

氏名	木下 雅美
博士の専攻分野の名称	博士 (理学)
学位記号番号	博理工甲第 713 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	神経幹 / 前駆細胞に発現する膜ラフト関連分子の機能解析
論文審査委員	委員長 教授 町田 武生 委員 教授 井上 金治 委員 教授 弥益 恭 委員 准教授 小林 哲也

論文の内容の要旨

著者は細胞膜に発現する膜ラフト(リピッドラフト)の生体内機能を解明するべく、近年所属研究室が哺乳類の細胞膜上にその発現を同定した新しい糖脂質分子”ホスファチジルグルコシド”と同じく細胞膜の重要な構成成分であるスフィンゴ脂質の前駆体 L-セリンに関する一連の機能解析実験を行った。

ホスファチジルグルコシドは研究室の Nagatsuka らによって哺乳類細胞に同定された新しい膜糖脂質分子で、細胞膜上で脂質ドメインとよばれる主にコレステロールやスフィンゴ脂質、リン脂質からなる脂質分子の複合体、リピッドラフトを形成する。著者らはこの糖脂質分子の抗体作製に取り組みその特異抗体 DIM21 を得、これを手がかりにラット胎仔脳からホスファチジルグルコシドを精製しその完全化学構造を決定した。その結果この分子は C18:0 と C20:0 の直鎖飽和脂肪酸というリン脂質には極めて希有な構造をもつ単一分子種であることが判明した。著者はマウス中枢神経系におけるホスファチジルグルコシドのその生理的な機能を解明すべく、種々の生化学的手法によりマウス胎仔脳内にホスファチジルグルコシドの存在を同定し、その特異抗体を用いて網羅的な組織発現解析によりホスファチジルグルコシドが多分化能をもつ神経前駆細胞と星状グリアの所謂星状グリア系譜細胞群にほとんど一貫して発現していること、またそれらの細胞膜上でリピッドラフトを形成していることを明らかにした。さらに特異タンパクとの結合による細胞内シグナリング誘起というリピッドラフト特徴的な反応メカニズムを利用して、特異抗体をホスファチジルグルコシドラフト(PGLRs)に反応させる *in vitro* 実験を行い、EGF 受容体を発現している胎仔期の神経前駆細胞膜上で特異抗体に修飾された PGLRs が EGF と会合することにより EGF 受容体がりガンド非依存的に活性化し、その下流のチロシンリン酸化経路を活性化させることによって、最終的に培養下の神経前駆細胞内に星状グリアマーカー GFAP の発現を増幅することが判明した。これらの実験結果から、生体内の PGLRs は神経前駆細胞膜状でりガンドに活性化された EGF 受容体シグナリングと共役することで多分化能をもった神経前駆細胞から星状グリアへの星状グリア分化を仲介する機能を有していることが強く示唆された。

次にホスファチジルグルコシドのリゾ体分子(lyso-PtdGlc)の生理活性解析を行った。細胞膜に局在するホスファチジルグルコシドのようなグリセロリン脂質はホスホリパーゼの加水分解作用によりリゾ体化し、その結果リゾホスファチジン酸(LPA)のような生理活性脂質として機能する可能性がある。特に LPA

は lyso-PtdGlc とおなじグリセロリン脂質由来のリゾ体分子であり、また細胞増殖作用や神経細胞の成長円錐を退縮させる生理活性機能を有している。著者は lyso-PtdGlc が LPA と構造的に極めて類似していることからラット胎仔脳由来の lyso-PtdGlc を用いて LPA の生理活性機能にならないその生理活性機能を調査した結果、lyso-PtdGlc が神経細胞成長円錐を退縮させる生理活性機能を有していることが判明した。マウス胎仔の脊髄に付随する後根神経節 (DRG) を培養下におき、そこから伸長する神経細胞に $1\mu\text{M}$ の lyso-PtdGlc を添加すると 30 分ほどの反応で有意に成長円錐が退縮された。ところが LPA による成長円錐の退縮は極めて鈍く、lyso-PtdGlc による退縮レベルに追い付くためには 25μ 以上を必要とした。この実験結果から、lyso-PtdGlc は LPA 以上に強力な神経細胞成長円錐退縮作用を示す生理活性脂質であることが判明した。また lyso-PtdGlc を培養下の神経前駆細胞に反応させてみたところ、特異抗体反応同様に培養細胞内に GFAP 発現を検出した。更に lyso-PtdGlc 抗体を用いて培養細胞標識を行ったところ、lyso-PtdGlc と推定される標識を細胞表面上に検出した。これらの実験結果から培養神経前駆細胞に発現する PtdGlc が酵素的に切断されて lyso-PtdGlc が産生され、それが自己分泌的に作用して GFAP 発現を誘導した可能性が示唆された。

