

論文の内容の要旨

論文題目： マウス神経発生における低分子量 G タンパク質

Ar18b の機能解析

氏 名 橋本 圭介

【序論】

Rab や Arf ファミリーに属する低分子量 G タンパク質は、様々なオルガネラに局在し、膜オルガネラ間の物質輸送に関与することが知られている。Arf-like 8 (Ar18) は Arf ファミリーに属し、主にリソソームに局在することが知られている低分子量 G タンパク質である。リソソームは内部に様々な加水分解酵素を含み、エンドサイトーシス、ファゴサイトーシスやオートファジーなど、様々な経路で取り込まれた細胞内外の物質分解を担うオルガネラである。また、リソソームは活性化されたシグナル伝達因子の分解や栄養物消化による細胞内代謝回転などを介して、細胞の恒常性維持に重要な機能を果たしている。これまでの培養細胞や線虫を用いた解析から、Ar18 はエンドソームやファゴソームがリソソーム

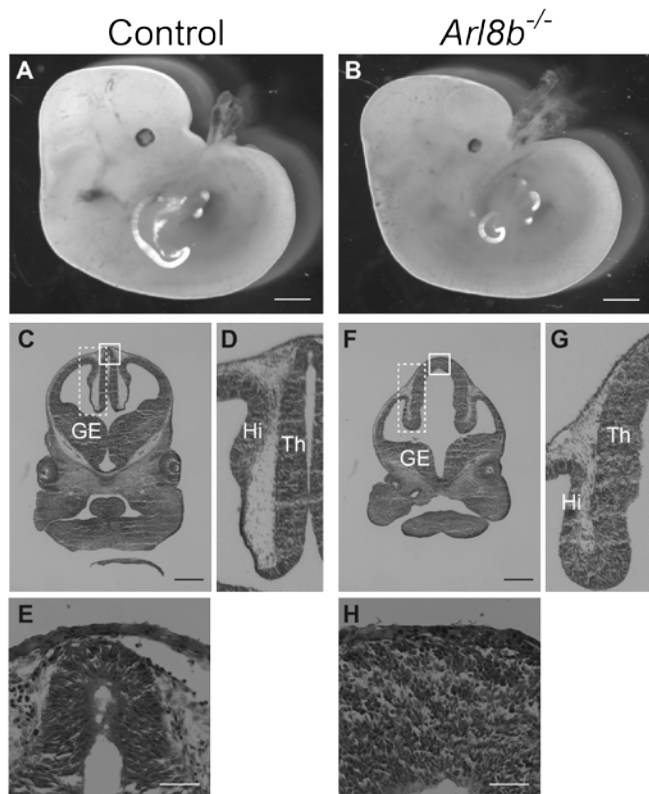


図 1. *Ar18b*^{-/-} は脳形成に異常を呈する

(A, B) 胎生 12 日の胎仔写真 (C-H) 胎生 12 日において脳の冠状断面（眼球を含む断面）を作製し、HE 染色を行った。*Ar18b*^{-/-} では脳室の拡大、基底核隆起の低形成、海馬や視床領域の神経上皮の肥厚が見られる。その他、小眼球症や無眼球症が観察される。

Hi: 海馬, Th: 視床, GE: 基底核隆起

ムとの融合に関与し、リソソームによる物質分解に促進的に機能することや、キネシンのアダプター分子と相互作用することにより、リソソームの細胞内輸送に寄与することが示されてきた。しかし、哺乳動物における *Arl8* の生理的重要性は明らかにされていない。哺乳動物には相同性の高い *Arl8a* と *Arl8b* が存在するが、今回私は *Arl8b* 欠損マウス (*Arl8b*^{-/-}) の表現型解析を行い、胚発生時の脳形成における *Arl8b* の重要性を見いだした。

【結果】

1. *Arl8b*^{-/-} は出生前後で致死となり、脳の発生に異常を呈する

Arl8b^{-/-} マウスは出生前後で致死となったことから、私は胎仔の表現型解析を行った。その結果、*Arl8b*^{-/-} マウスでは発生遅延が生じ、胎生 12 日では小眼球症や脳の形態に異常が観察された (図 1A, B)。胎生 12 日において冠状断面の切片を作製して詳細に解析したところ、脳室拡大、視床・海馬領域の形成不全 (図 1D, G)、間脳背側領域の神経上皮の肥厚 (図 1E, H)、基底核隆起の低形成 (図 1C, F) など、中枢神経の構造に異常を呈することを見いだした。そこで本研究では *Arl8b*^{-/-} マウスの脳形成異常に着目し、詳細に解析を行った。

