

氏名(本籍) 寺島智也(大阪府)  
学位の種類 博士(医学)  
学位記番号 博士第406号  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
学位授与年月日 平成14年3月25日  
学位論文題目 Expression of Rho-family GTPases (Rac, cdc42, RhoA) and their association with p-21 activated kinase in adult rat peripheral nerve

(ラット末梢神経におけるRho-family GTPases (Rac, cdc42, RhoA)の発現とp-21 activated kinaseとの関係)

審査委員 主査 教授 遠山育夫  
副査 教授 新井良八  
副査 教授 竹内義博

## 論文内容の要旨

### 【目的】

神経系培養細胞にてRac/cdc42-pakシグナル経路は、細胞が外界のシグナルに応答して細胞骨格形成や細胞接着、形態変化(軸索伸長及び退縮など)を起こす際に重要な役割を担っていることが示されており、c-Jun N-terminal kinase (JNK) や extracellular-signal-regulated kinase (ERK) などの mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化や細胞周期酵素 cyclin-dependent kinase-5 (cdk5) / p35 の活性調節に関与している。一方、神経軸索の骨格蛋白であるニューロフィラメントは、JNK、ERK、cdk5 / p35 などによるリン酸化や脱リン酸化を受けることで軸索径や軸索輸送を調節をしている。

以上より、Rac/cdc42-pakシグナル経路は神経細胞の形態制御に深く関与していることが示唆されているが、in vivoの末梢神経組織におけるRho family-GTPases及びpakの意義についての報告はない。そこで、それらを明らかにするために本研究では末梢神経組織のRho family-GTPases及びpakの発現や局在、蛋白間結合、活性について検討した。

### 【方法】

5週齢雄性Sprague-Dawley (SD) ラットの後根神経節及び坐骨神経を摘出し、以下の実験に使用した。また、一部対照として大脳及び小脳を使用した。

1. 蛋白発現: SDラットより摘出した各種神経組織(大脳、小脳、後根神経節、坐骨神経)について、Rho-family GTPases (Rac, cdc42, RhoA) 及びpakに対する抗体を用いてImmunoblotを行い、それぞれの蛋白発現について検討した。
2. 局在: SDラットをパラホルムアルデヒドにて還流固定し、後根神経節及び坐骨神経を摘出してRho-family GTPases (Rac, cdc42, RhoA) 及びpakに対する抗体を用いた免疫組織化学にてそれぞれの局在を検討した。
3. 蛋白間結合: SDラットより摘出した各種神経組織(大脳、小脳、後根神経節、坐骨神経)について、Rho-family GTPases (Rac, cdc42, RhoA) 及びpakに対する抗体を用いて免疫沈降法およびImmunoblotを行い、Rho-family GTPases (Rac, cdc42, RhoA) とpakの蛋白間結合について検討した。
4. pak酵素活性: SDラットより摘出した各種神経組織(大脳、小脳、後根神経節、坐骨神経)について抗pak抗体にて免疫沈降を行い、p<sup>32</sup>を用いてヒストンH4を基質としたpak酵素活性を測定した。

### 【結果】

1. 蛋白発現: Rho-family GTPases (Rac, cdc42, RhoA) とpakは、中枢神経(大脳、小脳)

及び末梢神経（後根神経節、坐骨神経）で蛋白発現を認めたが、末梢神経での発現は中枢神経に比べて低い傾向を示した。

2. 局在：後根神経節においてRho-family GTPases (Rac, cdc42, RhoA) 及びpakの免疫反応はすべての神経細胞に検出され、特に細胞膜に強かった。坐骨神経においては、Rho-family GTPases (Rac, cdc42, RhoA) 及びpakの免疫反応は、軸索及びSchwann細胞に検出され、pakの免疫反応は軸索で最も強かった。
3. 蛋白間結合：中枢神経（大脳、小脳）及び末梢神経（後根神経節、坐骨神経）でRac-pak及びcdc42-pakの蛋白間結合が確認されたが、RhoA-pakについては中枢神経及び末梢神経両方で蛋白間結合は認められなかった。
4. pak酵素活性：中枢神経（大脳、小脳）及び末梢神経（後根神経節、坐骨神経）でpak酵素活性が認められ、坐骨神経は中枢神経と同程度の活性を示した。

#### 【考 察】

末梢神経組織において、Rac/cdc42-pakシグナル経路が神経細胞及びSchwann細胞に広く存在することが明かとなり、生理的条件下でシグナル伝達が行われている可能性が示唆された。神経系培養細胞を用いた実験によって、この経路は下流にあるとされるリン酸化酵素やニューロフィラメントを介して細胞の形態変化や神経細胞の軸索伸長に関わっていることが明らかとなっている。したがって、Rac/cdc42-pakシグナル経路は、末梢神経系でも形態維持や神経再生に重要な役割を担っていることが推測される。今後、この経路の標的となる酵素や蛋白の同定や病的条件下での検討が必要である。

#### 【結 論】

ラット末梢神経系においてRac/cdc42-pakシグナル経路が存在し、機能していることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

小分子GTPaseであるRac、cdc42、RhoAからなるRho familyとその結合蛋白p21-activated kinase (pak) によって構成されるシグナル経路は、神経細胞が外界のシグナルに応答して軸索伸長などの形態変化を起こす際に重要な役割を担う。この経路は中枢神経系では良く知られているものの、末梢神経系ではその存在を含め全く不明である。本研究は、ラット末梢神経系におけるRho family-pakシグナル経路の存在とRho familyメンバーとpak間の蛋白相互作用について検討したものである。

その結果、

- 1) Rac、cdc42、RhoAおよびpakは末梢神経で発現しており、pak活性も検出された。
- 2) Rac、cdc42、RhoAおよびpakは神経細胞とSchwann細胞に局在していた。
- 3) Rac-pakおよびcdc42-pak間の蛋白間結合が認められたが、RhoA-pak間の蛋白間結合は検出されなかった。

以上の結果は、ラット末梢神経系にRac/cdc42-pakシグナル経路が存在することを示している。

本研究は末梢神経でのRac/cdc42-pakシグナル経路の存在を初めて明らかにしたものであり、博士（医学）の学位授与に値するものと認める。