

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 林 寛敦

記憶や学習の基礎過程としてシナプスの可塑性が広く認知されている。このシナプス可塑性を担う機構の一つとしてグルタミン酸刺激依存的なアクチン骨格の再編成によるスパイン形態の変化が考えられている。このグルタミン酸による情報伝達には NMDA 受容体からのシグナル伝達が主要かつ重要である。本研究ではアクチン骨格制御分子 Rho ファミリー-GTPase に対する GTPase-activating protein (GAP) である RICS の機能解析を行い、RICS が NMDA 受容体から Rho ファミリー-GTPase へのシグナルをつなぐ分子であり、スパイン形態や下流のシグナル伝達を制御することで記憶・学習といった脳の高次機能に重要な役割を果たす分子であることを示唆した。RICS KO マウスは当研究室 (東京大学分子細胞生物学研究所分子情報研究分野) で既に作製されており、海馬や扁桃体、小脳の機能障害に由来すると思われる行動異常が見出されている。

序章では、脳の高次機能のための神経細胞間のネットワーク形成に関わる主要な分子について脳の発生段階ごとにこれまでの知見を説明した後、Rho ファミリー-GTPase、および RhoGAP の脳・神経における役割をまとめた。さらに、先行研究で明らかとなっている RICS に関する知見を記した後、本研究の目的を提示した。

第 1 章では、RICS のスプライシングバリエーションである PX-RICS を同定した。PX-RICS は RICS の N 末側にリン脂質結合ドメインである phox homology (PX) ドメインと蛋白質相互作用ドメインの Src homology 3 (SH3) ドメインを有する新規蛋白質であった。培養細胞を用いた蛋白質レベルでの発現解析の結果、多くの細胞で PX-RICS が RICS と比して有為に高い発現を呈することが明らかとなり、PX-RICS が RICS ファミリーの主要なアイソフォームであることが示された。PX-RICS はホスファチジルイノシトール 4 リン酸 [PtdIns (4) P], PtdIns (5) P および PtdIns (3) P と結合し、それらが集積して局在している細胞内器官であるゴルジ体、核内とエンドソームに PX-RICS は局在した。また、PX-RICS の GAP 活性が PX ドメインとリン脂質との結合によって負に制御されていることを見出した。マウス脳を使用して脳の発生段階における PX-RICS および RICS の蛋白質レベルでの発現を確認したところ、PX-RICS の発現が胚生 14 日目から検出されるのに対し、RICS の発現は生後 2 週間後から観察された。胚生 14 日目は神経が適切な場所へ移動し神経同士のネットワークの構築を開始する時期に相当し、生後 14 日目は不必要なシナプスの除去や必要なシナプス経路の強化を行う時期に相当する。このことから PX-RICS が神経細胞の移動や軸索、樹上突起の伸展に関与し、RICS はシナプスの成熟化に関与するのではないかと推察された。PX-RICS の過剰発現によって Neuro-2a 細胞の突起伸長が阻害されたことも、上記の推察を支持している。

第 2 章では、本研究室で作製済みであった RICS KO マウスの初代培養神経細胞を用いて、PX-RICS および RICS が神経突起の伸長、スパインの形成に与える影響を検討した。培養

3日目および7日目において RICS KO マウス由来の海馬初代培養神経細胞と野生型由来の海馬初代培養神経細胞の突起伸長を比較したところ、RICS KO マウス由来の海馬初代培養神経細胞では有為に突起の伸長および枝分かれが亢進していた。また、培養 14 日目と 20 日目でスパイン形態を比較したところ培養 14 日目において RICS KO マウス由来の海馬初代培養神経細胞と野生型由来の海馬初代培養神経細胞に差は見られなかったものの培養 20 日目では未成熟なスパイン形態であるフィロポディア型のスパインの割合が増加していた。突起伸長の比較の際、RICS KO マウス由来の海馬初代培養神経細胞の神経突起には無数のフィロポディア様の棘状の突起物が多数観察された。そこで神経発生段階における Cdc42 の活性を調べたところ、RICS KO マウス由来の神経細胞では Cdc42 が恒常的に活性化していることが明らかとなった。また、Cdc42 の下流分子である MAPK の一つ JNK の活性化も観察された。これまでに本研究室より *in vitro* において RICS が NMDAR シグナルの下流分子である CaMKII によってリン酸化され、GAP 活性が抑制されることを報告している。そこで初代培養神経細胞を用いて PX-RICS または RICS の NMDAR 活性化依存的なリン酸化を検討した。培養 7 日目および 14 日目において抗 RICS 抗体によるウェスタンブロッティング (WB) 解析を行ったところ、グルタミン酸刺激によって PX-RICS/RICS のバンドが高分子量側へシフトした。このバンドシフトはアルカリホスファターゼ処理によって消失し、CaMKII インヒビター KN-93 存在下ではおこらなかった。このことから、実際の神経細胞において PX-RICS/RICS がグルタミン酸刺激依存的にリン酸化されていることが示された。これらのことから、PX-RICS/RICS は NMDAR シグナル伝達系の構成要素として機能し、Cdc42 を介したアクチン骨格系や JNK の制御によってグルタミン酸刺激依存的なスパイン形態の変化を調節しているものと考えられた。

記憶・学習といった脳の高次機能を分子レベルで解明することは、記憶障害、認知障害を伴う疾病、例えばアルツハイマー病に見られるような記憶障害、に対する治療薬の開発においても重要な知見となると期待される。

以上、本論文は RhoGAP 蛋白質 RICS の新規スプライシングバリエント PX-RICS を同定・機能解析し、PX-RICS が主要なアイソフォームであることを示すと共に、NMDA 受容体活性化依存的なスパイン形態の変化に PX-RICS または RICS が関与していることを示唆したもので学術上、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のあるものと認めた。