2. *Arl8b*^{-/-} は胎生 10 日で、脳の背側正中線の発生が異常となる

Arl8b^{-/-} で異常が観察された視床・海馬は、胎生 10 日における脳の背側正中線を軸とした領域から発達し、形成される領域であることから、私は胎生 10 日の背側領域に着目して解析を行った。胎生 12 日の *Arl8b*^{-/-} では背側領域の神経上皮が肥厚していたことから (図 1E, H)、胎生 10 日における同領域の細胞死及び細胞増殖への影響を解析した。脳の背側領域は正中線軸上で細胞死が頻繁に観察されることが報告されているが、*Arl8b*^{-/-} の胎仔では脳背側正中線軸上での細胞死を起こした細胞の数が顕著に減少していた (図 2A)。また、背側正中線は他の領域と比較して EdU (分裂期にある細胞が標識される) で標識される細胞の数が少ない領域であるが (図 2B)、*Arl8b*^{-/-}

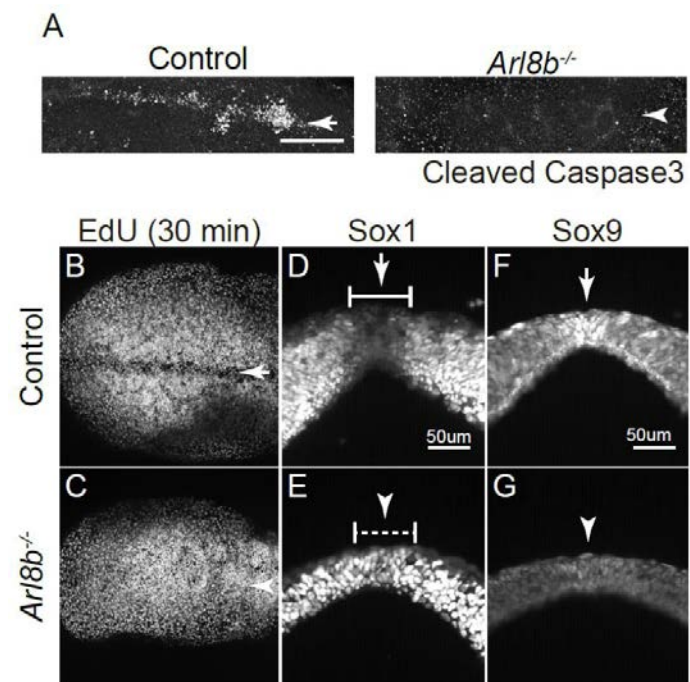


図 2. *Arl8b*^{-/-} では蓋板の発生が異常となる

(A-G) 胎生 10.5 日の胎仔の脳を cleaved-caspase 3 (A), EdU (B, C), Sox1 (D, E), Sox9 (F, G) で染色し、背側領域を観察した。(A-C) Whole mount 染色による脳背側領域の写真、(D-G) 冠状断面の切片染色。全ての写真の矢印は脳背側正中線を示す。

cleaved-caspase 3: アポトーシスマーカー, EdU: 細胞増殖マーカー, Sox1: 神経上皮細胞マーカー(蓋板で陰性), Sox9: premigratory neural crest マーカー(蓋板で陽性)

の胎児では背側正中線上の細胞も他の領域と同程度 EdU で標識された (図 2C)。神経管の背側正中線領域である蓋板は、中枢神経の背側の発生に重要であることが知られている。そこで、蓋板の遺伝子発現を検討する目的で、神経上皮細胞マーカーである Sox1 及び神経堤細胞のマーカー分子である Sox9 の発現を免疫染色により解析した。コントロールの蓋板では Sox1 の発現レベルは神経上皮に比べて低く、Sox9 は蓋板で陽性となることが知られている (図 2D, F)。しかし、*Arl8b*^{-/-} の蓋板に相当する領域では神経上皮と同程度に Sox1 が発現しており (図 2E)、Sox9 の発現は殆ど観察されなかった (図 2G)。これらの結果から、*Arl8b*^{-/-} の胎仔は胎生 10 日目に脳の蓋板の発生に異常が生じることが明らかとなった。