またリピッドラフトの重要な構成成分であるスフィンゴ脂質の前駆体であるアミノ酸 L-セリンの生理機能解析を行った。これまでの先行研究により L-セリンの新生合成酵素 Phgdh がマウス脳の神経幹 / 前駆細胞や星状グリアに発現されていること、また *Phgdh* 遺伝子欠損マウスによる解析から Phgdh 依存的に新生合成される L-セリンがマウス胎仔脳内の神経幹 / 前駆細胞の生存や細胞増殖活性といった基本的な細胞生理活性に必須の役割をもつことが示されていた。そこで著者は生後の神経幹 / 前駆細胞での Phgdh 依存的に新生合成される L-セリンの生理的役割について検証した。まず生後新生領域である側脳室下帯 (SVZ) における Phgdh 発現を調査したところ、SVZ での顕著な Phgdh 発現を検出した。その発現レベルは大脳皮質の 1.5 倍以上に相当していた。そこで細胞種ごとに確立された特異的マーカーの抗体類を用いて詳細な組織細胞標識をおこなったところ、Phgdh の発現は神経幹 / 前駆細胞マーカーである GFAP や Nestin、GLAST の発現とよく一致していた。しかし分化したニューロン前駆細胞での発現は見られなかった。BrdU による増殖性細胞標識実験では、9 割の BrdU 標識細胞に Phgdh の発現が認められた。また増殖成長因子 EGF 反応性の神経前駆細胞から形成される浮遊細胞塊 (前神経塊) の構成細胞は著しい Phgdh 発現を示していた。しかし、これを分化誘導させたあと発生してきたグリア細胞群には Phgdh 発現がみられたが、ニューロンではその発現が抑制されていた。また SVZ で Phgdh を発現する細胞には常に神経幹細胞の stemness (幹細胞的性質) の維持に作用する Notch の発現が観察された。以上の実験結果から、生後の神経幹 / 前駆細胞群で Phgdh 依存的に産生される L-セリンはそれらの生存と生涯継続される神経新生に必須の役割を果たしていることが強く示唆された。

論文の審査結果の要旨

当該論文審査委員会は、平成 21 年 2 月 17 日 15 時より理学部 9 番教室において、多数の聴衆を得て公開により論文発表会を開催し、発表の後、活発な質疑応答により、研究内容の審査を行った。

細胞膜は細胞の内外を隔てる境界として、細胞外シグナルを受信したり物質の輸送に当たる最前線である。これは脂質二重層からなり、二つの脂質分子が配列が重なり合ってそれぞれ内膜と外膜を形成し、膜を貫通する受容体やトランスポーターなどの膜タンパク質や情報伝達に関わる多様なタンパク質群や脂質分子群、コレステロールなどがある。脂質二重層の外膜にあって、脂質分子とコレステロールで濃縮された脂質の複合体がリピッドラフトと呼ばれる脂質ドメインである。

申請者は、細胞膜に発現する リピッドラフトすなわち膜ラフトの生体内機能を解明するべく、近年、所属研究室が哺乳類の細胞膜上にその発現を同定した新しい糖脂質分子“ホスファチジルグルコシド”と同じく細胞膜の重要な構成成分であるスフィンゴ脂質の前駆体 L-セリンに関する一連の機能解析実験を行った。

ホスファチジルグルコシドは、哺乳類細胞に同定された新しい膜糖脂質分子で、細胞膜上で脂質ドメインとよばれる主にコレステロールやスフィンゴ脂質、リン脂質からなる脂質分子の複合体、リピッドラフトを形成する。申請者らはこの糖脂質分子の抗体作製に取り組み、その特異抗体 DIM21 を得て、これを手がかりにラット胎仔脳からホスファチジルグルコシドを精製しその完全化学構造を決定した。その結果、この分子は C18:0 と C20:0 の直鎖飽和脂肪酸というリン脂質には極めて希な構造をもつ単一分子種であることを明らかにした。

申請者は、マウス中枢神経系におけるホスファチジルグルコシドのその生理的な機能を解明すべく、種々の生化学的手法により、マウス胎仔脳内にホスファチジルグルコシドの存在を同定し、その特異抗体を用いて網羅的な組織発現解析により、多分化能をもつ神経前駆細胞と星状グリアの所謂星状グリア系譜細胞群にホスファチジルグルコシドがほとんど一貫して発現していること、またそれらの細胞膜上でリピッドラフトを形成していることを明らかにした。

さらに、特異タンパクとの結合による細胞内シグナリング誘起というリピッドラフト特徴的な反応メカニズムを利用して、特異抗体をホスファチジルグルコシドラフト (PGLRs) に反応させる *in vitro* 実験を行い、EGF 受容体を発現している胎仔期の神経前駆細胞膜上で特異抗体に修飾された PGLRs が EGF と会合することにより EGF 受容体がりガンド非依存的に活性化し、その下流のチロシンリン酸化経路を活性化させることによって、最終的に培養下の神経前駆細胞内に星状グリアマーカー GFAP の発現を増幅することを示すことが出来た。

