

論文内容の要旨

申請者氏名 中澤 瞳

神経細胞が軸索を形成し伸長させる際には、細胞体にある小胞体・ゴルジ装置で合成された膨大な量の膜成分を突起先端の細胞膜へ供給する必要がある。しかしながら、新たに合成された膜成分が細胞体からどのようにして軸索先端に輸送され、細胞膜へ供給されるのか、その分子機構はよく解っていない。本研究では、神経軸索形成抑制分子 Singar1 と相互作用する Rab33a に着目し、神経細胞内における Rab33a の機能解析を行った。

まず初めに、ラット脳の発達に伴う Rab33a の発現量の推移をイムノブロットにより解析した。その結果、Rab33a は胎生期から発現が認められ、神経突起伸長が盛んな胎生 18 日目で最も高い発現量を示した。同様に、培養海馬神経細胞の発現量の変化を調べた結果、軸索形成に伴って Rab33a の発現量の上昇が認められた。次に培養海馬神経細胞内における内在性 Rab33a の局在を解析するために、免疫染色を行ったところ、Rab33a は小胞上の膜タンパク質である synaptophysin、そして Golgi 装置のマーカータンパク質である Giantin、GM130、Adaptin、TGN38 と共局在することが解った。一方、エンドソーム上に局在するタンパク質と Rab33a との共局在は認められなかった。以上の結果から、Rab33a は synaptophysin 陽性の小胞のうち、エンドサイトーシス後の小胞ではなく、主にゴルジ装置で合成されて細胞膜へ輸送される小胞に局在すると考えられた。

次に、Rab33a が小胞輸送に関与する可能性を調べるために、Rab33a を発現抑制させた神経細胞に RFP-synaptophysin を発現させ、synaptophysin 陽性小胞の動きを解析した。その結果、Rab33a を発現抑制させた神経細胞では、軸索先端へ順行性に輸送される小胞の数とその輸送速度が有意に減少した。さらに、Rab33a が軸索先端における膜の供給に関与するかを調べるために、Rab33a を発現抑制させた神経細胞に、細胞膜に挿入されると蛍光を発するよう改変された synaptophysin(sypHy)を発現させ、細胞膜に融合した小胞の数を測定した。その結果、コントロールの細胞と比較して、Rab33a を発現抑制させた神経細胞では、軸索先端での膜融合のイベントが減少した。以上の結果から、Rab33a は synaptophysin 陽性の小胞の順行性輸送に関与し、さらに、軸索先端における膜の供給にも関与することが明らかとなった。

最後に、Rab33a が神経細胞の軸索形成に影響を及ぼす可能性を調べるために、Rab33a を発現抑制もしくは過剰発現させた神経細胞の形態を観察した。その結果、Rab33a を発現抑制させた細胞では、軸索をもつ細胞の割合が有意に減少し、突起の長さも短くなった。一方、野生型および恒常活性化型の Rab33a を過剰発現させた神経細胞では、過剰な軸索をもつ細胞の割合が有意に増加した。これらの結果より、Rab33a は軸索の形成に関与する重要な分子であることが明らかになった。

以上の結果により、Rab33a が神経細胞の細胞体で合成された膜成分の軸索先端への輸送および膜融合を担い、軸索の伸長および形成を制御することが初めて明らかになった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 中澤 瞳

神経細胞は軸索を伸長し、他の神経細胞とシナプスを介して結合することにより神経回路を形成する。この神経回路網の形成に重要な軸索は、細胞体から伸長し場合によっては細胞体の数万倍以上もの長さに達する。神経細胞がこの長い軸索を伸長させるには、細胞体にある小胞体・ゴルジ装置で合成された膨大な量の膜成分を軸索先端の細胞膜へ供給する必要がある。しかし、細胞体で合成された小胞体・ゴルジ装置由来の膜成分がどのようにして軸索先端に輸送されて細胞膜へ供給されるのか、その分子機構はこれまで不明だった。申請者は、Rab33a が神経細胞の細胞体で合成された膜成分の軸索先端への輸送および膜融合を担うことによって軸索の形成および伸長を促進することを初めて明らかにした。

申請者はまず初めに、Rab33a の発現部位と分布の解析を行った。その結果、Rab33a が主に脳に多く発現していること、そして神経突起伸長が盛んな時期に発現量が上昇することが解った。また、神経細胞内では、Rab33a が小胞上の膜タンパク質である synaptophysin や Golgi 装置のマーカー分子と共局在することが解った。一方で、エンドソーム上に局在するタンパク質と Rab33a との共局在は認められなかったことから、Rab33a は synaptophysin 陽性の小胞のうち、エンドサイトーシス後の小胞ではなく、主にゴルジ装置で合成されて細胞膜へ輸送される小胞に局在すると考えられた。

次に、共局在の認められた synaptophysin 陽性小胞のライブイメージング解析により、Rab33a が synaptophysin 陽性小胞の軸索先端への順行性輸送に関与すること、また、軸索先端における小胞膜の供給にも関わることを見出した。さらに、Rab33a が神経細胞の軸索伸長と形成を促進することが解った。また、恒常活性化型および恒常不活性化型 Rab33a を用いた解析より、活性化型の Rab33a が軸索形成に関わることも解った。以上の一連の研究により、Rab33a が軸索形成時期に細胞体で新たに合成されたゴルジ装置由来の膜成分の軸索先端への順行性輸送および軸索先端での膜融合を制御することで、軸索の形成および伸長を引き起こすことが明らかとなった。

軸索形成と膜輸送の関連についてはこれまでに、エンドソーム上の Rab 蛋白質による選択的な膜成分のリサイクリングによって軸索の形成が制御されている可能性が報告されていた。今回申請者が得た結果は、Rab33a がこれまで明らかにされていなかったゴルジ装置由来の膜輸送経路の制御に関与し、突起先端における膜供給によって神経細胞の軸索伸長と形成に関わることを示した。本論文の研究成果は、神経軸索の形成と伸長メカニズムの重要な側面を解明したと考えられる。

以上のように、本論文は神経細胞の軸索伸長機構について新たな知見を示すもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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。