

論文の内容の要旨

論文題目 Pak1 is involved in the regulation of neurite growth in the
 cortical neurons

和訳 神経細胞の突起形成における Pak1 の関与

指導教官 御子柴 克彦 教授

 東京大学大学院医学系研究科

 平成 10 年 4 月入学

 医学博士課程

 脳神経医学専攻

氏名 林 周宏

【序論】 神経細胞における樹状突起 (dendrite) 形成は、神経細胞が成熟し、神経回路網を形成していく過程に不可欠である。最終分裂を終えた神経細胞はそれぞれの定められた位置に移動した後、即座に複数の樹状突起と 1 本の軸索を適切な標的に向かって伸ばし始める。樹状突起と軸索の選択的結合・再構成により、脳は徐々にその神経回路網を形成していく。大脳皮質における錐体神経細胞の樹状突起は皮質表層へと伸びる 1 本の apical dendrite と、細胞体の基部から水平に伸びる複数の basal dendrite からなり、これらの樹状突起は他の神経細胞から様々な情報を得るために複雑にはりめぐらされる。この樹状突起形成を制御する分子メカニズムについてはまだよく分かっていないが、近年、Rho ファミリー GTPase が樹状突起形成に関与しているという報告がなされている。

Rho ファミリー GTPase は真核生物においてアクチン骨格形成を制御する分子群として知られており、RhoA、Rac1、Cdc42 がよく研究されている。培養細胞において RhoA はストレスファイバーやそれがアンカーする細胞接着斑の誘導に関与することが知られている。また、Rac1 は細胞膜ラッフルやラメリポデ

フィロポディアの形成、Cdc42 はフィロポディアの形成に関与している。神経細胞においても Rho ファミリー GTPase は樹状突起形成、成長、分枝、突起棘形成に関与しているという報告があり、RhoA は樹状突起を退縮させ、一方、Rac1、Cdc42 は樹状突起形成を促進させる方向に働いていると考えられる。RhoA の下流分子の一つに Rho-kinase/ROCK が報告されており、脳スライス培養において海馬の錐体神経細胞の樹状突起を退縮させる。一方、Rac1/Cdc42 の下流分子としても培養細胞でいくつかの分子が候補として同定され解析されているが、神経細胞における下流分子はいまだわかっていない。

Rac1/Cdc42 の下流分子候補の 1 つ、p21-activated kinase 1 (Pak1) は脳に多く存在するセリン/スレオニンキナーゼとして同定された。哺乳動物においては、6 つの Pak メンバー—Pak1 (α Pak)、Pak2 (γ Pak)、Pak3 (β Pak)、Pak4、Pak5、Pak6—が別々の遺伝子にコードされている。Pak1 は N 末側の制御ドメインと C 末側のキナーゼドメインからなり、活性型 Rac1/Cdc42 の N 末ドメインへの結合により、その構造変化が起こり、自己リン酸化、活性化へと続くと考えられている。培養線維芽細胞において Pak1 はアクチン骨格制御に関与しており、活性型 Pak1 を発現させることによりフィロポディアの形成、細胞膜ラッフル、細胞動態の活発化などが誘導される事が報告されている。また、活性型 Pak1 はストレスファイバーの消失も引き起こし、その効果は活性型 Rac1、Cdc42 により引き起こされる表現型と類似している。

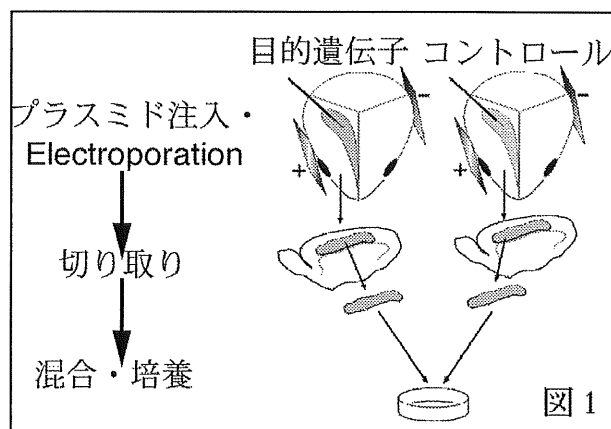
しかしながら、Pak1 は脳に多く存在する分子として発見されたにも関わらず、神経細胞における機能解析は未だなされていない。神経培養細胞 PC12 において Pak1 は突起伸長を促進するという報告がされており、神経細胞での Pak1 の樹状突起形成への関与も示唆されている。そこで、本研究においては、神経細胞における突起 (neurite) 形成の分子メカニズムを明らかにすることを目的に、Pak1 の機能解析を行った。

【結果・考察】 はじめに、生後 0 日マウスの脳、肺、心臓、肝臓、腎臓における、Pak1 及び Rho ファミリー GTPase (Rac1、RhoA、Cdc42) の蛋白質の発現を調べたところ、Pak1 は脳において多量の発現が認められ、腎臓でも少量ながら発現していた。その他の臓器では Pak1 の発現はほとんど認められなかった。次に脳内での Pak1 の局在を調べるため、胎生 16 日、生後 0 日、成体マウスを用い *In situ* hybridization を行った。Pak1 はいずれも大脳皮質、海馬で発現しており、特に胎生 16 日、生後 0 日のマウス大脳皮質では皮質原基に強い発

