Osaka University Knowledge Archive

Title	Neogenin regulates neuronal survival through DAP kinase
Author(s)	藤田, 幸
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58204
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

【122】

氏　　名	藤（ふじ）　田（た）　幸（ゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２４４４４　号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体生理医学専攻
学　位　論　文　名	Neogenin regulates neuronal survival through DAP kinase （Neogeninを介した神経細胞死制御機構）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　山下　俊英 （副査） 教　授　島田　昌一　　教　授　辻本　賀英

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

Repulsive guidance molecule (RGM)　はGPIアンカー型のタンパク質で、神経系発生時の軸索ガイダンスおよび神経細胞生存に重要な働きを有することが報告されている。また、成体においては、脊髄損傷後に発現が増加し、神経軸索の再生を阻害することが知られている。Neogeninは、RGMの受容体として同定され、これらRGMの機能を媒介するが、リガンドであるRGMの非存在下では自己活性化し細胞死を誘導することから、機能的にはdependence receptorの１つとして定義されている。実際、発生期のニワトリ胚神経管において、受容体であるneogeninはリガンドであるRGMの非存在下で、細胞死を誘導する。したがって、RGM-neogeninを介したシグナル伝達は、発生および脳傷害時に、神経細胞の生存・死を調節する重要な役割を担うことが示唆されるが、細胞死を制御するneogeninの下流シグナルについては未だ明らかになっていない。そこで本研究では、RGM-neogeninシグナルによる神経細胞死制御の分子機構の解明を試みた。

〔　方法ならびに成績　〕

RGMの受容体であるneogeninの下流シグナル因子を同定するために、ニワトリ胚あるいはラット胎仔より神経細胞を単離した後、免疫沈降法を行ったところ、neogeninがdeath-associated protein kinase (DAPK)と内在性に結合していることを見いだした。DAPKはそのセリンスレオニンキナーゼ活性により細胞死を促進する因子として知られ、自己リン酸化によりキナーゼ活性を失うと、細胞死誘導作用は失われる。次に、RGMがneogenin

とDAPKの結合に与える影響について、同様に免疫沈降法にて調べた結果、興味深いことに、RGM添加により両者の結合が解離することが明らかとなった。HEK293細胞にneogeninを強制発現させると、同様にDAPKとの結合が観察されたが、ウエスタンブロット法およびキナーゼアッセイによりDAPKのリン酸化レベルとキナーゼ活性を調べた結果、neogenin存在下ではDAPKのリン酸化レベルは減少し、キナーゼ活性は増強した。一方、RGMを添加すると、DAPKとの結合は解離し、neogeninによるDAPKの活性化は阻害された。Neogeninの細胞死への影響を調べるため、HEK293細胞にneogeninを発現させ、TUNEL染色を行った結果、cytochrome cのミトコンドリアからの放出に伴い死細胞が増加することが確認されたが、リガンドであるRGMの存在下ではneogeninによる細胞死誘導は抑制された。さらには、neogeninとDAPKのdominant negative form　の両者を発現させたところ、neogeninによる細胞死誘導は抑制された。このことから、DAPKがneogeninによる細胞死シグナルの伝達に寄与することが明らかになった。最後に、生体内におけるneogenin誘導細胞死について調べるため、*in ovo* electroporation法により、ニワトリ胚網膜細胞へneogeninを遺伝子導入した。その結果、TUNEL陽性死細胞の増加が観察されたが、neogeninとDAPKのdominant negative formの両者を発現させたところ、neogeninによる細胞死誘導は抑制された。また、ニワトリ胚網膜細胞におけるRGMの発現をRGM siRNAを導入して抑制した結果、細胞死の増加が観察されたが、RGM siRNA とneogenin siRNA を同時に導入すると、細胞死誘導は抑制された。

〔　総　　括　〕

RGMの受容体であるneogeninは、RGM非存在下ではDAPKの活性を増強し細胞死を誘導することが示された。一方で、リガンドであるRGMの存在下では、neogeninの下流でDAPKが不活性化され、神経細胞の生存が促されることが明らかとなった。本研究により、RGMがneogeninによる神経細胞死を制御する分子機構が明らかとなった。RGM-neogeninシグナルは、神経発生時に細胞生存を調節するために重要であり、さらには、中枢神経損傷後に、軸索再生阻害のみならず、神経細胞の生存を促し、秩序だった神経回路網の維持に働く可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者は、中枢神経再生を困難にする軸索再生阻害因子の一つであるRGMが、神経発生過程で細胞死の制御にも関与することを明らかにした。具体的には、RGMの受容体であるneogeninがRGM非存在下ではDAP-kinaseの活性を増強し細胞死が誘導されるが、リガンドであるRGMの存在下では、DAP-kinaseが不活性化されることで神経細胞の生存が促されることを示した。すなわち、RGMが中枢神経損傷後に、回復可能な神経細胞の生存を促し、更なる消耗を防ぐために傷害された神経細胞を脱落させるという細胞運命を決定し、秩序だった神経回路網の維持に働くことが示唆された。本研究は、神経軸索の再生を司るRGMが神経細胞の生存にも寄与していることを解明したという点で、神経再生研究に新たな展開をもたらすものであり、学位にふさわしい研究成果である。