これらの実験結果から、生体内の PGLRs は神経前駆細胞膜上でリガンドに活性化された EGF 受容体シグナリングと共役することで多分化能をもった神経前駆細胞から星状グリアへの星状グリア分化を仲介する機能を有していることを強く示唆することとなった。

次に、ホスファチジルグルコシドのリゾ体分子 (lyso-PtdGlc) の生理活性解析を行った。細胞膜に局在するホスファチジルグルコシドのようなグリセリン脂質は、ホスホオリパーゼの加水分解作用によりリゾ体化し、その結果リゾホスファチジン酸 (LPA) のような生理活性脂質として機能する可能性がある。特に、LPA は lyso-PtdGlc とおなじグリセリン脂質由来のリゾ体分子であり、また細胞増殖作用や神経細胞の成長円錐を退縮させる生理活性機能を有している。申請者は、lyso-PtdGlc が LPA と構造的に極めて類似していることから、ラット胎仔脳由来の lyso-PtdGlc を用いて LPA の生理活性機能にならぬその生理活性機能を調べた結果、lyso-PtdGlc が神経細胞成長円錐を退縮させる生理活性機能を有していることを見出した。

マウス胎仔の脊髄に付随する後根神経節 (DRG) を培養下におき、そこから伸長する神経細胞に $1\ \mu\text{M}$ の lyso-PtdGlc を添加すると 30 分ほどの反応で有意に成長円錐が退縮された。ところが LPA による成長円錐の退縮は極めて鈍く、lyso-PtdGlc による退縮レベルに追い付くためには $25\ \mu\text{M}$ 以上を必要とした。

この実験結果から、lyso-PtdGlc は LPA 以上に強力な神経細胞成長円錐退縮作用を示す生理活性脂質であることを示した。また、lyso-PtdGlc を培養下の神経前駆細胞に反応させてみたところ、特異抗体反応同様に培養細胞内に GFAP 発現を検出した。更に、lyso-PtdGlc 抗体を用いて培養細胞標識を行ったところ、lyso-PtdGlc と推定される標識を細胞表面上に検出した。

これらの実験結果から、培養神経前駆細胞に発現する PtdGlc が酵素的に切断されて lyso-PtdGlc が産生され、それが自己分泌的に作用して GFAP 発現を誘導した可能性が示唆された。

また、リピッドラフトの重要な構成成分であるスフィンゴ脂質の前駆体であるアミノ酸 L-セリンの生理機能解析を行った。これまでの先行研究により、L-セリンの新生合成酵素 Phgdh がマウス脳の神経幹 / 前駆細胞や星状グリアに発現していること、また Phgdh 遺伝子欠損マウスによる解析から、Phgdh 依存的に新生合成される L-セリンがマウス胎仔脳内の神経幹 / 前駆細胞の生存や細胞増殖活性といった基本的な細胞生理活性に必須の役割をもつことが示されていた。そこで申請者は、生後の神経幹 / 前駆細胞での Phgdh 依存的に新生合成される L-セリンの生理的役割について検証した。

まず生後新生領域である側脳室下帯 (SVZ) における Phgdh 発現を調べたところ、SVZ での顕著な Phgdh 発現を検出した。その発現レベルは脳皮質の 1.5 倍以上に相当していた。そこで細胞種ごとに確立された特異的マーカーの抗体類を用いて詳細な組織細胞標識をおこなったところ、Phgdh の発現は神経幹 / 前駆細胞マーカーである GFAP や Nestin、GLAST の発現とよく一致していた。しかし、分化したニューロン前駆細胞での発現は見られなかった。BrdU による増殖性細胞標識実験では、9 割の BrdU 標識細胞に Phgdh の発現が認められた。また、増殖成長因子 EGF 反応性の神経前駆細胞から形成される浮遊細胞塊 (前神経塊) の構成細胞は著しい Phgdh 発現を示していた。これを分化誘導させた後に発生してきたグリア細胞群には Phgdh 発現がみられたが、ニューロンではその発現が抑制されていた。また SVZ で Phgdh を発現する細胞には常に神経幹細胞の stemness (幹細胞的性質) の維持に作用する Notch の発現が観察された。

以上の実験結果から、生後の神経幹 / 前駆細胞群で Phgdh 依存的に産生される L-セリンはそれらの生存と生涯継続される神経新生に必須の役割を果たしていることを強く示唆する結論を得た。

このように、当該の学位申請論文は、培養神経前駆細胞に発現する PtdGlc が酵素的に切断されて lyso-PtdGlc が産生され、それが自己分泌的に作用して GFAP 発現を誘導することを示すとともに、生後の神経幹 / 前駆細胞群で Phgdh 依存的に産生される L-セリンがそれら細胞群の生存とともにその後の神経新生に必須であることを明確に示したもので、神経新生研究の世界の最先端の成果として、その内容は、定評ある国際誌に第 1 著者原著論文として 2 報が掲載されることとなり、さらに関連論文として 1 報が国際誌に掲載されている。

従って、当論文審査委員会は、当該の学位申請論文を博士 (理学) の論文として十分に相応しいものと判断した。