

論文内容の要旨

申請者氏名 鳥山道則

神経細胞は、1本の長い軸索と複数の短い樹状突起を形成して極性を獲得する。しかしながら、神経極性形成の分子機構はよくわかっていない。本研究では、神経極性形成を担う分子のスクリーニングと機能解析を行うことで神経極性形成の分子機構の解明を目指した。

申請者は、極性形成前後のラット培養海馬神経細胞のタンパク質を高解像度二次元電気泳動法で解析した。6,197個のタンパク質スポットを解析した結果、277個の発現上昇が認められた。さらに、これらのうち95個のタンパク質スポットを同定した。

次に申請者は、同定された分子のうち新規分子Shootin1に着目し機能解析を行った。Shootin1に対する抗体を作成して発現を調べたところ、Shootin1は脳でのみ発現が認められた。また、培養海馬神経細胞の極性形成に伴って急激に発現量が上昇することも確認された。免疫染色法によりShootin1の局在を観察した結果、極性形成前の神経細胞においては、複数の未成熟な神経突起の先端に対称な局在を示したが、極性形成後には軸索の成長円錐のみに強い濃縮が認められ、将来樹状突起に分化する突起の先端からの消失が認められた。また、EGFP-shootin1を用いたTime-lapse観察の結果、極性形成前の神経細胞では、Shootin1が複数の突起先端で濃縮と消失を繰り返す様子が観察され、最終的には1本の突起先端のみにShootin1が濃縮してその突起が軸索へと分化する様子が観察された。Shootin1の過剰発現細胞においては、複数の突起先端にShootin1の局在が観察され、本来は1本しか形成されないはずの軸索が複数形成された。また、過剰発現とは対照的にRNAiによる内在性Shootin1の発現抑制では、神経極性の形成が阻害された。以上の結果からShootin1が神経極性の形成に対して重要な役割を担っていることが示唆された。

さらにEGFP-shootin1を用いたTime-lapse観察および過剰発現とRNAi実験の結果、Shootin1が細胞体から神経突起先端に向かって能動的に輸送され、突起先端におけるShootin1の濃縮が突起伸長を引き起こすことが明らかとなった。

近年、突起先端での局所的なPI3 kinaseとその下流で活性化される分子群の働きが神経極性の形成に重要な役割を果たすことが報告されている。Shootin1とPI3 kinaseの相互作用を免疫沈降法で解析したところ、Shootin1とPI3 kinaseが共沈することが解った。また、Shootin1過剰発現細胞では複数の突起先端でPI3 kinaseの活性化が、Shootin1発現抑制細胞では軸索先端でのPI3 kinase活性の抑制が認められた。さらにPI3 kinaseを阻害した場合には、Shootin1過剰発現による過剰軸索の形成が抑制された。これらの結果からShootin1はPI3 kinaseの上流で機能することが示唆された。

以上の研究成果から、Shootin1の非対称的な局在とそれに伴う局所的なPI3 kinaseの活性化が、神経細胞の極性形成に重要な役割を担うことが示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 鳥山道則

神経細胞は、1本の長い軸索と複数の短い樹状突起を形成して極性を獲得する。また、神経極性は神経細胞の行う情報処理に重要な役割を果たす。神経細胞は、培養条件下で細胞自立的に1本の軸索と複数の樹状突起を形成し細胞極性を獲得することがわかっている。また、最近の研究によって、PI 3-キナーゼおよびその下流分子群の細胞内における非対称なシグナルがあれば神経極性が形成されることがわかってきた。しかし、極性形成前の対称な神経細胞内にいかにして非対称なシグナルが形成されるかはわかっていなかった。

申請者は、高感度2次元電気泳動法を用いて5千個以上のラット培養海馬神経細胞のタンパク質をスクリーニングし、極性形成過程で発現量が上昇する95個のタンパク質を同定した。さらに、これらのうち新規の脳特異タンパク質Shootin1の機能解析を行った。Shootin1は培養神経細胞の極性形成過程で発現量が上昇し、はじめのうちは複数の神経突起先端に揺らぐように濃縮した。しかし、やがて1本の突起に集積してその突起を急激に伸ばして軸索形成を誘導し、その結果、神経細胞の対称性が破壊されて極性形成が引き起こされた。Shootin1を過剰発現させると軸索が複数形成されて神経極性に乱れが生じた。一方、RNAiによりShootin1の発現を抑制すると神経極性形成が阻害された。また、Shootin1が神経極性形成に重要な働きを果たすPI 3-キナーゼの上流に位置することを示唆するデータも得られた。

さらに申請者は、Shootin1が細胞体から神経突起先端に向かって能動的に輸送され、突起先端におけるShootin1の濃縮が突起伸長を引き起こすことも見出した。Shootin1は、共同研究者によって突起から細胞体へ拡散によって戻ることが示されている。Shootin1が極性形成過程で偶然ある1本の突起に多く濃縮した場合、その突起は他の突起より伸長する。その結果、その突起から細胞体にShootin1が拡散によって戻るのが要する時間が他の突起より延長する。そうするとその突起にとどまるShootin1の量が他の突起よりも増え、さらなる突起伸長（軸索形成）が引き起こされて対称性の破壊が起こる。すなわち、神経突起先端のShootin1の量と神経突起の長さの間には正のフィードバックループが形成される可能性がある。

以上のように、本論文はこれまでに報告されていたPI 3-キナーゼの上流で神経極性形成を引き起こす新規タンパク質Shootin1を同定したのみならず、Shootin1自身が神経細胞内で極性形成のための非対称なシグナルを生み出す可能性も示したものである。Shootin1が非対称なシグナルを形成するモデルは今後の更なる検証が必要であるが、本論文の学術上貢献するところは少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。