博士（獣医学）　駒　込　理　佳

学 位 論 文 題 名

神経系細胞の分化における低分子量GTP結合タンパク質Rhoの役割に関する研究

学位論文内容の要旨

低分子量GTP結合タンパク質のRhoは、主に細胞骨格の成分であるアクチンの集合を調節することで、細胞の形態や運動を調節している事が知られている。脳にRhoは豊富に存在するので、神経系細胞の機能や分化にもRhoは重要な役割を果たしていることが示唆される。そこで、本研究では、Rhoと神経系細胞の分化について、培養細胞を用いた細胞レベル、および脳の生後発達に焦点を当てた個体レベルでの実験を行い、以下の結果を得た。

1）ボツリヌス菌が産生するC3酵素は、Rhoを特異的に不活性化することが知られている。褐色細胞腫のPC12細胞にC3を添加して培養すると、神経突起形成と類似の形態変化とAChE活性の上昇がみられた。別の神経芽細胞腫NG108-15細胞とグリア細胞腫のC6細胞でもC3の添加によって突起形成が見られた。この時、NG108-15細胞で分化指標酵素であるAChEとChAT活性が上昇し、C6細胞ではグリアの分化指標酵素であるCNP活性が上昇した。従って、Rhoの不活性化により、神経系の培養細胞では形態的にも生化学的にも分化がもたらされることが明らかとなった。Rhoの下流にプロテインキナーゼAが関与するかどうかを、NG108-15細胞でプロテインキナーゼAの阻害剤H-89を用いて調べたところ、C3による形態変化は影響されなかったが、AChEとChATの活性上昇が抑制されたので、Rhoの不活性化による神経系細胞の生化学的な分化にはプロテインキナーゼAが関与することが示唆された。

2）出生後の脳において神経系細胞は短時間の間に急激に分化・成熟するが、この発達過程に

おいてRhoが何らかの役割を果たす可能性について、0-2週令のマウスの脳ホモジネートを用いて調べた。AChEやChAT、CNPなどの神経とグリア細胞の分化指標酵素の活性は生後上昇することが確認できたので、これらの細胞が生後数週間で急激に分化・成熟していくことが確認できた。Rhoは活性化状態と不活性化状態では細胞内局在が変化するので、脳ホモジネートを細胞質と膜画分に分画してそれぞれのRhoのタンパク質量をウェスタンブロットにより測定した。RhoAは両方の画分に存在しており、細胞質画分では週令による変化は見られなかったが、細胞膜画分では週令依存性の減少が見られた。RhoBは膜画分にのみ局在しており、やはり週令依存性の減少が見られた。細胞膜には活性化状態のRhoが存在していると考えられるので、生後発達に伴いRhoは不活性化状態へ向かうことが示唆される。Rhoの不活性化を促進するRhoGDIのタンパク質量は、細胞質でも膜画分でも生後の大きな変動は見られず、RhoGDIが積極的にはRhoの局在を変化させていないことが示唆された。Rhoの標的タンパク質である、citronとRock-2のタンパク質量はRhoとは逆に生後増加する傾向が見られた。

以上のように、細胞培養系を用いた実験でRhoの不活性化による神経系細胞の分化が起こり、実際に生体内でも、脳の分化と成熟が起きる生後においてRhoタンパク質の膜画分での減少という、Rhoの不活性化を示唆する現象が見られるので、Rhoは神経系細胞の分化に深いかかわりを持っていると考えられる。今後、Rhoへのシグナルの伝達および下流への情報伝達にどのような分子が関与するのかを解明していくことにより、神経の分化機構への理解が深まるであろう。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　斉　藤　昌　之

副　査　　教　授　　岩　永　敏　彦

副　査　　助教授　　木　村　和　弘

副　査　　教　授　　首　藤　文　栄（岩手大学農学部）

学　位　論　文　題　名

神経系細胞の分化における低分子量GTP結合タンパク質Rhoの役割に関する研究

低分子量GTP結合タンパク質のRhoは、主に細胞骨格の成分であるアクチンの集合をさせることで、細胞の形態や運動を調節している事が知られている。Rhoは脳に豊富に存在するので、神経系細胞の機能や分化にも重要な役割を果たしていることが示唆される。そこで本研究では、Rhoと神経系細胞の分化について、培養細胞を用いた細胞レベル、および脳の生後発達に焦点を当てた個体レベルでの実験を行い、以下の結果を得た。

1、ボツリヌス菌が産生するC3酵素は、Rhoを特異的に不活性化する。褐色細胞腫のPC12細胞にC3を添加して培養すると、神経突起形成と類似の形態変化と分化指標酵素であるacetylcholine esterase (AChE)活性の上昇がみられた。別の神経芽細胞腫NG108-15細胞とグリア細胞腫のC6細胞でもC3の添加によって突起形成が見られた。この時、NG108-15細胞でAChEとcholine acetyltransferase(ChAT)の活性が上昇し、C6細胞ではグリアの分化指標酵素である2',3'-cyclic nucleotide3'-phosphohydrolase (CNP)活性が上昇した。従って、Rhoの不活性化により、神経系の培養細胞では形態学的にも生化学的にも分化がもたらされることが明らかとなった。Rhoの下流にプロテインキナーゼAが関与するかどうかを、この酵素の阻害剤H-89を用いてNG108-15細胞で調べたところ、C3による形態変化は影響されなかったが、AChEとChATの活性上昇が抑制されたので、Rhoの不活性化による神経系細胞の生化学的な分化にはプロテインキナーゼAが関与することが示唆された。

2、出生後の脳において神経系細胞は短時間の間に急激に分化・成熟するが、この発達過程においてRhoが何らかの役割を果たす可能性について、0-2週令のマウスの脳ホモジネートを用いて調べた。AChEやChAT、CNPなどの神経とグリア細胞の分化指標酵素の活性は生後上昇することが確認できたので、これらの細胞が生後数週間で急激に分化・成熟していくことが確認できた。Rhoは活性化状態と不活性化状態では細胞内局在が変化するので、脳ホモジネートを細胞質と膜画分に分画してそれぞれのRhoのタンパク質量をウェスタンブロットにより測定した。RhoAは両方の画分に存在しており、細胞質画分では週令による変化は見られなかったが、細胞膜画分では週令依存性の減少が見られた。RhoBは膜画分にのみ局在しており、やはり週令依存性の減少が見られた。細胞膜には活性化状態のRhoが存在していると考えられるので、生後発達に伴いRhoは不活性化状態へ向かうことが示唆される。Rhoの不活性化を促進するRho GDP dissociation inhibitor (GDI)のタンパク質量は、細胞質でも膜画分でも生後の大きな変動は見られず、RhoGDIが積極的にはRhoの局在を変化させていないことが示唆された。Rhoの標的タンパク質である、citronとRock-2のタンパク質量はRhoとは逆に生後増加する傾向が見られた。

以上のように本論文は、Rhoの不活性化による神経系細胞の分化・成熟を示したものであり、獣医学、とりわけ神経生理学への貢献が大である。よって審査員一同は駒込理佳氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格が十分あると認めた。