

審査の結果の要旨

氏名 高根沢 康 一

LIS1 は I 型滑脳症の原因遺伝子として同定され、脳の形態形成時における神経細胞移動に機能することが明らかになっている。LIS1 は進化的に非常によく保存されており、カビを用いた遺伝学的解析から LIS1 は、Dynein-Microtubule 系の上流で機能することが報告されている。しかしながら、LIS1 がどのようなメカニズムで Dynein-Microtubule 系を制御し、最終的に、核・細胞の移動、細胞分裂に関与するかという点については不明な点が多い。当研究室では LIS1 に結合する分子として 2 つの新規蛋白質 (NUDE、NUDEL(NUDE-like)) を同定している。この分子はカビの核移動変異株の原因遺伝子の中で LIS1 の下流に位置する遺伝子の哺乳類ホモログであり、LIS1-NUDE 系はカビから哺乳類に至るまで保存されているマシナリーであることがわかった。本研究では、NUDE、NUDEL の相違点に着目し、その機能について解析を行った。

1. NUDE、NUDEL の組織、細胞における発現

まず、NUDE、NUDEL の成体マウスにおける組織分布を調べた。NUDE はほとんど全ての組織に発現しており、NUDEL は脳と精巣といった限られた組織にのみ高い発現が認められた。両者の発現が見られた脳の発生段階における発現を *in situ* hybridization 法により詳細に調べたところ、両者は発現時期、発現部位が異なっていることがわかった。NUDE は脳の発生初期に発現が高く、脳室層や小脳の外顆粒層といった特に分裂の盛んな部位に顕著な発現が認められた。その後は脳の発達に伴い発現は減少した。一方、NUDEL は脳室層と共に外套層に発生初期から発現し、その発現は成体においても強く見られた。両者の発現は培養細胞においても異なっており、NUDE は調べた全ての細胞において発現が見られたのに対して、NUDEL は NS-20Y 細胞や PC12 細胞といった神経系の細胞にしか発現が認められなかった。以上より、NUDE は全ての組織、培養細胞に発現し、普遍的な細胞機能、特に細胞分裂への関与が予想され、一方、NUDEL は脳の発達に関与する分子であることが予想された。

2. 細胞周期における NUDE の解析

細胞周期における NUDE の変化を想定し、NUDE のみの発現が確認された HeLa 細胞の細胞周期を同調させ、各ステージにおける NUDE の変化を調べた。その結果、細胞分裂期 (M 期) にのみ一過的なバンドのシフトが見られ、NUDE は M 期特異的にリン酸化されることが分かった。実際、NUDE は M 期に活性化される Cyclin dependent kinase 1 によりリン酸化されることが確認できた。さらに、NUDE の細胞内局在は、LIS1 と同様に細胞質画分の他、中心体への局在が確認され、NUDE を CHO 細胞に過剰発現すると、LIS1 を過剰発現させた場合と同様に、多核化、中心体の分散を伴う細胞分裂異常が観察された。これらことから、NUDE は中心体機能を調節することによって細胞分裂に関与することが示唆された。

3. 神経細胞における NUDEL の機能解析

PC12 細胞は神経栄養因子 NGF 刺激により突起を伸長させ、神経細胞様の形態を示すが、この突起伸長に伴い NUDEL が特異的に発現増加することを見出した。また NUDEL は、突起の先端にある微小管の先端付近に強く局在しており、微小管の伸長に伴う重合反応あるいは維持に関与しているのではないかと予想された。次に、NUDEL の役割を明らかにする目的で、アンチセンス法を行った。アンチセンスオリゴヌクレオチドにより NUDEL 蛋白質の発現減少とともに有意な突起伸長抑制効果が見られた。この結果から、NUDEL は突起伸長において非常に重要な分子であることが明らかとなった。NUDEL は海馬初代培養の神経細胞では神経突起の中でも特に軸索に優位に発現が認められ、さらに軸索の先端である成長円錐にも局在していることが明らかになった。これらの結果から、NUDEL は神経細胞の軸索の伸長反応あるいはその維持に関わる分子であることが示唆された。

以上、本研究は LIS1 新規結合蛋白質 (NUDE、NUDEL) の機能を生化学的、細胞生物学的手法により解析し、NUDE、NUDEL が役割分担をして機能していることを明らかにしただけでなく、細胞分裂、神経突起の伸長といった現象を理解する上で有益な手掛かりを与えており、博士 (薬学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。