

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 橋本 圭介

リソソームは内部に多数の加水分解酵素を含み、エンドサイトーシス経路に代表される様々な経路で取り込まれた細胞内外の物質分解を担う細胞内小器官である。ADP-ribosylation factor-like 8 (Ar18) は、主にリソソームに局在することが示された唯一の低分子量Gタンパク質である。Ar18 はこれまでの解析から、エンドソームやファゴソームとリソソームが融合する際に繫留因子として働くことにより、リソソームの物質分解に促進的に機能することが示されてきた。しかしながら、Ar18 が細胞内で機能する局面の分子メカニズムについては詳細に解析されてきた一方で、生理的な役割に関しては未解明であった。

哺乳動物には Ar18a と Ar18b の 2 種類のアイソフォームが存在するが、「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」と題した本論文では、*Ar18b* ノックアウトマウスの表現型解析を行っている。その結果、*Ar18b* が初期胚において Bmp シグナルの制御を介した脳神経発生に重要であることを見出した。

1. *Ar18b* ノックアウトマウスは脳神経の発生に異常を呈する

Ar18b ノックアウトマウスは胎生 10.5 日目で脳領域の未発達を観察され、胎生 12.5 日目では海馬・視床や間脳領域の神経上皮が肥厚し、脳の背側領域の構造に異常を呈する。また、脳腹側領域(基底核隆起)や目の形成不全も観察され、中枢神経領域の発生に異常を呈する。

2. *Ar18b* ノックアウトマウスは神経隆起と蓋板の発生に異常を呈する

Ar18b ノックアウトマウスで異常の観察された脳背側領域の構造体は、神経管の蓋板領域から発達して形成される。*Ar18b* ノックアウトマウスでは対照マウスと比較して、胎生 10.5 日目で蓋板の細胞死が減少し、Sox1 や Sox9 などの蓋板に特徴的なパターンを示す遺伝子発現に異常が生じていた。これらの知見から、*Ar18b* ノックアウトマウスは蓋板の発生が異常となることが明らかになった。

蓋板は、神経管閉鎖期に神経板と呼ばれる板状の外胚葉が隆起(神経隆起)し、神経隆起が互いに融合することにより形成される。そこで、神経隆起の細胞死と遺伝子発現を検討したところ、*Ar18b* ノックアウトマウスの神経隆起では、死細胞数がコントロールと比べて顕著に減少し、Sox1 の遺伝子発現が陽性となっていたことから、神経隆起の発生に異常を呈することが示された。

3. *Ar18b* ノックアウトマウスは *Smad1/5* のリン酸化が亢進する

Ar18b ノックアウトマウスで異常の見られた神経隆起は、初期胚の外胚葉から BMP シグナルによって領域決定される。*Ar18b* ノックアウトマウスでは Bmp 受容体 IA が蓄積しており、その下流である *Smad1/5* のリン酸化の亢進が観察された。また、Bmp 受容体 IA の蓄積が観察された領域では後期エンドソーム/リソソームマーカの蓄積も観察された。これらの知見は、*Ar18b* ノックアウトマウスでは、*Ar18b* の欠損により Bmp 受容体 IA のリソソームへの輸送に異常が生じた結果、BMP シグナルが亢進した可能性を示唆している。また以上の結果から、*Ar18b* ノックアウトマウスでは、BMP シグナルが亢進した結果、神経隆起の領域決定に異常を呈した可能性が考えられた。

4. 胎生 8.5 日での *Bmp4* インジェクションは *Ar18b* ノックアウトマウスに類似した表現型を呈する

Ar18b ノックアウトマウスでは BMP シグナルが亢進しており、蓋板の発生が異常となった。そこで、これらの現象に因果関係があるのかを検討する目的で、胎生 8.5 日での *Bmp4* をインジェクションし、胎生 10.5 日の蓋板の遺伝子発現を検討した。その結果、対照溶媒をインジェクションした個体では蓋板での *Sox1* の発現が陰性であるのに対し、*Bmp4* をインジェクションした個体では神経管が閉じないが、蓋板に相当する領域で *Sox1* が陽性となり、*Ar18b* ノックアウトマウスと類似した表現型を示した。これらの結果から、*Ar18b* ノックアウトマウスで観察される蓋板の発生異常は、BMP シグナルによるものである可能性が示された。

本論文において、*Ar18b* ノックアウトマウスは神経隆起とそれに引き続く蓋板の形成に異常を呈することが示された。神経隆起は BMP シグナルによって領域決定されるが、*Ar18b* ノックアウトマウスでは Bmp 受容体 IA が蓄積しており、その下流である *Smad1/5* のリン酸化の亢進が観察された。さらに、*Bmp4* のインジェクションの実験系により、過剰な BMP シグナルが蓋板の発生異常を引き起こす可能性を明らかにした。本研究は、マウスで *Ar18b* が BMP シグナルの調節を介した脳背側領域の発生に重要であることを示した初めての知見である。リソソーム機能は神経変性疾患や癌の増悪など、様々な疾患にも密接に関与しており、個体における *Ar18* の機能を明らかにした本研究は、これらの疾患の理解にも貢献する。よって、本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。