

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 医 学 ）	氏名	宮城 達博
学位授与の要件	学位規則第4条第1項・2項該当		
<p>論 文 題 目</p> <p>The subcellular dynamics of the Gs-linked receptor GPR3 contribute to the local activation of PKA in cerebellar granular neurons</p> <p>(Gs 共役受容体 GPR3 の細胞内動態は小脳顆粒神経細胞内における PKA の局所活性に寄与する)</p>			
<p>論文審査担当者</p> <p>主 査 教授 相澤 秀紀 印</p> <p>審査委員 教授 今泉 和則</p> <p>審査委員 准教授 丸山 博文</p>			
<p>G-protein-coupled receptor (GPR) 3 は、恒常的 Gs 活性化型 G タンパク質共役型受容体ファミリーに属し、細胞内 cAMP レベルを一定レベルに維持する受容体である。また、恒常的 Gs 活性化型受容体ファミリーは中枢神経系に豊富に発現していることが知られている。これまでに、GPR3 の中枢神経系における役割に関して、神経突起伸長、神経細胞分化・生存への関与について明らかになっている。さらに近年、アミロイドβ 産生や情動反応、神経因性疼痛、コカイン依存の強化などとの関連が報告されている。しかしながら、中枢神経系における GPR3 の詳細な発現分布や GPR3 の機能について十分に明らかにされていない。そこで、本研究では GPR3 の生理学的役割をさらに明らかにするため、マウス脳における GPR3 の詳細な発現分布を検討すると共に、小脳顆粒神経細胞における細胞内局在や動態を観察し、神経細胞局所における PKA 活性化に果たす GPR3 の役割について検討した。</p> <p>最初に、マウス脳およびラット小脳顆粒神経細胞における GPR3 の局在について検討した。中枢神経系における GPR3 発現に関しては、これまでに in situ ハイブリダイゼーション法により内側手綱核、大脳皮質、海馬、線条体、小脳での発現が報告されている。中枢神経系における GPR3 のさらに詳細な発現分布を明らかにするため、GPR3 ノックアウト LacZ ノックインマウス脳組織を用いて、GPR3 プロモーター活性分布を評価した。GPR3 プロモーター活性は内側手綱核、海馬 CA2、視床、橋において高い活性分布を示し、線条体、皮質、小脳、延髄、脳幹、脊髄での活性分布も観察された。</p>			

小脳神経細胞における GPR3 の局在解析については、GPR3 特異的抗体が存在しないため、蛍光タンパク質付加 GPR3 発現ベクターを神経細胞に遺伝子導入することにより検討した。各種細胞内マーカーと GPR3 の局在を比較したところ、GPR3 は細胞全体の形質膜や細胞体内ではゴルジ体、エンドソームで局在が観察された。さらに、神経突起内でも GPR3 陽性小胞が観察された。

次に、恒常的 Gs 活性化機能を有する GPR3 が、神経細胞局所の PKA 活性化に与える影響について検討した。解析には、一細胞レベルでの PKA 活性化解析が可能な PKA FRET インジケーター AKAR3EV を使用した。AKAR3EV を発現させた小脳顆粒神経細胞において、FRET フィルター(励起 438nm、吸収 542nm)にて得た画像を適正に補正した画像と、CFP フィルター(励起 438nm、吸収 483nm)にて得られた画像との蛍光強度の割合の変化を PKA 活性化の指標とした。小脳顆粒神経細胞では、神経細胞体形質膜で比較的高い PKA 活性化が観察されたが、細胞内小器官における PKA 活性化は観察できなかった。また、神経細胞体比べ神経突起先端においてより高い PKA 活性が観察された。さらに、神経突起先端での PKA 活性は、内因性 GPR3 発現抑制により低下し、GPR3 過剰発現により上昇することから、GPR3 発現量依存的事であることが明らかになった。

最後に、神経細胞における GPR3 の動態と機能について検討した。蛍光タンパク質付加 GPR3 を小脳顆粒神経細胞に発現させ、蛍光タイムラプスイメージング法により経時的に GPR3 の動態を観察した。驚くべき事に、GPR3 小胞は神経突起内を双方向に約 5 $\mu\text{m}/\text{min}$ の速度で移動していた。また、神経突起内での GPR3 小胞の移動は、約 50%が神経突起先端方向へ向かう順行性で、約 30%が逆行性であった。さらに、GPR3 小胞の順行移動はアクチン阻害剤、微小管阻害剤、ミオシン II 阻害剤により顕著に抑制されたが、キネシン V 阻害剤では抑制されなかった。同様に、神経突起先端部での GPR3 発現は、アクチン・チューブリン重合阻害剤、ミオシン II 阻害剤により減少したが、キネシン V 阻害剤では変化を認めなかった。さらに、神経突起先端における GPR3 による PKA 活性化は、ミオシン II 阻害剤により抑制された。以上の結果から、小脳顆粒神経細胞において GPR3 小胞はミオシン II 依存的に神経突起先端方向に輸送され、神経突起先端局所での GPR3 発現増加をもたらす、PKA 活性を上昇させることが明らかになった。

本論文は神経細胞分化に伴って発現誘導される GPR3 は、神経突起先端での PKA 活性を上昇させ、神経極性形成に寄与する可能性を示唆した。このことは発生における神経細胞の突起伸長と極性形成の分子メカニズムの理解に資すること大である。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。