

短(-204bp) ET-1 プロモーター・ルシフェラーゼ遺伝子活性がヘパリン投与により抑制された。さらに、この部に存在する ET-1 転写の基礎調節部位: GATA, AP1 共にヘパリンによって DNA-蛋白結合が抑制された。また細胞内情報伝達系の検討では、ヘパリン投与により内皮細胞における ERK の活性化が抑制された。

〔考察〕

ヘパリンは、内皮細胞において ET-1 遺伝子プロモーター活性を転写因子結合レベルで低下させて遺伝子発現を抑制することが明らかになった。これに関わる細胞内情報伝達には ERK 活性の変化が関与するものと推定される。このような ET-1 抑制作用がヘパリンの血管拡張作用や平滑筋増殖養成分作用に関わっている可能性がある。

〔結論〕

ヘパリンは、内皮細胞で ET-1 遺伝子発現を転写レベルで抑制する。

### 論文審査の要旨

ヘパリンは抗凝固作用のみならず、平滑筋細胞や内皮細胞でのエンドセリン (ET-1) の産生・分泌を抑制して血管収縮に関与することが報告されているが詳細は明らかでない。本研究の目的は分子細胞学的検討により、ヘパリンが内皮細胞において ET-1 遺伝子発現に対する作用を明らかにすることである。

ヘパリンは内皮細胞での ET-1 遺伝子発現を容量依存的に抑制した。プロモーター活性の検討では、作製した最短(-204bp) ET-1 プロモーター・ルシフェラーゼ遺伝子活性がヘパリン投与により抑制された。さらに、この部に存在する ET-1 転写の基礎調節部位: GATA, AP1 共にヘパリンによって DNA-蛋白結合が抑制された。また細胞内情報伝達系の検討では、ヘパリン投与により内皮細胞における ERK の活性化が抑制された。

従って本論文はヘパリンが内皮細胞で ET-1 遺伝子発現を転写レベルで抑制することを示した学術上意義の高い研究である。

41

氏名(生年月日)	田 中 輝 幸
本 籍	
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	乙第 2342 号
学位授与の日付	平成 17 年 12 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	<b>Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration</b> (細胞内モーター蛋白 dynein との共同作用としての, Lis1 と doublecortin による神経細胞遊走における神経細胞核と中心体の連結媒介機能)
主論文公表誌	The Journal of Cell Biology 第 165 巻 709-721 頁 2004 年
論文審査委員	(主査) 教授 大澤真木子 (副査) 教授 小林 横雄, 江崎 太一

### 論文内容の要旨

〔目的〕

ヒトでは, *Doublecortin* (*DCX*) と *LIS1* 遺伝子の変異は, いずれもほぼ同一の神経細胞遊走異常である滑脳症を来す。染色体 Xq22.3-q23 上の *DCX* 遺伝子は微小管関連蛋白 *DCX* をコードし, 染色体 17p13.3 上 *LIS1* 遺伝子は, 微小管および細胞内モーター蛋白ダイニン (dynein) の関連蛋白 *LIS1* をコードする。

近年のマウスの研究で, *Lis1* 蛋白と *Dcx* 蛋白の相互作用が示唆されたが, 遊走神経細胞におけるこれら蛋白の

作用は未だ解明されていない。本研究では、マウス神経細胞遊走における Dcx および Lis1 蛋白の細胞内レベル、あるいは細胞下レベルの機能の解明を目的とした。

#### 〔対象および方法〕

日齢5の野生型マウスおよび Lis1 +/- 変異マウスより小脳顆粒細胞を分離し、レトロウイルスによる形質導入法を用い緑色蛍光蛋白 (GFP) と共に Dcx および Lis1 を過剰発現させた後、高密度培養により細胞凝集塊を形成し、さらにその神経細胞凝集塊を、遊走許容基質 (リジン+ラミニン蛋白) でコートしたスライドガラスに移して培養を続け箱形スライドに移して培養を行い、神経細胞を凝集塊を起点とし放射状に遊走させた。遊走12時間後に、凝集塊と遊走した蛍光マーカー陽性神経細胞を蛍光顕微鏡で記録し、画像解析ソフトで各遊走細胞の遊走距離を測定し統計処理した。細胞内蛋白の局在性観察の目的には、Dcx, Lis1, および中心体 (centrosome) 蛋白セントリン (centrine) に、蛍光蛋白 GFP あるいは RFP を標識し、レトロウイルスを用い小脳顆粒細胞に形質導入し、蛍光顕微鏡を用い細胞レベル下の局在をリアルタイムに記録し解析した。

#### 〔結果〕

1. 野生型 Dcx および Lis1 の過剰発現は神経細胞遊走速度を増加し、疾患型変異を導入した Dcx/Lis1 にはこの効果がなかった。Lis1 +/- マウス神経細胞では神経細胞遊走距離が野生型細胞の約 60% であったが、野生型 Dcx の過剰発現は Lis1 +/- 神経細胞の遊走異常を正常化した。

2. Lis1 は正常神経細胞内では主に中心体に局在したが、微小管機能阻害下では核周囲の分布が明らかとなった。Dcx は核周囲から中心体まで延長する微小管構造に局在した。遊走中の神経細胞では、中心体が遊走方向に伸びる神経突起内を先行し、核がその後を追う位置関係が確認された。

3. Lis1 +/- マウス遊走神経細胞内では、核と先行する中心体との間の細胞内距離が増加し、両者の連結障害を示し、細胞内モーター蛋白 dynein の阻害でも同様の核-中心体連結障害および神経細胞遊走障害を来した。

4. これらの核-中心体連結障害は Dcx 過剰発現で正常化され、また Dcx は dynein と複合体を形成した。

#### 〔考察〕

蛍光蛋白標識した Dcx, Lis1, 中心体蛋白セントリンを形質導入した遊走神経細胞のリアルタイム画像分析により、Dcx と Lis1 の、核周囲と中心体において重複した細胞内局在が明らかとなり、Lis1 欠損神経細胞および細胞内モーター蛋白 dynein を阻害した野生型神経細胞では、共に核-中心体の距離が正常から逸脱した解離を示し、Dcx 過剰発現はこれらを共に正常化した。

以上の結果から、Lis1 と Dcx は dynein と共同で神経細胞遊走中の核-中心体連結を媒介し、遊走速度に対する量的効果を及ぼすことが示され、この連結障害が神経細胞遊走障害の細胞内レベルの機序であることが示唆された。

## 論文審査の要旨

*Doublecortin* (DCX) と *LIS1* 遺伝子の変異は、いずれもほぼ同一の神経細胞遊走異常である滑脳症を来す。DCX 遺伝子は微小管関連蛋白 DCX をコードし、*LIS1* 遺伝子は、微小管および細胞内モーター蛋白 dynein の関連蛋白 LIS1 をコードする。本研究では、蛍光蛋白標識した Dcx, Lis1, 中心体蛋白セントリンを形質導入した遊走神経細胞のリアルタイム画像分析により、Dcx と Lis1 の、核周囲と中心体における重複した細胞内局在を明らかにし、Lis1 欠損神経細胞および細胞内モーター蛋白 dynein を阻害した野生型神経細胞では、共に核-中心体の距離が正常から逸脱した解離を示し、Dcx 過剰発現により正常化することを明らかにした。

以上 Lis1 と Dcx は dynein と共同で神経細胞遊走中の核-中心体連結を媒介し、遊走速度に対する量的効果を及ぼすことが示され、この連結障害が神経細胞遊走障害の細胞内レベルの機序であることを示した。この点で価値がある。