



Title	Local Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Accumulation Recruits Vav2 and Vav3 to Activate Rac1/Cdc42 and Initiate Neurite Outgrowth in Nerve Growth Factor-stimulated PC12 Cells
Author(s)	青木, 一洋
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47379
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 ^{あお}青 ^き木 ^{かず}一 ^{ひろ}洋

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 2 1 0 1 6 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 19 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

医学系研究科分子病態医学専攻

学 位 論 文 名 Local Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Accumulation Recruits Vav2 and Vav3 to Activate Rac1/Cdc42 and Initiate Neurite Outgrowth in Nerve Growth Factor-stimulated PC12 Cells.
(神経成長因子で刺激された PC12 細胞において局所的に産生されたフォスファチジルイノシトール 3,4,5 三リン酸が Vav2 と Vav3 を局在変化させることで Rac1 と Cdc42 の活性化および神経突起伸展を誘導する。)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 高倉 伸幸

(副査)
教 授 岡田 雅人 教 授 目加田英輔

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

脳・神経系の機能は、多様な神経細胞どうしが機能的に結合して作り上げられる精妙な神経回路によって制御されている。神経回路の構築において、神経突起（軸索・樹状突起）の伸展は重要な初期過程の1つである。Rhoファミリー低分子量Gタンパク質に属するRac1とCdc42は細胞骨格を介して神経突起伸展を正に制御すると考えられている。また、形質膜構成成分のイノシトールリン脂質の一種であるphosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP₃)がRac1とCdc42の活性を制御し、神経突起伸展、軸索極性形成に関与することが報告されている。しかしながら、これらのGタンパク質やリン脂質の局所的な動態を生細胞で検出する方法が存在しなかったため、それらの動的な制御の実際については多くが不明のままである。そこで、蛍光共鳴エネルギー移動（fluorescence resonance energy transfer: FRET）の原理に基づくRac1、Cdc42、PIP₃の分子プローブを用いることにより、神経突起伸展過程でのこれらの分子の時空間的な活性制御機構とその神経突起伸展における役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

〔 方法ならびに成績 〕

神経突起伸展のモデル細胞としてPC12細胞を用いた。未分化のPC12細胞は、神経成長因子（nerve growth factor: NGF）を加えることにより交感神経様に分化し、顕著な突起伸展を示す。Rac1、Cdc42のFRETプローブ分子はRaichu-Rac1、Raichu-Cdc42 (Itoh R.E. et al., Mol. Cell. Biol. 2002 22: 6582-6591)を用いた。PIP₃のFRETプローブ分子（Pippi-PIP₃）はSatoらの報告（Sato M. et al., Nat. Cell. Biol. 2003 5: 1016-1022）に従って作製した。

NGFで60時間処理したPC12細胞の神経突起におけるRac1、Cdc42の活性分布を検討したところ、Rac1とCdc42は伸展する突起の先端部でのみ局所的な活性化が見られた。この時、PIP₃もRac1やCdc42が活性化する領域に集

積していた。次に NGF 刺激直後の Rac1、Cdc42 の活性化、及び PIP₃ の分布を検討した。NGF 刺激 2-6 分において、Rac1 と Cdc42 は細胞の広範囲にわたって活性化され、PIP₃ も広範囲で産生された。ところが、NGF 刺激 10 分以降では、Rac1、Cdc42 の活性と PIP₃ の分布は細胞体から伸びた幾つかの突起部に局所化することが分かった。われわれは、NGF による Rac1 と Cdc42 の活性化が共通のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) により行われることを以前に見出している (Aoki K. et al., J. Biol. Chem. 2004 279 : 713-719) 。この条件を満たし PC12 細胞で発現する GEF の候補として、Vav2 と Vav3 が考えられた。そこで RNAi 法により Vav2 と Vav3 の発現を抑制したところ、NGF による Rac1 と Cdc42 の活性化が顕著に減弱し、突起伸展も強く抑制された。また免疫染色により、NGF 刺激で産生された PIP₃ によって Vav2 と Vav3 が形質膜に移行することが分かった。一方で、NGF 刺激 10 分以降に見られる PIP₃ の局所的産生は、Vav2 と Vav3 の RNAi 法による発現抑制、あるいはアクチン脱重合剤処理によって抑制された。PIP₃ は Vav2 と Vav3、アクチン細胞骨格の上流因子でもあることを考慮すると、この結果は、PIP₃、Vav2/Vav3、Rac1/Cdc42、アクチン細胞骨格の間で局所的なポジティブフィードバックループが存在することを示している。

[総 括]

NGF 依存的な Rac1 と Cdc42 の活性化因子として Vav2 と Vav3 を同定した。Vav2 と Vav3 は、NGF 刺激により産生される PIP₃ によって形質膜に移行し、Rac1 と Cdc42 の活性化、及び神経突起伸展を誘導する。つまり NGF→PIP₃→Vav2/Vav3→Rac1/Cdc42→アクチン細胞骨格→神経突起伸展というシグナル伝達経路が明らかになった。さらに、PIP₃、Vav2/Vav3、Rac1/Cdc42、アクチン細胞骨格の間には局所的なポジティブフィードバックループの存在が示された。従って、NGF 刺激によって惹起されたこの局所的なポジティブフィードバックループが、突起の伸展部での Rac1 と Cdc42 の局所的活性化の維持に寄与し神経突起の伸展を促進する、というモデルを考えることができる。

論文審査の結果の要旨

軸索や樹状突起などの神経突起の伸展は、神経回路の構築における重要な初期過程の 1 つである。申請者は蛍光共鳴エネルギー移動の原理に基づく活性モニター分子を用いて、細胞骨格制御因子である phosphatidylinositol 3-kinase、Rac1、Cdc42 の時空間的な活性変化を、生きた神経系細胞にて観察することに成功した。神経成長因子によって誘導される伸展突起の先端部では、これらの分子がいずれも局所的に活性化されていた。様々な実験により、これらの因子の活性化が神経突起の伸展に重要であることが示された。また、神経成長因子刺激による Rac1 と Cdc42 の活性化に必要な分子として Vav2 と Vav3 を同定し、PI3-K、Vav2/Vav3、Rac1/Cdc42 間でのポジティブフィードバックが局所的な活性維持に必要であることを見出した。以上の結果は、神経突起伸展の分子メカニズムの解明に大きく貢献するとともに、新規の神経突起伸展モデルを提唱するものであり、学位に値するものと認める。