

論文内容の要旨

申請者氏名 森 達也

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、このような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、5千以上の培養海馬神経細胞のタンパク質スポットについて2次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析を行い、極性形成後の神経細胞内で発現量が上昇し軸索に濃縮する新規タンパク質を同定し、Singar1 (Single axon related 1) と命名した。

次に申請者は、Singar の構造と機能の解析を行った。まず Singar1 に対する抗体を作成して発現を調べたところ、Singar1 は脳でのみ発現が認められ、またリン酸化修飾を受けていることが示唆された。そして N 末端に 18 アミノ酸の挿入を持つ Splicing variant と考えられる Singar2 も脳特異的に発現していることが明らかとなった。さらに、Singar1、Singar2 は培養海馬神経細胞の極性形成に伴って発現量が上昇することを確認した。免疫染色法により Singar の局在を観察した結果、極性形成後の神経細胞の神経突起のうち、軸索の成長円錐により強い濃縮が認められた。

極性形成前の神経細胞において RNAi により Singar の発現を抑制した結果、神経細胞に過剰軸索の形成が誘導された。また、一度極性を形成した神経細胞においても、Singar の発現抑制は過剰軸索の形成を同様に誘導した。Singar1 あるいは Singar2 を過剰発現した神経細胞では通常の軸索形成が確認された。しかし、Shootin1 が誘導する過剰軸索の形成に対し、Singar1 が特異的に抑制効果を示した。さらに、Singar の発現抑制は Shootin1 が誘導する過剰軸索の形成を促進した。このことから、Singar1 は通常の軸索形成に影響を与えず、過剰軸索の形成を抑制し単一の軸索からなる神経細胞の極性を安定化する機能を有する可能性が示唆された。

Shootin1 は PI3 kinase 依存的に軸索形成を担っていることが報告されている。そこで、Singar1 と PI3 kinase の相互作用を免疫沈降法により解析した結果、HEK293T 細胞において相互作用が認められた。また、Singar の発現抑制により誘導される過剰軸索の形成が PI3 kinase 阻害剤により抑制されたことから、Singar1 は PI3 kinase のシグナル伝達経路に抑制的に機能し、過剰軸索の形成を抑制する可能性が示唆された。一方、恒常活性型 PI3 kinase の過剰発現により誘導される過剰軸索の形成は Singar の発現抑制により促進されなかった。このことから、Singar1 は PI3 kinase の上流に位置するシグナル伝達経路に対し抑制的に機能している可能性が示唆された。

以上のことから、Singar1 は PI3 kinase のシグナル伝達経路に対し抑制的に機能することで過剰軸索の形成を特異的に抑制し、単一の軸索形成を保証することで神経極性の安定化に寄与している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 森 達也

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。近年、神経細胞の極性形成について、軸索形成に関わる分子とそのシグナル伝達機構の解析が精力的に行われている。しかし、神経細胞がどのように単一の軸索を形成し、さらに極性を維持するのかについて、関連する分子やその仕組みはほとんど明らかとなっていない。

申請者は、極性形成後の神経細胞で発現量が上昇し、軸索に濃縮するタンパク質として新規分子Singar1を同定し、神経極性形成におけるSingar1の機能解析を行った。Singar1はSplicing variantであるSingar2と共に脳特異的に発現し、またリン酸化修飾を受けていた。Singar1は培養神経細胞の極性形成過程で発現量が上昇し、Minor processに比べ軸索の成長円錐により濃縮した。Singarの発現抑制は神経細胞に過剰軸索の形成を誘導した。また、一度極性を形成した神経細胞においてもSingarの発現抑制は神経細胞に過剰軸索の形成を誘導し、Singarが神経極性の維持に重要な機能を担っている可能性が示唆された。さらに、これまで報告されている軸索形成阻害分子とは異なり、Singar1の過剰発現は通常の軸索形成には影響を与えずShootin1が誘導する過剰軸索の形成のみを抑制した。そしてSingarの発現抑制はShootin1が誘導する過剰軸索の形成を促進した。

さらに申請者は、Singar1がPI3 kinaseとHEK293T細胞において相互作用することを見出した。そして、Singarの発現抑制により誘導される過剰軸索の形成はPI3 kinaseの活性に依存し、Singarの発現抑制は恒常活性型PI3 kinaseが誘導する過剰軸索の形成を促進しなかった。このことからSingar1はPI3 kinaseの上流に位置するシグナル伝達経路に抑制的に働き過剰軸索の形成を抑制する可能性が示唆された。現在、神経極性形成について、細胞全体に対するGlobalな軸索形成抑制シグナルと一本の神経突起先端におけるLocalな軸索形成促進シグナルの協調的な作用が神経極性形成に重要であるというモデルが考えられている。Singar1は前者のGlobalな抑制シグナルの一部を担い神経極性を安定化する機能を有している可能性が示唆された。

以上のように、本論文は神経細胞の過剰軸索の形成を抑制する新規タンパク質Singar1を同定したのみならず、これまでに報告されている他の分子のような軸索伸長抑制とは異なるメカニズムでSingar1が単一の軸索の形成を保証し神経極性の安定化に寄与する可能性を示したものである。Singar1が過剰軸索形成を抑制する分子メカニズムに関して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。