

審査の結果の要旨

氏名 林 周 宏

本研究は、脳の神経回路網形成において基礎となる神経細胞の樹状突起形成の分子メカニズムを明らかにするため、マウス大脳皮質の初代培養神経細胞を用いて、Pak1 タンパク質の突起形成における機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ウエスタンブロットにより生後 0 日のマウスでは Pak1 は脳に多量の発現が認められ、腎臓でも多少の発現が観察された。また、大脳皮質における Pak1 の発現量は、胎生期から生後初期では発生が進むにつれ徐々に減少していたが、成体では胎生期の約 2 倍であった。さらに *in situ* hybridization により、胎生 16 日、生後 0 日のマウスでは、Pak1 は大脳皮質原基、海馬、視床でシグナルが認められた。また、成体マウスにおいては大脳、海馬においてシグナルが認められ、特に、大脳の第五層の錐体神経細胞と海馬の錐体神経細胞層で強い発現が観察された。これらの結果より、Pak1 が神経細胞で何らかの機能を担っていることが示唆された。
2. 免疫組織化学を用い、初代培養神経細胞における Pak1 と Rac1(培養線維芽細胞において Pak1 の上流に位置している分子)の細胞内局在を調べたところ、培養 1 日目、5 日目とも Pak1、Rac1 とともに細胞質中に存在しており、両者の局在は一致した。さらに活性型 Pak1 の局在をリン酸化 Pak1 を認識する抗体で調べたところ、活性型 Pak1 は突起の 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。
3. 次に、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) をマウス大脳皮質の初代培養神経細胞に発現させ、培養した。遺伝子導入方法は *in utero* electroporation (子宮内電気穿孔法) を流用した。また、変異 Pak1 を導入した神経細胞と、コントロールとして用いた β -galactosidase を導入した神経細胞を同じ培養皿上にまき、培養を行った。この遺伝子導入・培養法は従来の方法に比べ、いくつかの利点を持つ。第一に、遺伝子導入効率が安定している点、第二に、遺伝子導入が培養前に行われる為、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。この方法により、神経細胞の突起形成における Pak1 の効果をより正確にコントロールと比較することが可能となった。

4. 上記に示した方法により、変異 Pak1 遺伝子を神経細胞に導入し、5 日間培養、固定した。その後、遺伝子導入された神経細胞を観察し、突起(neurite)の形態について計測、統計処理を行った。その結果、CA-Pak1 を導入した神経細胞においては、basal neurite の数と、2 次 apical neurite の数の増加が観察された。突起の長さ、分枝には変化が見られなかった。一方 DN-Pak1 を導入した神経細胞においては basal neurite の数と、2 次 apical neurite の数の減少が観察された。また、突起の長さ、分枝には変化が認められなかった。突起の数の変化は、培養 3 日目、7 日目の神経細胞でも観察されており、突起形成期において Pak1 が突起の数の制御に関与していることが示唆された。また、Pak1 は突起の長さ、分枝には影響を与えないことも示された。
5. Pak1 の上流因子の 1 つとして知られている Rac1 の神経細胞における効果を調べるため、CA-Rac1、DN-Rac1 についても Pak1 と同様の実験を行った。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。次に 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 の組み合わせをそれぞれ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 2 次 apical neurite の数がコントロールに比べ有意に減少しているのを確認し、CA-Rac1 の効果を DN-Pak1 がうち消しているのが示された。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 2 次 apical neurite の数の増加が確認され、DN-Rac1 による阻害を CA-Pak1 が回復していることが示された。これらの結果により、神経突起の数の制御において Pak1 は Rac1 の下流に位置していることが示唆された。

以上、本論文はマウス大脳皮質の錐体神経細胞において、Pak1 が Rac1 の下流で突起の数の制御に関与している事を明らかにした。本研究は、樹状突起形成の分子メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位授与に値する。