

論文の内容の要旨

論文題目：放射状グリア細胞の神経分化における G タンパク質共役受容体 GPR157 の役割解析

(The G protein-coupled receptor GPR157 regulates neuronal differentiation of radial glial progenitors through the Gq-IP₃ pathway)

氏名：武尾 優

大脳新皮質は、記憶・認知や運動制御などの高次脳機能を司る。大脳新皮質を構成する神経細胞およびグリア細胞は、発生期において、放射状グリア細胞から産み出される。放射状グリア細胞は、脳室を取り囲む領域（脳室帯）を占有する細胞であり、その運命は発生時期に応じて規定される。大脳新皮質の発生初期には、放射状グリア細胞は対称分裂による自己複製を繰り返し、その細胞数を増大させる。発生の進行に伴い、放射状グリア細胞は非対称分裂をすることによって、一つの放射状グリア細胞と一つの **intermediate progenitor** を産出するようになる。**Intermediate progenitor** は神経細胞の前駆細胞であり、分裂後に二つの神経細胞を産み出す。一方発生後期になると、放射状グリア細胞はアストロサイトのようなグリア細胞を産生するようになる。このように、放射状グリア細胞の細胞運命は時期特異的に緻密に制御されており、その制御には放射状グリア細胞のもつ細胞内プログラムのみならず、外部環境由来の因子によるシグナリングが大きく寄与している。放射状グリア細胞の細胞運命に影響を及ぼす外界シグナリ

ングの由来としては、隣接する放射状グリア細胞や神経細胞と共に、髄膜や脳脊髄液等が知られている。しかしながら、髄膜や脳脊髄液等の外界シグナリングの理解は十分に進んでいるとは云えない。従来、種々の膜受容体を介したシグナリングが放射状グリア細胞の細胞運命を制御することが知られる。しかし、膜受容体の中でも最大のスーパーファミリーを構成している G タンパク質共役受容体（以下 GPCR）の寄与に関する報告は数少ない。そこで本研究では、放射状グリア細胞の運命制御を司る新規の仕組みに迫ることを目的とし、GPCR シグナリングに着目して解析した。

本研究において、GPCR の一つである GPR157 がマウス胎生期の脳新皮質に発現していることを見出した。GPR157 はリガンド未知の GPCR であり、これまでその機能に関する報告はない。GPR157 の発現部位について免疫組織染色法を用いて調べたところ、放射状グリア細胞が脳室内に突出させている一次繊毛に局在していることが明らかになった。そこで、GPR157 の役割を調べるために、GPR157 に対する shRNA を作製し、子宮内電気穿孔法を用いて放射状グリア細胞へと遺伝子導入した。その結果、GPR157 shRNA の導入に伴って、放射状グリア細胞の intermediate progenitor への分化が著しく抑制され、分化せずに放射状グリア細胞のまま留まることが判明した。この結果から、GPR157 は放射状グリア細胞の神経分化を促進していることが示唆された。

次に、GPR157 と共役する三量体 G タンパク質について検討した。多くの GPCR は構成的活性化能を持ち、細胞に過剰発現すると、下流の三量体 G タンパク質を活性化することが知られる。GPR157 を培養細胞において過剰発現すると、細胞内カルシウム濃度が顕著に上昇することを見出した。三量体 G タンパク質 α サブユニットは大別して Gas、Gai、Gaq、および Ga12 の 4 種類が存在する。これらの中で Gaq は、PLC β -IP $_3$ を介して細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こすことがよく知られる。そこで Gaq シグナリングを阻害する Gaq の C 末端領域断片を、GPR157 と共に発現したところ、GPR157 の過剰発現に伴う細胞内カルシウム濃度上昇が著しく抑制された。また同様の現象は、IP $_3$ 吸着タンパク質を共発現させることによっても観察された。このことから、GPR157 は Gq クラスの三量体 G タンパク質と共役し、IP $_3$ を介して細胞内カルシウム濃度を制御していることが明らかになった。

重要なことに、培養した放射状グリア細胞において GPR157 を過剰発現させる、または Gαq の恒常活性化型変異体を発現させると、神経分化が顕著に亢進した。一方、これらの発現と同時に、Gαq の C 末端領域断片または IP₃ 吸着タンパク質を共発現させると、放射状グリア細胞の神経分化は抑制された。さらに、生体内の放射状グリア細胞における GPR157-Gαq-IP₃ シグナリングの重要性を確かめるため、Gαq の C 末端領域断片または IP₃ 吸着タンパク質を子宮内電気穿孔法によって放射状グリア細胞に遺伝子導入した。その結果、GPR157 shRNA を遺伝子導入した場合と同様に、放射状グリア細胞の神経分化が抑制されることが明らかになった。これらの結果から、放射状グリア細胞の神経分化において GPR157-Gαq-IP₃ シグナリングが大きく寄与していることが確かめられた。

放射状グリア細胞の一次繊毛は、脳室内の脳脊髄液中に突出している。このことから、放射状グリア細胞の一次繊毛は脳脊髄液から様々な情報を受け取る役割を果たすと考えられている。GPR157 は放射状グリア細胞の一次繊毛に局在しており、このことから、GPR157 のリガンドがマウス胎仔脳の脳脊髄液中に存在していると推察された。そこで、マウス胎仔脳の脳脊髄液中に GPR157 のリガンドが存在するかについて検討した。放射状グリア細胞の自己複製が盛んな時期である胎生 10 日齢の脳脊髄液と神経細胞の生成が盛んな時期である胎生 13 日齢 (E13) の脳脊髄液について、GPR157 を活性化する能力を比較検討した。その結果、マウス胎仔脳の脳脊髄液中に GPR157 のリガンドが存在し、GPR157 に対する活性化能は神経分化が盛んな時期 (E13) に顕著に増加していることが明らかになった。

以上の結果をまとめると、GPR157 が Gαq-IP₃ シグナリング経路を介して放射状グリア細胞の神経分化において重要な役割を担っていることを明らかにした。また、脳脊髄液中に GPR157 のリガンドが存在し、その濃度が発生時期に応じて変化している可能性を見出した。これらの知見から、脳脊髄液中の神経分化因子による放射状グリア細胞の神経分化を GPR157 シグナリングが媒介しており、脳脊髄液と放射状グリア細胞の相互作用において、GPCR が架け橋となって主要な役割を担っているというモデルが提唱できた。