

氏名（本籍）	こいぬま しんご（埼玉県） 鯉沼真吾
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	甲第1164号
学位授与の日付	2018年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	cAMPにより誘導されるPKAとp190Bの 活性化が細胞膜上のTC10を不活性化し神経 突起伸展を促進する

論文審査委員	（主査）教授 中村 岳史
	教授 北村 大介 教授 後飯塚 僚
	准教授 中野 直子 教授 古市 貞一

論文内容の要旨

cAMPは、神経突起伸展において中心的な役割を果たす。神経突起伸展の過程では、小胞輸送のシステムを用いて成長円錐に膜が供給される。しかし、膜輸送の調節につながるcAMPシグナリングは未知のままである。TC10は、ある特定のタイプの小胞輸送に不可欠なRhoファミリーのGTPaseである。所属研究室の最近の研究で、NGFによるPC12細胞の神経突起伸長におけるTC10の役割を示している。本研究では、神経突起伸展過程におけるcAMPとTC10との間の機能的なつながりを調べた。まずcAMPによるTC10の活性変化を調べた。細胞膜上のTC10活性は、cAMP添加後に急激に減少した。また、cAMPを添加したPC12細胞の神経突起伸展を観察したところ、伸長する突起の先端部特異的にTC10が不活性化された。次にcAMPによる神経突起伸展におけるTC10欠損の影響を調べた。TC10を欠損させたPC12細胞ではcAMPによる神経突起伸展が強く抑制された。このTC10欠損による神経突起伸展の抑制は野生型のTC10の発現により回復するが、一方で恒常活性型変異体のTC10では回復しなかった。このことは所属研究室が提案している「細胞膜近傍でのTC10のGTP加水分解が小胞融合を促進することによって神経突起伸展を促進する」というモデルを支持している。最後に、cAMPからTC10の不活性化に至るシグナル伝達経路の解明を行った。cAMPによるTC10不活性化はPKAを介することがわかった。驚いたことに、TC10だけでなくRhoAもまたcAMPにより不活性化された。これらの分子の不活性化はp190A RhoGAPではなくp190B RhoGAPを介すること、またcAMPによりp190Bのみが細胞膜にリクルートされることがわかった。さらにSTEFの欠

損および Rac1-N17 発現は、cAMP による TC10 不活性化を抑制した。これらのことから、PKA-STEFG-Rac1-p190B 経路を介した、細胞膜上での TC10 と RhoA の不活性化は cAMP による神経突起伸長に重要な役割を果たしている。

論文審査の結果の要旨

ヒトの脳は千数百万個の神経細胞からなるネットワークであり、その動的な接続が認知などの高次機能を可能にしている。発生過程での神経ネットワークの形成において神経突起伸長は最も基本的な過程の一つであり、そのメカニズムの理解は大きな意味を持つ。神経突起伸長では成長円錐での細胞骨格の再編成と膜付加の2つが中心的な役割を果たすが、膜輸送制御については多くの部分が不明である。神経突起が伸びるには膜付加による局所的な表面積の増大が必要であり、成長円錐まで運ばれてきた小胞が細胞膜に融合することで膜が供給される。本研究の対象である Rho ファミリーG 蛋白質 TC10 は小胞の細胞膜への輸送に関与する。また活性型 TC10 は、小胞の繫留に働くエクソシスト複合体のコンポーネントである Exo70 と結合する。TC10 と Exo70 は神経突起伸長に関わると報告されているが、具体的なメカニズムはよくわかっていない。申請者の所属研究室では、神経成長因子による突起伸長の系を使って、「小胞上の TC10 活性低下によるエクソシスト複合体の崩壊がその小胞の膜融合を開始する」というモデルを提案している。本研究では、神経成長因子と同様に重要な突起伸長促進因子である cAMP に着目し、上述のモデルが cAMP 投与の場合も適用できるか、またそのモデルで働く場合には神経成長因子と cAMP のシグナル伝達経路はどの程度共通しているのかを明らかにする目的で解析を行った。

まず、cAMP を添加した神経系細胞で細胞膜上の TC10 活性が低下するかどうか、またその活性の低下は cAMP 添加による神経突起伸長に必要かどうかを検討した。細胞膜上の TC10 活性は、cAMP 添加後に急激に減少した。また、cAMP を添加した PC12 細胞では伸長する突起の先端部で特異的に TC10 が不活性化されていた。次に cAMP による神経突起の伸長における TC10 ノックダウンの影響を検討した。TC10 をノックダウンした PC12 細胞では cAMP による神経突起伸長が強く抑制された。この TC10 ノックダウンによる神経突起伸長の抑制は野生型の TC10 を発現させることでレスキューできるが、恒常活性型変異体の TC10 の発現ではレスキューできなかった。このことは「細胞膜近傍での TC10 の GTP 加水分解が小胞融合を促進することによって神経突起伸長を促進する」というモデルを支持しており、神経成長因子と cAMP の両者は、神経突起伸長を誘導する際に細胞膜上の TC10 活性が低下しその活性低下が突起伸長に必要であるという点で共通している。

次に、PC12 細胞における cAMP から TC10 の不活性化に至るシグナル伝達経路を解

析した。複数の手法により cAMP による TC10 不活性化は PKA を介することがわかった。また TC10 だけでなく RhoA も cAMP により不活性化された。これらの分子の不活性化は p190A RhoGAP ではなく近縁の p190B RhoGAP を介することが明らかになった。予想どおり、cAMP により p190B だけが細胞膜にリクルートされた。さらに STEF のノックダウンおよび Rac1-N17 の発現は、cAMP による TC10 不活性化を低下させた。以上の結果から、cAMP を加えた PC12 細胞では PKA-STEFA-Rac1-p190B というシグナル経路により、細胞膜上での TC10 と RhoA の不活性化が起こり、その不活性化が神経突起伸長に働くと結論した。

申請者たちは以前に NGF 刺激した PC12 細胞では NGF の下流に Rac1-ROS-p190A という経路が存在することを示しており、NGF 刺激と cAMP 添加とで伝達機構に重なりはあるが、キーとなる因子が異なっていた。NGF と cAMP の間の機能的類似性と下流シグナルの分岐の具体例を明らかにしたことは、神経発生や再生の分野において個々の神経突起伸展制御因子の働き方の違いをシグナル伝達機構の多様性からどう理解するかという興味深い課題に手がかりを与えるものと評価できる。cAMP は臨床応用も検討されている強力な神経軸索再生因子である。本研究で明らかになったメカニズムのある部分は、cAMP が役割を果たしているとされる個体の軸索再生でも機能していると考えられる。したがって本研究が、軸索再生の分野において TC10 の機能の研究を推進するきっかけになると期待される。以上のことから本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認められる。