

論文内容の要旨

申請者氏名 猪 口 徳 一

大脳発生において脳室帯に存在する神経幹細胞は自己複製を行うと共に、一部の細胞が脳室帯から皮質側へと移動し、成熟したニューロンへと分化する。これら一連のプロセスが細胞骨格や細胞内外のシグナル分子によって適切に制御されることで最終的に6層からなる大脳皮質を形作る。すなわち、それらの分子の遺伝的変異や活性の変動は大脳皮質形成異常へとつながる。近年、GPR56が大脳皮質形成異常を示す両側性前頭頭頂多少脳回症で変異が見られる遺伝子として報告された。本研究では、GPR56の発現および生理的役割を明らかにすることを目的として解析を行った。

GPR56はmRNAの発現が神経前駆細胞に認められているものの、リガンド不明のオーファンGタンパク質共役受容体であり、そのシグナル伝達機構も不明であった。申請者は、大脳組織を用いたイムノプロット解析と免疫組織染色を行ない、GPR56が発生初期に発現量が高く、神経前駆細胞の存在する脳室帯に発現していることを示した。次に、GPR56の下流で働くシグナルを解析するために、HEK293T細胞にGPR56を発現させ、さまざまなプロモーター配列を用いたレポーターアッセイを行なった。その結果、SREとNF- κ B応答配列を介した転写活性の上昇が認められた。そこで、SREの活性を指標に、種々の特異的な阻害分子を用いた解析を行い、GPR56によるSREの活性はG α 12/13とRhoを介していることを明らかにした。さらに、細胞内でRhoの活性型が増加すること、Rhoの活性化に伴いアクチン骨格の再構築が誘導されることを、それぞれGTP型のRhoに特異的に結合するmDiaRBDを用いたPull down assay、F-actinの染色によって明らかにした。

次に、神経前駆細胞におけるGPR56の役割を調べるため、アデノウイルスを用いて神経前駆細胞にGPR56を発現させ、GPR56が発現量依存的に神経前駆細胞の遊走を抑制することを示した。さらに、神経前駆細胞に内在的に発現しているGPR56を活性化させるために、GPR56のN末細胞外領域を抗原とした、GPR56に対するアゴニスト抗体を見出した。この抗体はHEK293T細胞において、GPR56を発現させた細胞でのみ、濃度依存的にSREの転写活性を増加させ、また、抗原によってその効果が消失した。さらに、抗GPR56抗体は神経前駆細胞の遊走を阻害した。この阻害効果は、GPR56をノックダウンすることで見られなくなることから、特異的に内在性GPR56を刺激することができることが示された。最後に、この抗体を用いて神経前駆細胞の遊走抑制におけるGPR56のシグナルの関与を調べた。抗GPR56抗体は神経前駆細胞の遊走を阻害するが、G α 12/13とRhoの作用を阻害することで、その遊走阻害は完全に解除された。以上の結果よりGPR56がG α 12/13とRhoを介して神経前駆細胞の遊走を負に制御することが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 猪口徳一

Gタンパク質を介するシグナル伝達は、神経系、心臓血管系や免疫系などの組織・細胞の機能だけでなく、個体発生にも広く関与していることが知られている。近年、Gタンパク質シグナルが脳皮質形成時の細胞移動や細胞増殖に重要な役割を果たしていることがノックアウトマウスの解析や、アゴニスト、阻害分子を用いた実験より報告されつつあるが、まだ多くの不明の部分が残されている。申請者は脳皮質形成に関与することが遺伝学的に示唆されたオーファンGタンパク質共役受容体GPR56の解析を行い、神経前駆細胞におけるGPR56の生理的役割とそのシグナル伝達機構を初めて明らかにした。

まず申請者は、GPR56が神経前駆細胞に多く発現していることを細胞、組織レベルで明らかにした。次に、レポーターアッセイの結果から、GPR56がSREとNF- κ B応答配列依存性の転写活性の上昇を引き起こすことを明らかにした。また、この転写活性上昇がG α 12/13とRhoの阻害分子を共発現させることで見られなくなることを示し、GPR56がG α 12/13と共役し、Rhoを介してシグナルを伝達していることを明らかとした。さらに、GPR56によるRhoの活性化を生化学的に示すと共に、Rhoを介するアクチン細胞骨格の再構築が起こることも実験的に証明した。申請者は次に、神経前駆細胞でのGPR56の生理的機能を明らかにするため、GPR56に対するアゴニスト抗体を用いることで、内在性の受容体を活性化する手法を構築した。この抗体を用いてGPR56が神経前駆細胞の遊走を負に制御していること、更にその制御はG α 12/13とRhoを介したシグナルによることを明らかにした。

Gタンパク質共役受容体と脳皮質形成異常との関連が遺伝学的に示唆されたのはGPR56が最初であるが、申請者は不明であったその下流のシグナル伝達機構を明らかにしたのみならず、そのシグナルを介して神経前駆細胞の遊走を負に制御されていることを明らかにした。この知見に基づき、GPR56の変異が見出されたヒトの両側性前頭頭頂多少脳回症の発症機構の解明が進むものと期待される。さらに、GPR56はその発現量が癌の転移能にも関与していることが知られており、本論文で明らかとなった知見が癌の転移浸潤のメカニズムの解明にも大きく貢献すると思われる。

以上のように、本論文はGタンパク質シグナルによる脳発生時の神経前駆細胞の移動制御機構について新たな知見を示すものであり、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。