

論文概要

○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

○指導教員

人間総合科学研究科 生命システム医学専攻 金保安則 教授

(所属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科 生命システム医学専攻

(氏名) 鈴木 篤史

目的

神経細胞は高度に分化した軸索、樹状突起と呼ばれる他の細胞にはない特徴的な構造（神経突起）を有することで情報の伝達を可能とする。神経突起の形成メカニズムを解明する鍵は、成長円錐と呼ばれる神経突起先端部の構造体にある。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を起こすことでその形態を変化させ、神経突起の伸長速度や方向性を決定している。これまでの研究により、Rhoファミリーの下流シグナル伝達系は明らかになってきたが、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、その分子メカニズムには不明な点が多い。

細胞膜はリン脂質を主要構成成分とした脂質二重層を形成している。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局在する。しかし近年の研究から、PEは細胞膜外層に移動することで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の伸長時においても、成長円錐での細胞骨格系の再構築にリン脂質の細胞膜内での移動が関わっている可能性が考えられた。そこで本研究では、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・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

PEが神経突起の伸長において細胞膜外に局在するのかを検討するため、細胞膜外層に存在する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、アクチン骨格が重合している局所で、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蛋白質のうちCdc42の活性を上昇させること、また成長円錐のアクチン細胞骨格の再構築を制御していることが明らかとなった。また、このPEの細胞膜外層への露出がどのような細胞外シグナルによって誘引されるのかを検討すると、成長因子であるBDNFやガイダンス因子であるNetrin1、細胞外Ca²⁺の流入によってPEの細胞膜外層への局在が促進されることが分かった。

PE の細胞膜内局在変化は一方向的なものではなく、両方向へ移動することで正常な細胞機能を発揮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分子であるフリッパーゼの探索を行ったところ、P4-ATPase ファミリーのうち ATP9A が神経突起伸長時の成長円錐に発現することを発見した。また、ATP9A は神経突起のうち軸索の伸長や分岐形成を制御することを見出した。さらに 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 の活性を制御していることを明らかとした。また、PE の膜内輸送活性が欠如した ATP9A 変異体の過剰発現が、神経突起の伸長を抑制することを明らかにした。

上記の結果より、PE の細胞膜内における局在が神経突起の伸長に深く関わっていることが明らかとなった。このことから、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したところ、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。このことから、発生期の神経細胞では、PE が盛んに合成されることが神経突起の伸長に重要ではないかと考え、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 合成が神経突起の伸長を制御するかを検討した。その結果、Etnk1 は神経突起の伸長を促進することを見出した。

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る。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 によるものであることが示唆された。

結論

本研究結果より、細胞膜リン脂質 PE の存在量および細胞膜内での局在が神経突起の伸長に重要な働きを担っていることが明らかとなった。本研究は、神経突起が伸長する分子メカニズムの一端を明らかにしたのみならず、アクチン細胞骨格系の再構築における細胞膜リン脂質の役割を解明した点で重要である。また臨床的には、神経ネットワークの発達異常を伴う疾患との関連が考えられ、今後の研究に役立つと考えられる。