3. *Arl8b*^{-/-} は胎生 9 日で神経隆起の発生に異常を呈し、Bone Morphogenetic Protein (BMP) シグナルが増強する。

胎生 10 日目の蓋板は、神経管閉鎖期に神経外胚葉と非神経外胚葉の間に形成される領域 [Neural Plate Border, NPB (図 4、②の領域)] が発生の進行に伴い隆起 (神経隆起) し、互いに融合することで形成される。そこで、*Arl8b*^{-/-} の蓋板の発生異常がどのタイミングで生じるかを解析する目的で、神経隆起に特徴的な遺伝子発現と細胞死について解析した。コントロールの神経隆起では神経上皮に比べて Sox1 の発現レベルは低下していたが、*Arl8b*^{-/-} の神経隆起においては神経上皮細胞と同程度の Sox1 の発現が観察された (図 3A, B)。また、コントロールの神経隆起では細胞死が頻繁に観察されたが、*Arl8b*^{-/-} ではそのような細胞死は観察されなかった。以上により、*Arl8b*^{-/-} は神経隆起の発生異常を呈することが明らかとなった。

神経隆起の元となる NPB は、BMP シグナルにより神経外胚葉と非神経外胚葉の間の領域に形成されることが報告されている (図 4)。そこで BMP シグナル下流である活性化された Smad1/5 (pSmad1/5) を免疫染色により検討したところ、コントロールと比較して *Arl8b*^{-/-} の胎仔では pSmad1/5 の染色レベルが増強しており、*Arl8b*^{-/-} の胎仔は神経隆起において BMP シグナルが亢進することが明らかとなった。

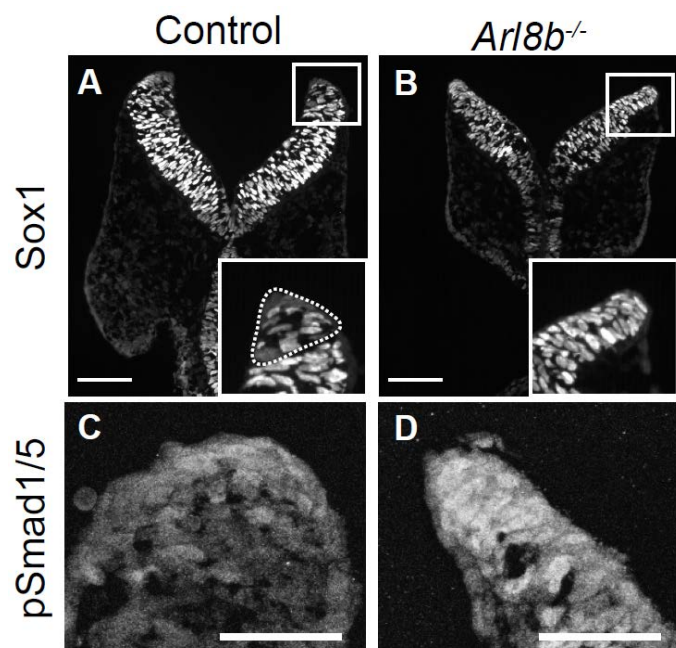


図 3. *Arl8b*^{-/-} では神経隆起の発生が異常となり、BMP シグナルが増強する (A-D) 胎生 9 日の胎仔の脳の冠状断面の凍結切片を作製し、Sox1 (A, B), pSmad1/5 (C, D) で染色した。(A, B) 四角で囲われた神経隆起の拡大写真を右下に示した。

【まとめと考察】

本研究により私は、*Arl8b* が BMP シグナルの負の制御を介して蓋板の発生に関与する可能性があることを見いだした。アフリカツメガエルやニワトリの胚を用いた解析では神経板期に神経外胚葉から非神経外胚葉に向かって BMP シグナルの勾配が形成され、その中でも特に“中程度の BMP シグナル”を受け取った細胞が NPB の細胞に運命決定されると報告されている（図 4）。*Arl8b*^{-/-}では神経隆起において BMP シグナルの増強が観察されたことから、異常に活性化された BMP シグナルによって NPB の細胞運命決定に異常が生じた可能性が考えられた。

