

[別紙2]

## 審査の結果の要旨

氏名 藤 俊琳

本研究は神経細胞形態形成において重要な役割を果たしていると考えられる微小管関連蛋白(Microtubule Associated Proteins: MAPs) 2 と 1 B (MAP2・MAP1B) の生体内での機能を明らかにするため、標的遺伝子組み替え法を用いて作成した MAP2 及び MAP1B 欠失マウス、更に両者を欠失したダブルノックアウトマウスを作成し、細胞生物学的に詳細な解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. MAP2 と MAP1B ダブルノックアウトマウスは出生後 24 時間以内までに全例が死亡した。このマウスの脳の組織切片を観察したところ、MAP2 及び MAP1B シングルノックアウトと比較して重篤な構造異常が見い出された。すなわち、神経細胞移動の障害による著明な層構造の形成異常と神経突起(特に樹状突起)の伸長障害を呈した。
2. ダブルノックアウトマウスの脳では、大脳皮質、海馬、小脳、オリブ核その他の部位に層構造の乱れが顕著であった。この層構造の乱れの原因を調べるために、BrdU を用いた neuronal birth date analysis を行った。その結果、大脳皮質では、neuronal migration が著しく遅れていることが判明し、MAP1B や MAP2 の神経細胞移動における寄与が示唆された。
3. 脳から樹立した培養神経細胞を用いて神経細胞の形態を比較した。ダブルノックアウトマウスの神経細胞では、神経突起、特に樹状突起の伸長が著しく阻害されていることがわかった。また面白いことに、この神経細胞の成長円錐は異常に拡張してしまっていて、その中の微小管は通常のような tight array を形成せず、微小管の束化が阻害されている事が示唆された。更にダブルノックアウト及び MAP1B シングルノックアウトの神経細胞に

MAP2C (MAP2 のアイソフォームのひとつ) をアデノウイルスベクターを用いて導入したところ、神経突起の伸長が回復したところから、MAP1B と MAP2 の機能が overlap していることが確認された。

4. 電子顕微鏡を用いて神経突起中の微小管領域の構造を観察したところ、通常みられる平行な微小管の配列が失われ、微小管の側面が相互にいたるところで接触してしまっていることがわかった。これは MAP2 と MAP1B が神経突起中で微小管と微小管の間のスペーサーになっていることを示唆する。
5. 微小管の disorganization が vesicle transport に影響している可能性を考え、アデノウイルスベクターで導入した GAP43-GFP をマーカーとして time-lapse 解析を行ったが、vesicle transport は正常に保たれていることがわかった。従って、ここで観察された神経突起の伸展の異常は、vesicle transport の異常を介したものではなく、むしろ成長円錐における微小管の disorganization が直接成長円錐の前進運動に影響を与えていることが示唆される。

以上から、本論文は神経系の形態形成とりわけ樹状突起形成において、MAP2 と MAP1B は機能的なグループをなし、成長円錐で微小管の organization を通じて樹状突起伸長と細胞移動に重要な役割を持つことが示された。また、ダブルノックアウトマウスの脳では、神経細胞の migration の遅れが生じ、その結果、層構造が損なわれていることを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、微小管関連蛋白 MAP2 と MAP1B の生体内での機能の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。