

学 位 論 文 要 旨

氏 名 伊藤 諭子



論文題目

Cytohesin-2-Arf6 シグナル経路が担う中枢神経機能に関する研究

指導教授承認印

岡本浩嗣



(以 下 要 旨 本 文)

中枢神経系の神経細胞における細胞内小胞輸送は、受容体や接着分子の細胞膜での発現の調節を介した神経細胞移動、神経突起の形成と維持、シナプス小胞の放出やリサイクリング、シナプス可塑性など多くの神経機能に重要な役割を果たしている。細胞内小胞輸送のうち細胞膜とエンドソーム間の小胞輸送を担う分子の1つとして低分子量GTP結合タンパク質のADPリボシル化因子6(Arf6)が知られている。Arf6はグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)によって活性化され、様々な下流効果因子のリクルートを誘導することで小胞輸送の制御に関与している。Arf6-GEFには多くの分子種が存在しており、Arf6の多様な制御が想定されているが、いまだ個々のGEFの神経機能と分子制御機構についての知見は乏しい。そこで、中枢神経系に豊富に発現するArf6-GEFの1つであるcytohesin-2に着目し、cytohesin-2の相互作用分子を酵母ツーハイブリッド法で探索した。その結果、エンドソーム輸送に関与するBLOC-1複合体の構成分子であるpallidinが新規結合分子として同定された。Pallidinは、メラノソーム形成不全となるヘルマンズキー・パドラック症候群の原因遺伝子として知られている。また、BLOC-1複合体の構成分子であるdysbindinは、統合失調症への関与が報告され、BLOC-1複合体の中枢神経機能における役割が注目されている。さらに、cytohesin-2の相互作用分子として、シナプス可塑性や疼痛制御に関与するグループ1代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1/5)と複合体を形成する分子も同定された。海馬神経細胞においてcytohesin-2はmGluRと複合体を形成し、細胞膜発現への関与が報告されているが、脊髄での疼痛制御におけるcytohesin-2の役割は不明である。これらのcytohesin-2の相互作用分子の探索の結果から、本研究では、【1】マウス海馬でのcytohesin-2の局在とpallidinとの相互作用による小胞輸送の動態と神経突起形成における機能的役割の解明、【2】マウス脊髄でのcytohesin-2の局在と慢性疼痛における機能的役割の解明の2つの研究課題を設定し、cytohesin-2-Arf6シグナル経路が担う中枢神経機能の解明を目的として実験を行った。

【1】マウス海馬でのcytohesin-2の局在とpallidinとの相互作用による小胞輸送の動態と神経突起形成における機能的役割の解明

まず、マウス海馬におけるcytohesin-2の局在を調べるため、成体マウス脳のパラフィン切片を用いた免疫染色を行った結果、cytohesin-2は脳全体に広く分布し、神経細胞の細胞体や樹状突起に点状に豊富に分布していた。次に、海馬でcytohesin-2と各エン

ドソームマーカーの二重蛍光免疫染色を行った結果、初期エンドソームマーカーである EEA1 との共局在が多く認められた。さらに免疫電子顕微鏡解析により、cytohesin-2 は樹状突起の本幹と棘突起において、細胞膜や膜小胞に付随して局在することが判明した。

次に、cytohesin-2 の分子ネットワークの解明を目指し、cytohesin-2 を餌とした酵母ツーハイブリッド法でマウス脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、pallidin を新規結合分子として同定した。Cytohesin-2 と pallidin との結合領域を明らかにするために、cytohesin-2 と pallidin の構造の一部を欠失させた種々の変異体を用いて酵母ツーハイブリッド法で検討した結果、cytohesin-2 は N 末端のコイルド・コイル領域を介して pallidin のコイルド・コイル領域 1 を含む 31-157 アミノ酸領域と結合していた。また、成体マウス脳抽出液を用いた免疫沈降法により、cytohesin-2 は pallidin と複合体を形成することを確認した。

細胞内での cytohesin-2 と pallidin との相互作用の場を明らかにするため、マウス海馬培養神経細胞を用いて多重蛍光免疫染色を行った結果、細胞体や神経突起において、cytohesin-2 と pallidin は初期エンドソームのマーカーである EEA1 と共局在していた。次に、海馬培養神経細胞において、pallidin に対する shRNA を導入して pallidin をノックダウンしたところ、細胞体や樹状突起に局在する EEA1 陽性の初期エンドソームの数の有意な減少が認められた。また、同様に cytohesin-2 をノックダウンした場合も、EEA1 陽性の初期エンドソームの数の有意な減少が認められたことより、cytohesin-2 と pallidin は初期エンドソームの動態に関与することが示唆された。

