

論文内容の要旨

申請者氏名 鳥山 真奈美

大脳皮質の発生時には、脳室帯に存在する神経幹細胞が最終分裂を終えた後、神経前駆細胞が生みだされる。神経前駆細胞は脳室帯から皮質側へと垂直方向に移動し、最終的に成熟したニューロンへと分化する。いくつかの細胞の移動において細胞骨格や細胞接着を制御する分子の働きが細胞内外のシグナル分子によって調節されることが明らかになりつつあるが、最終的に6層からなる大脳皮質形成に至る過程の神経前駆細胞の移動の制御機構は未解明の部分が多い。ダブルコルチン (Doublecortin, DCX) は大脳皮質形成異常を示す滑脳症の原因遺伝子として同定され、さらにcAMP依存性タンパク質リン酸化酵素 (PKA) によってリン酸化されるDCXの47番目のセリンがアルギニンに置換された変異 (S47R) が滑脳症患者において見つかった。本研究では大脳皮質が形成される分子メカニズムの解明を目指し、PKAによるDCXのリン酸化と細胞遊走および細胞骨格との関連を調べた。

まず初めに、二次元電気泳動法を用いてDCXのリン酸化を解析した。神経前駆細胞をPituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) で刺激すると、PKAを介したDCXのリン酸化の亢進が認められた。非リン酸化型変異体S47AではPKA依存性のリン酸化は見られなかった。次に、細胞遊走におけるPKAによるリン酸化DCXの役割を解析した。神経前駆細胞の内在性DCXをノックダウンし、続いてDCXの野生型やSer47変異体を発現させた。その結果、疑似リン酸化型変異体S47Eの発現は神経前駆細胞の遊走を促進した。PACAPがDCXの微小管への親和性を変えるか検討するために細胞内の遊離チューブリンと微小管チューブリンをそれぞれ分画し、これらの画分中のDCXとチューブリンをウエスタンブロットで検出した。その結果、PACAP刺激した細胞では微小管画分に含まれるDCXの量が著しく減少していた。細胞中のアクチンの動態を観察するためにmCherry融合DCXとEGFP融合アクチンを神経前駆細胞に発現させ、これらのタイムラプスイメージング解析を行った。野生型DCXとS47A、S47R変異体は微小管と共局在していたが、S47E変異体は微小管よりも細胞質全体に存在しており、S47Eの発現はアクチン再編成を伴うラメリポディアを誘導した。このラメリポディアはRac1のドミナントネガティブ体を共発現することで抑制された。次にPAK1-CRIBドメインを用いたプルダウン法により、PACAP刺激やS47E変異体の発現に伴って活性型Rac1が増加することや、S47E変異体はRac1に対するグアニンヌクレオチド交換因子Asef2と相互作用することを見出した。以上の結果から、DCXが「微小管の安定化・不安定化」を調節するだけでなく、Gタンパク質シグナルによりPKAを介してリン酸化されることで「Rac1の活性化を介したアクチン繊維の動態制御」を行うことが初めて明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 鳥山 真奈美

ダブルコルチン (doublecortin, DCX) は大脳皮質の構造異常を特徴とする滑脳症の原因遺伝子として同定されたが、どのようなメカニズムで滑脳症が発症するのか、その詳細は未だ明らかにされていない。従って大脳皮質発生時期のDCXの機能や神経前駆細胞の遊走制御における役割を研究することは、大脳皮質がどのようなメカニズムで形成されるのかを解明する手がかりとなる。

申請者は、cAMP依存性タンパク質リン酸化酵素 (PKA) によりリン酸化されたDCXの機能を解析し、リン酸化によってDCXが獲得する新たな機能を初めて明らかにした。二次元電気泳動法を用いた解析より、脳内ペプチド (Pituitary adenylate cyclase activating peptide, PACAP) が神経前駆細胞内でDCXのリン酸化を亢進することを見出した。このPACAP刺激、あるいはリン酸化型DCXであるS47E変異体の発現は神経前駆細胞の遊走を促進した。またPACAP刺激は野生型DCXの微小管への親和性を減弱させること、またS47E変異体は野生型や非リン酸化型S47A変異体、また滑脳症患者で同定されたS47R変異体に比べて微小管への親和性が有意に減少していることを示した。さらに、PACAP刺激した際もしくはS47E変異体を発現させた細胞ではGTPが結合した活性型Rac1が増加しており、アクチン骨格の再編成を伴うラメリポディアの形成が誘導されることが明らかとなった。またリン酸化されたDCXはRac1のグアニンヌクレオチド交換因子Asef2と相互作用し、Asef2とS47Eの共発現は活性型Rac1を増加させることも明らかとなった。つまり、DCXがPKAによってリン酸化されることで、微小管の動態調節だけでなくアクチン骨格の再編成も行う機能を獲得することが明らかとなった。S47R変異が同定された滑脳症患者では、DCXがPKAによってリン酸化されず、微小管ないしアクチン骨格の制御が行われないために疾患が発症した可能性が考えられる。

これまでに、DCXの機能を制御する外部シグナルについては明らかではなく、今回申請者が得た結果は、大脳皮質発生時における神経前駆細胞の遊走制御機構をより詳細に理解するための重要な知見であると考えられる。また、この知見は滑脳症の詳細な発症機構が解明されることに大きく貢献し、今後の有効な治療法の開発基盤となる可能性がある。DCXは神経前駆細胞の遊走制御だけでなく、神経軸索の伸長にも関与していると報告されていることから、本論文で明らかとなった知見は、神経軸索の伸長がどのようなメカニズムで制御されているのかを解明する手掛かりにもなる。

以上のことから、本論文は大脳発生時における神経前駆細胞の遊走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。