活性化された Bmp リガンド-受容体複合体はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、リソソームで分解されることが報告されている。*Arl8* は後期エンドソームとリソソームの融合に関与し、リソソームによる物質分解の進行に重要であると考えられていることから、*Arl8b*^{-/-}ではリソソームによる活性化型 Bmp 受容体の分解に異常が生じ、神経隆起において BMP シグナルが増強した結果、蓋板の発生が異常となった可能性が考えられた。

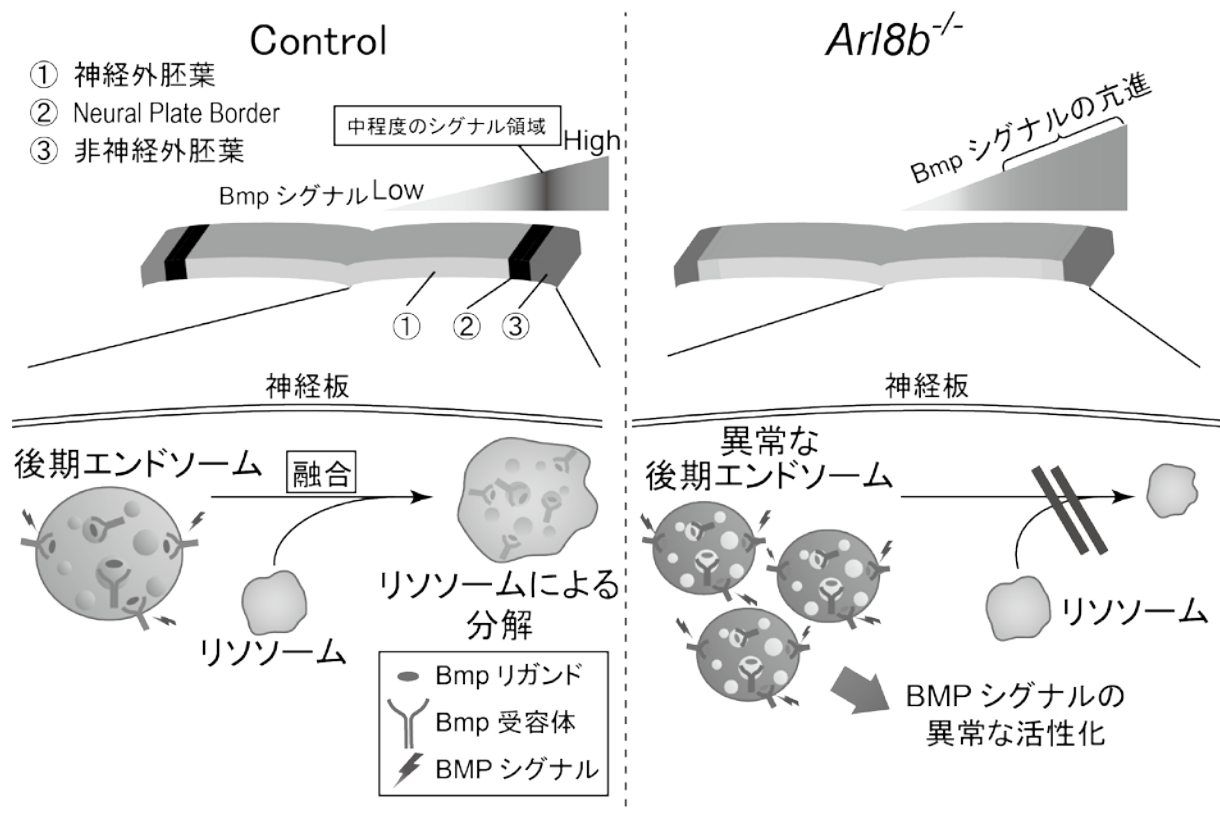


図 4. 本研究のまとめと想定されるモデル

活性化された Bmp 受容体は通常、リソソームで分解を受けてダウンレギュレーションされるが、*Arl8b*^{-/-}ではリソソームへの物質輸送に異常が生じるため、BMP シグナルが細胞内で持続的に活性化し、神経板での細胞の運命決定に異常を呈したと考えられる。