

論文内容の要旨

申請者氏名 Ménager Céline

Recent experiments in various cell types such as mammalian neutrophils and *Dictyostelium discoideum* amoebae point to a key role for the lipid product of PI 3-kinase, PIP₃, in determining the cell polarity. In neurons, as a consequence of the elongation of one neurite, the axon is specified and the cell acquires its polarity. To test the hypothesis that PI 3-kinase and PIP₃ may play a role in neuronal polarity, and especially in axon specification, she observed the localization of PIP₃ visualized by Akt-PH-GFP in developing hippocampal neurons. She found that PIP₃ accumulates in the tip of the growing processes. This accumulation is inhibited by addition of PI 3-kinase inhibitors. Those inhibitors, consistently with a role of PIP₃ in process formation and elongation, delay the transition from stage 1 neurons to stage 3 neurons, and both axon formation and elongation. Moreover when the immature neurite contacts a bead coated with laminin, a substrate known to induce axon specification, PIP₃ accumulates in its growth cone followed by a rapid elongation of the neurite. In such conditions, the addition of PI 3-kinase inhibitors inhibits both PIP₃ accumulation and future axon elongation. These results suggest that PIP₃ is involved in axon specification, possibly by stimulating neurite outgrowth. In addition, when a second neurite contacted the beads, this neurite rapidly elongates whereas the elongation of the first laminin-contacting neurite stops, consistently with the hypothesis of a negative feedback mechanism from the growing future axon to the other neurites.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Ménager Céline

近年、哺乳動物の好中球や細胞性粘菌に代表されるいくつかの細胞種を用いた研究により、細胞の極性の形成において PI 3-kinase の産生物 PIP₃ が主要な役割を果たすことが示唆されている。神経細胞では、一本の神経突起が急速に伸長した結果、軸索への運命決定がなされ、神経細胞が極性を獲得することが知られている。申請者は、この神経細胞の極性形成、特に軸索の運命決定において、PI 3-kinase 及び PIP₃ が何らかの役割と担うという仮説を検証するために、PIP₃ に結合する Akt-PH-GFP を用いて発達段階の神経細胞における PIP₃ の局在を検討した。申請者は、まず急速に伸長しつつある神経突起の先端に PIP₃ が蓄積することや、この蓄積が PI 3-kinase の阻害剤によって抑制されることを見出した。また、これら阻害剤が軸索の運命決定がなされる時期（発生段階のステージ1からステージ3）において、軸索の形成と伸長の遅延を引き起こしたことから、PIP₃ が神経突起形成と伸長に何らかの役割を担うことを示唆した。さらに、軸索形成を誘導することが知られる細胞外基質ラミニンを用いてビーズをコートし、発生段階の神経細胞の培養液中に加えたところ、ラミニンコートしたビーズに未成熟な神経突起が接すると、PIP₃ は突起の先端の成長円錐に濃縮し、その後その未成熟な突起は急速に伸長することを見出した。また、同条件で PI 3-kinase 阻害剤が PIP₃ の濃縮と軸索の伸長を阻害することから、PIP₃ が神経突起の伸長を促進することによって、軸索の運命決定に関与していることが示唆された。その上、最初の未成熟な神経突起がラミニンコートされたビーズに接してから、別の未成熟な神経突起がビーズと接着すると、後者の神経突起は急激に伸長を始め、前者の神経突起はその伸長を抑制されることが明らかとなった。これらの結果は急速に伸長する将来の軸索から他の複数の神経突起に対してネガティブなフィードバック機構が存在するという仮説と一致していると考えられる。これらの結果は PI 3-kinase の活性と PIP₃ の産生と局在が神経極性の形成に重要であることと、PIP₃ がネガティブフィードバック機構のシグナルの最上流に位置する候補分子であり、このネガティブフィードバック機構が

軸索の運命決定を担う可能性を示唆していると考えられる。

本論文は PI 3-kinase による PIP₃ 産生が軸索形成の初期過程に重要な役割を果たしていること示しており、未解明とされてきた神経極性形成時のごく初期の分子メカニズムを明らかにしている。以上のように本論文は、今後の神経細胞極性形成、ひいては神経回路網形成機構の分野に十分貢献するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。