現が認められた。次いで、大脳皮質の発生過程での Pak1 及び Rac1、RhoA、Cdc42 の発現変化を調べた。すると、これら 4 つの分子はいずれも調べた期間（胎生 14 日から生後 5 日及び成体）で発現が認められ、Pak1 の発現量は胎生期から生後早期では少しずつ減少していたが、成体では胎生期に比べ約二倍の発現量であった。さらに Pak1 と Rac1 の細胞内局在を免疫組織学的手法で調べると、初代神経細胞培養 1 日目、5 日目とも Pak1、Rac1 は細胞質中に存在しており、両者の局在はほぼ一致した。興味深いことに、活性型 Pak1 は growth cone の基部に集積しており、Pak1 が突起形成に関与していることが示唆された。

神経細胞における Pak1 の機能を調べるため、Pak1 の活性型 (CA-Pak1) と機能阻害型 (DN-Pak1) を初代培養神経細胞に発現させることを試みた。遺伝子導入手段として、*in utero* electroporation 法を用いた。まず胎生 15 日目のマウス子宮内胎仔の脳室帯の細胞内に上記の Pak1 を発現させるプラスミド溶液を electroporation により導入した。遺伝子導入された胎仔をそのまま 24 時間、母体内で発生させ、その後、再び摘出した。導入したプラスミドは GFP 遺伝子も同時に発現するように設計しているため、遺伝子導入 24 時間後には遺伝子導入部位は蛍光を発している。Electroporation したマウス胎児大脳皮質より、蛍光を指標に遺伝子導入部位を切り取り、分散・懸濁した。コントロールとして用いた β -galactosidase も同様に、遺伝子導入し、推定導入部位を切り取り、分散・懸濁した。これら 2 種類の細胞群を同量混ぜ、培養皿にまき、培養を行った (図 1)。この方法は従来の遺伝子導入に比べ、以下の利点を持つ。第一に、遺伝子導入効率が安定している点、第二に、培養前に遺伝子導入する為、導入した遺伝子の効果を突起形成開始時から観察できる点、第三に、コントロール遺伝子を導入した細胞と目的遺伝子を導入した細胞を同じ培養皿にまくため、同じ培養条件下でこれらの細胞を比較できる点である。

この方法を用いて Pak1 発現プラスミドをマウス胎児大脳皮質に導入し、培養、固定・免疫染色（導入 Pak1 は FITC、 β -galactosidase は Texas Red で検出）を行った。その結果、CA-Pak1 を導入した神経細胞 (図 3) では、コントロール (図 2) に比べ basal neurite の数と



secondary apical neurite の数の増加を確認した。一方、DN-Pak1 を導入した神経細胞（図 4）では、basal neurite の数と secondary apical neurite の数が減少していた。また、CA/DN-Pak1 とともに突起の長さ、分枝には影響を与えなかった。これらの結果は、Pak1 が神経突起の数の制御に関与している事を示唆している。次に Pak1 の上流因子の 1 つとして知られている Rac1 の効果を調べるため、CA-Rac1、DN-Rac1 についても同様に実験を行った。その結果、CA-Rac1 を導入した神経細胞では突起の数に変化は見られなかったが、DN-Rac1 を導入した神経細胞では突起の数の減少が観察された。Pak1 と Rac1 の上下流の関係を調べるため、CA-Rac1 と DN-Pak1 及び DN-Rac1 と CA-Pak1 の組み合わせを神経細胞に共発現させ、その効果を検討した。実験の結果、CA-Rac1 と DN-Pak1 を共発現させた神経細胞では basal neurite の数と secondary apical neurite の数においてコントロールに比べ有意に減少していた（図 5）。一方、DN-Rac1 と CA-Pak1 を共発現させた神経細胞では basal neurite の数と secondary apical neurite の数の増加が確認された（図 6）。これらの結果は神経突起の数の制御において Rac1 が Pak1 の上流に位置していることを示唆している。また、CA-Pak1 を導入した神経細胞と CA-Rac1 を導入した神経細胞における突起数の結果の違いから、突起数制御における Rac1-Pak1 経路には他の分子の関与も考えられる。

【結論】 本研究において、まず大脳皮質の発生過程における Pak1 の発現変化及び局在を調べた。次に、*in utero* electroporation 法を用いて神経細胞へ Pak1 遺伝子を導入し、Pak1 が神経突起の数の制御に関与しており、突起の長さ・分枝には影響を与えないことを明らかにした。また、突起の数の制御機構で Pak1 が Rac1 の下流として機能していることを明らかにした。今回の検討により Rac1-Pak1 経路が突起の数の制御に関与していることが示されたが、今後は、それ以外の神経突起形成因子と Pak1 の関わりについての解析が必要であると考えられる。

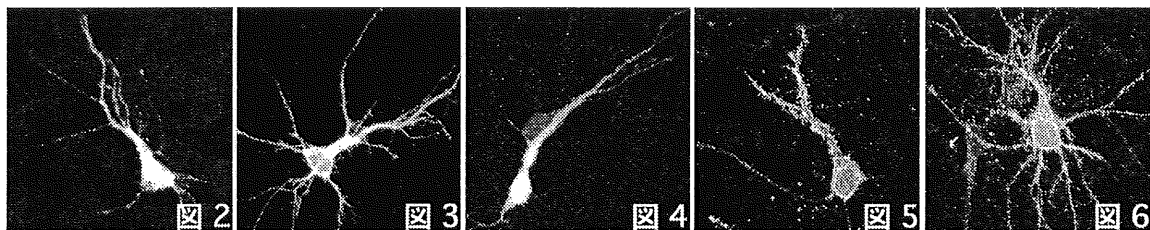


図 2 ; 培養 5 日目の神経細胞、図 3 ; CA-Pak1 を導入した神経細胞、図 4 ; DN-Pak1 を導入した神経細胞、図 5 ; CA-Rac1 と DN-Pak1 を共発現させた神経細胞、図 6 ; DN-Rac1 と CA-Pak1 を共発現させた神経細胞。