さらに、cytohesin-2-Arf6 経路は海馬神経細胞の突起形成に関与することが先行論文で報告されていることより、神経突起形成における cytohesin-2 と pallidin の機能を検討した。海馬培養神経細胞において pallidin をノックダウンした結果、樹状突起の伸長の促進が認められた。Pallidin のノックダウンによる樹状突起の伸長促進効果は、野生型 pallidin を共導入すると機能回復できたが、cytohesin-2 との結合領域を欠損した変異型 pallidin を共導入しても機能回復できなかった。

以上の結果から、海馬神経細胞において、cytohesin-2 は pallidin と初期エンドソームにおいて複合体を形成し、初期エンドソーム輸送や発達過程の樹状突起形成の制御に関与する可能性が示唆された。

【2】マウス脊髄での cytohesin-2 の局在と慢性疼痛における機能的役割の解明

マウス脊髄における cytohesin-2 の局在を調べるため、マウスの脊髄腰膨大部のマイクロスライサー切片を用いて蛍光免疫染色を行った結果、cytohesin-2 は脊髄後角 I/II 層に豊富に局在し、mGluR5 や mGluR5 の足場分子である Homer1b/c の近傍に分布することが明らかになった。さらに免疫電子顕微鏡法による局在解析の結果、cytohesin-2 は、後角ニューロンのシナプス後肥厚部(PSD)近傍の細胞膜周囲に豊富に局在していた。これらの結果は、海馬神経細胞で cytohesin-2 との複合体形成が報告されている mGluR5

の局在とよく一致していた。

次に、cytohesin-2 と慢性疼痛との関連を調べるため、cytohesin-2 遺伝子欠損マウスを用いて神経障害性疼痛と炎症性疼痛の 2 種類の慢性疼痛モデルを作成した。神経障害性疼痛モデルは右坐骨神経を部分的に 3 ヶ所結紮する方法で作成し、炎症性疼痛モデルは右足底部に完全フロイトアジュバント (CFA) 20 μ l を皮下投与する方法で作成した。その後、機械刺激に対する逃避行動を指標に痛みの閾値を評価する von Frey テストを用いて、疼痛感受性の変化を評価した。両モデルとも疼痛誘導後 2 日目以降において、cytohesin-2 遺伝子欠損マウスは、対照群と比較して疼痛閾値の有意な上昇を示した。

さらに、野生型マウスに前処置として cytohesin の GEF 活性に対する特異的阻害剤である SecinH3 を髄腔内投与した後に炎症性疼痛モデルを作成し、疼痛感受性の変化を評価した結果、SecinH3 投与群は対照群と比較して疼痛閾値の低下が抑制された。Cytohesin-2 による Arf6 の活性化と慢性疼痛との関連性を明らかにするため、野生型マウスの炎症性疼痛モデルにおいて、GTP 型 Arf に特異的に結合するタンパク質の GGA1 (Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing, ARF-binding protein 1)を用いたプルダウンアッセイ法により脊髄における Arf6 活性の経時的変化を検討した。その結果、CFA 投与後、Arf6 活性は経時的に増大し、投与後 12 時間でピークを示し、その後減少した。次に、SecinH3 による脊髄での Arf6 の活性化への影響を検討するため、野生型マウスに前処置として SecinH3 を髄腔内投与した後に炎症性疼痛モデルを作成し、Arf6 活性を調べた結果、脊髄における Arf6 活性の増大の有意な抑制が認められた。以上の結果から、cytohesin-2 は、脊髄後角 I/II 層の後角ニューロンの興奮性シナプスの後膜に局在し、Arf6 の活性化を介して、炎症性刺激による疼痛の感受性の制御に関与する可能性が示唆された。

本研究では、2 つの研究課題を設定し、中枢神経系における cytohesin-2 とその結合分子の相互作用が果たす神経機能や cytohesin-2-Arf6 シグナル経路の疼痛制御機構について解析した。その結果、海馬神経細胞の初期エンドソーム動態と樹状突起形成の制御に関与する cytohesin-2 の pallidin との新たな分子間相互作用による調節機構とともに、脊髄における cytohesin-2 の Arf6 活性を介した慢性疼痛制御に関する新規神経機能を見出した。近年、cytohesin-2-Arf6 経路の破綻と、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症との関連性が指摘されている。本研究がきっかけとなり、今後、さらに cytohesin-2-Arf6 シグナル経路の神経細胞での機能制御機構とともに慢性疼痛制御の詳細なメカニズムの解明が進展し、神経疾患や慢性疼痛の新たな治療法の開発につながる事が期待される。