し、軸索の伸長や分岐形成を制御することを見出した。また、ATP9A の過剰発現およびノックダウンの実験から、ATP9A の発現が Cdc42 の活性を制御すること、PE の膜内輸送活性が欠如した ATP9A 変異体の過剰発現は、神経突起の伸長を抑制することも明らかにした。

PE の細胞膜内分布が神経突起の伸長に深く関わっていることから、細胞膜リン脂質の存在量それ自体も神経細胞の形態形成に関与している可能性が考えられる。そこで成長円錐におけるリン脂質の存在比を細胞分画実験により測定すると、成長円錐画分では PE の存在比が比較的高いことが分かった。さらに、PE の合成酵素であるエタノールアミンキナーゼ 1 (Etnk1) を用いて PE の de novo 合成を促進させると、神経突起の伸長が促進された。

(考察)

以上の結果より、神経突起伸長時において Netrin-1 や BDNF といった神経突起を伸長させる情報伝達因子は、細胞外からの Ca^{2+} の流入を介して成長円錐における PE の細胞膜外層への露出を誘導し、Cdc42 の活性調節を介して、アクチン細胞骨格の再構築を引き起こすことが考えられた。また、PE の細胞膜内での移動はフリッパーゼの一種である ATP9A が引き起こすことが示唆された。

本研究は、神経突起での Cdc42 の機能と PE の膜内分布を解析し、神経細胞膜内の脂質分布の変化による神経突起伸長の制御という新たな現象を見出しており、今後の発展が期待出来る。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質がどのような制御を受けてアクチン細胞骨格の再構築を行うかを明らかにしたのみならず、PE の細胞膜内分布の変化が Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質を介して神経突起伸長を制御するという新規のメカニズムを見出した点で、高く評価できる。

平成 28 年 2 月 22 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。