

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 西村 教子

Rho family GTPases (RhoA, Rac1, Cdc42) はアクチン骨格の制御を行う重要な分子である。Rho family GTPases は GTP 結合型の活性状態と GDP 結合型の不活性状態との両状態の相互変換が行われることで、様々な生体反応のスイッチとして機能している。Rho GTPases activating protein (RhoGAP) は Rho family GTPases の GTP 結合型から GDP 結合型への変換を促進する蛋白質である。これまでに RhoGAP は約 30 種類が報告されており、また更に多くの RhoGAP が哺乳類のゲノム上で見つかったことから、個々の RhoGAP は Rho family GTPases の活性制御や、それらの特異的機能を媒介する過程で、それぞれが専門化された役割を担っていると考えられている。申請者の所属する研究室にて単離同定された、新規蛋白質 RICS (RhoGAP Involved in the β -Catenin-N-Cadherin and NMDA Receptor Signaling) は、腎臓、精巣、心臓そして特に脳において高く発現している。本研究は、ジーンターゲティング法により作製した RICS 遺伝子欠損マウスを用いて、RICS が神経突起伸長やシナプス形成、および NMDA を介した細胞骨格再編成やシグナル伝達、さらに情動記憶において機能することを明らかにしたものである。

第 1 章では神経突起伸長における RICS の機能について明らかにした。まずラット初代培養海馬神経細胞の細胞体及び成長円錐において RICS が発現していることを細胞染色により示した。続いてラット褐色細胞腫由来の PC12 細胞への RICS-R58M ドミナントネガティブ変異体の遺伝子導入が、NGF 誘導性の突起伸長を著しく促進させることを明らかにした。この結果を受け、神経細胞の突起伸長における RICS の機能について更に検討するため RICS ノックアウトマウスを作製した。RICS ノックアウトマウスは正常に生まれ、成長し、繁殖能力も有していた。組織学的解析を行ったところ、脳、腎臓、心臓、肝臓、そして大腸のいずれの組織においても構造上の異常は認められなかった。同腹の生後 1 日目のマウスを用いた初代培養海馬神経細胞では、RICS ノックアウトマウス由来の神経細胞の方が野生型マウス由来の神経細胞に比べ、培養 24 時間後に高い突起発生率を示した。また同腹の生後 8-9 日目のマウスを用いた初代培養小脳顆粒神経細胞においても同様の結果が得られた。更に培養 24 時間後の RICS ノックアウトマウス由来の初代培養小脳顆粒神経細胞では、野生型に比べ、活性型 Cdc42 の量が増加していることが分かった。以上の結果から RICS は神経突起の伸長において Cdc42 の GAP として機能し、神経突起伸長を負に制御することが示唆された。次に神経細胞の突起伸長を直接制御しているとされる PAK5 との相互作用について検討したところ、RICS は野生型あるいは K478M ドミナントネガティブ変異体 PAK5 と *in vivo* で複合体を形成することが分かった。また *in vitro* で GST-pull down assay を行い、PAK5 は RICS の 1280-1317 アミノ酸を介して、RICS は PAK5 の 445-720 アミノ酸を介して直接結合していることを確認した。更にマウス脳抽出物を用いた GST-pull down assay により RICS は活性型 Cdc42 及び PAK5 と三者複合体を形成することを明らかにした。以上の結果より、RICS は神経突起の伸長において PAK5 からあるいは PAK5 へのシグナルを直接伝達し得る分子で

あることが推察される。

第2章では spine の形態形成、シナプス伝達機構における RICS の機能について明らかにした。まずラット初代培養海馬神経細胞の細胞染色により、RICS は spine にも局在することを示した。次に成体マウスの脳の分画を行い、RICS は postsynaptic density (PSD) に局在し、さらに PSD 画分において RICS は、 β -catenin、N-cadherin、NR2A/2B、そして PSD-95 と複合体を形成していることを明らかにした。また、ラット海馬初代培養細胞における RICS の局在は、NR2B および PSD-95 と一致することを示した。PSD 画分中の RICS は CaMKII によってリン酸化を受け、さらにリン酸化を受けた RICS の Cdc42 に対する GAP 活性は抑制されることを明らかにした。以上の結果から、RICS はシナプス形成および NMDA を介した細胞骨格の再編成やシグナル伝達において機能していることが推察される。また C57BL/6N との戻し交配3代目の RICS ノックアウトマウスを用いて Fear Conditioning Test を行ったところ、Cued Test において RICS ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べ、嫌悪刺激に対する記憶学習の低下が観察された。このことから RICS は扁桃体を介した情動記憶学習に関与していることが示唆された。

以上、本論文は RICS ノックアウトマウスの解析により RICS の神経突起伸長やシナプス形成、および NMDA を介した細胞骨格再編成やシグナル伝達における役割を示し、さらに RICS の情動記憶における役割を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献することが少なくない。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。