

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小林 陽子

中枢神経系で最も数の多いグリア細胞であるアストロサイトは、神経細胞の支持作用、血液脳関門の形成など神経活動を支える重要な機能を有しており、脳損傷時などには、周囲の神経細胞の置かれた状況に応じて自らの形態と機能をダイナミックに変化させることができる。これまでに神経疾患において、神経細胞の形態や機能は詳細に解析されてきたが、アストロサイトをはじめとするグリア細胞については報告が少ないことから、アストロサイトの細胞形態変化の理解は重要であると考えられている。しかしながらこれらの細胞形態変化、それに伴う機能変化のメカニズムの詳細は明らかになっていなかった。本研究では、新規 Rho GTPase 活性化蛋白質 Nadrin(Neuron-associated developmentally regulated protein)がアストロサイトにも発現していることを見出したことから、その機能解析を通じ、アストロサイトの形態変化のメカニズムおよび細胞骨格系制御機構の解析を目的に行なわれており、序論およびそれに続く六章から成る。

まず序論では、脳神経系におけるアストロサイトの機能分化の重要性について概観し、また Rho ファミリーG 蛋白質の細胞骨格系制御における機能について詳しく述べている。Nadrinが Rho ファミリーG 蛋白質の活性を負に制御する RhoGAP 領域を有することから、上記の点とあわせて、アストロサイトにおける Nadrin の機能を解明することの意義について述べている。

第二章では、アストロサイトの形態変化における Nadrin の機能について述べている。まず初代培養のアストロサイトが、細胞内 cAMP 濃度により、分化マーカーである GFAP が発現が上昇すると同時に、急速に細胞の形態変化させて分化する特徴を生かし、cAMP アナログである dBcAMP を用いて、アストロサイトの形態変化に対する影響を評価するアッセイ系を確立したことを述べている。この系を用いて、Nadrin の形態変化および機能分化に対する影響の検討を行ない、Nadrin がアストロサイトの形態変化および機能分化を促進する分子であることを見出している。

第三章では、Nadrin が細胞の形態変化など、アクチン骨格系を制御している Rho ファミリーG 蛋白質の活性を負に制御する RhoGAP 領域を有すること、さらにアストロサイトで得られた結果から、Rho ファミリーG 蛋白質の活性制御を通して、細胞骨格系の制御に関与していることが考えられたことから、それまで不明であった細胞内における Nadrin の RhoGAP 活性について検討を行なっている。まず細胞内における Nadrin の RhoGAP 活性について検討するために、GST-pull down 法を Rho ファミリーG 蛋白質の活性を評価する系として確立している。この系を用いた結果から、Nadrin は RhoA に対して直接 RhoA の GTPase 活性を促進し、RhoA を不活性化していることが示されている。また Rac および Cdc42 に対しては GAP 活性を示さず、Rac および Cdc42 の活性化する可能性を見出して

いる。一般に RhoA と、Rac および Cdc42 の活性は拮抗すると考えられているが、その制御機構については不明な点が多いことから、Nadrin が Rac、RhoA 間の活性制御を直接担う分子である可能性が示唆されたことにより、RhoA、Rac および Cdc42 の活性を制御する機構およびシグナル伝達経路の解明の糸口になるものと考えられる。

第四章では、Nadrin の Rho GAP 活性の制御機構について検討を行なっている。この章で Nadrin が N 末端側の coiled-coil 領域同士で相互作用して 2 量体化することを見出し、さらに N 末端側と C 末端側が相互作用し、GAP 領域をマスクすることで自ら GAP 活性を抑制しているモデルを提唱している。この相互作用は細胞運動性の活性化シグナルによって、解離することが示されたが、残念ながら、解離の詳細なメカニズムは今後の課題として残されている。しかしながらこれまで GAP 活性の分子制御機構については報告がなく、GAP にも分子活性制御機構が存在し、その活性が厳密に制御されていることが示唆されたことは大きな意義をもつと考えられる。さらに Nadrin に相互作用する因子として、EBP50 (ERM binding phosphoprotein 50) および ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) ファミリー蛋白質を見出している。これらの分子は膜受容体等と直接あるいは間接的に結合し、アクチンと相互作用することで細胞膜と細胞骨格系をつなぐ役割を担うと考えられている分子であり、Nadrin の EBP50/ERM との複合体は、アストロサイトにおいては、cAMP で形態変化を誘発した時に ERM と複合体を形成していることを示している。従って Nadrin は RhoGAP 活性を活性化するシグナルにより N 末端と C 末端が解離し、EBP50 と結合して ERM と複合体形成を形成し、同時に、ERM とリンクしている RhoA を不活性化することにより、アクチン骨格系の制御に関与しているが示唆されたことを述べている。

第五章では、Nadrin と脳神経疾患との関与について、特にアストロサイトの機能分化について検討を行なっている。てんかんの人工的モデルであるキンドリングでは、アストロサイトの機能分化が亢進することから、キンドリングを動物に形成させて、その動物を用いて生体内におけるアストロサイトの形態変化および機能分化に対する Nadrin の影響を検討し、生体内においても関与している可能性が高いことを示している。

以上、本論文はこれまで注目されていなかったアストロサイトの機能分化について、新規 Rho GTPase 活性化蛋白質 Nadrin の分子機能の解析を通し、そのメカニズムの一端を解明したことから、てんかんなどの脳神経疾患を理解するうえで、学術上、応用上貢献するところが少ない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。