Osaka University Knowledge Archive

Title	Sema4D-plexin-B1 implicated in regulation of dendritic spine density through RhoA/ROCK pathway.
Author(s)	林, 賢宗
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49038
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【25】

氏　　名	林（リン）　賢（ケン）　宗（シュウ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２１６２４　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 11 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学　位　論　文　名	Sema4D-plexin-B1 implicated in regulation of dendritic spine density through RhoA/ROCK pathway. （Sema4D-plexin-B1 は RhoA/ROCK シグナル系を介して樹状突起棘密度の制御に関与する）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　遠山　正彌 （副査） 教　授　青笹　克之　　教　授　米田　悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

（目的）

セマフォリンは軸索ガイダンス分子として見出された分子であるが、生後や成熟動物の神経系に発現することから、脳の発達過程や成熟期におけるシナプス形成に関与することが考えられる。セマフォリン分子のシナプス形成への関与を明らかにすることを目的として、興奮性シナプスの後シナプス部位を形成することがよく知られている樹状突起棘の密度や形態変化に注目した。セマフォリン分子の内、成熟期脳に発現しその受容体が明らかになっている Sema4D-plexin-B1 が樹状突起棘の密度や形態に及ぼす影響を調べた。

（方法）

初代培養ならびに細胞培養

妊娠 18 日 SD ラットから海馬を取り出し、パパインで 15 分間処理後、poly-L-Lysine コートしたカバーガラスに 150 cells/mm^2 の神経細胞を播き B27 添加培地で３週間培養した、GFP あるいは GFP＋plexin-B1 は 5DIV で神経細胞にトランスフェクションした。21DIV の神経細胞に 1 nM Sema4D を指定時間添加後ホルマリン固定液に 30 分間固定した。画像の取り込み、樹状突起棘の密度ならびに形態を計測・観察には LSM510 共焦点レーザー顕微鏡（Zeiss）と x63 の対物レンズ、LSM510 ソフトウエアを用いた。

免疫組織化学法ならびにウエスタンブロット法は次のように行った。固定した培養神経細胞あるいはブロットしたナイロン膜を plexin-B1 抗体（作製）、PSD-95 抗体（Upstate）、RhoA 抗体（SantaCruz）、HA 抗体（Boeringer）と反応後、至適な２次抗体と反応させた。

（成績）

免疫組織化学法を用いて初代培養神経細胞における plexin-B1 の局在を調べたところ、１）細胞体や樹状突起シャフトに加え樹状突起棘に plexin-B1 が分布すること、２）樹状突起棘でアクチンや後シナプスのマーカーである PSD-95 と分布が重なった。海馬培養神経細胞を６時間 Sema4D 添加した神経細胞では樹状突起棘の密度が無添加の

コントロールより 39%多くなった。また、神経細胞の発達に伴い樹状突起棘が形成され、それらの形態が stubby spine, thin spine, mushroom spine の順に増加し成熟することが報告されている。コントロール群の樹状突起棘では stubby spine が多いが Sema4D 添加群では thin spine ならびに mushroom spine の割合が増加した。これらの結果から、Sema4D は樹状突起棘の形成を亢進させ、その形態を成熟型に変化させる作用があることが示された。

Sema4D 受容体である plexin-B1 は PDZ 含有 RhoGEFs（PDZ-RhoGEFs）と結合し Sema4D の RhoA 活性化シグナルを伝達することが知られている。私達は前述の樹状突起棘の形成や形態に及ぼす Sema4D の効果が plexin-B1－PDZ-RhoGEF－RhoA シグナル系を介するかどうかを明らかにするため　1）RhoA の主要ターゲットである ROCK を Y27632 で阻害した場合と、2）PDZ-RhoGEF と結合できない変異体である plexin-B1ΔC を過剰発現させた場合における樹状突起棘の変化を調べた。Sema4D 添加の場合のみならず Sema4D 無添加の場合にも Y27632 処理は樹状突起棘の密度を低下させたことから、RhoA/ROCK が樹状突起棘形成に重要な働きを有すること、Sema4D の樹状突起棘形成促進作用には RhoA/ROCK が必要であることが明らかになった。次に plexin-B1ΔC を過剰発現させると Sema4D の樹状突起棘形成促進作用は消失した。このことから、Sema4D の樹状突起棘形成促進作用には PDZ-RhoGEF との結合が必要であることが明らかになった。

（総括）

本研究の結果から Sema4D-plexin-B1 は PDZ-RhoGEFs を介して RhoA/ROCK シグナル系を制御し、樹状突起棘の形成促進と成熟に関与していることが明らかになった。このことから、Sema4D-plexin-B1 が興奮性シナプスの可塑性に関与することが予想され、今後の研究課題であると考える。

論文審査の結果の要旨

セマフォリン分子群は 1990 年代に発生過程における神経軸索の方向性を決定する神経ガイダンス因子として同定された分子群です。Sema4D その受容体である plexin-B1 が興奮性シナプスの形成や機能に関与するかどうかを明らかにするため、Sema4D が樹状突起棘の形成と形態に及ぼす影響を検討しました。初代神経細胞培養、免疫染色、樹状突起棘の密度定量化などを用いて実験を行いました。海馬神経細胞における樹状突起棘で plexin-B1 とアクチンや PSD-95 と分布が重なり、共局在していると考えられました。可溶性 Sema4D 添加は樹状突起棘の形成を亢進させ、その形態を成熟型に変化させることが示されました。また、Sema4D の棘形成促進作用には RhoA/ROCK シグナルが必要であることと plexinB1 と PDZ-RhoGEFs との結合が必要であることが明らかになりました。本研究の結果から Sema4D-plexin-B1 は PDZ-RhoGEFs を介して RhoA/ROCK シグナル系を制御し、樹状突起棘の形成促進と成熟に関与していることが明らかになりました。これらの研究結果は学位に値するものと認めます。