

論文審査の結果の要旨

氏名 高坂 洋史

この論文では、ショウジョウバエ神経筋シナプスに関して、①標的選択過程における、筋肉細胞上の標的選択分子 CAPS の挙動と機能、②シナプス形成過程における、筋肉細胞上の細胞接着分子 FasII の挙動、について二章に分けて述べられている。

適切な神経接続が作られるまでにはいくつかの段階がある。軸索先端の成長円錐は、シナプスを作るべき細胞（標的細胞）の近傍に達すると、いくつかの細胞の中から標的細胞を選び出す。これを「標的選択過程」と呼ぶ。シナプスを作るべき相手が見つかったあと、シナプスが形成される。これを「シナプス形成過程」と呼ぶ。本論文では、それぞれの過程について、蛍光タンパク質を用いたイメージングによって解析している。

標的選択を実現するための一つの戦略として、標的認識分子を用いたものがある。これは、個々の標的細胞が標的認識分子と呼ばれるタンパク質を発現することで色分けされており、成長円錐がその分子を認識することで適切な細胞を探しあてるというものである。標的認識分子の発現パターンは、神経配線パターンを明快に説明できたが、実際に標的選択が起こる際の標的認識分子の挙動は明らかになっていない。そこで、本論文の前半では、蛍光タンパク質 GFP と共焦点レーザー顕微鏡を用いて、動的で一過的な標的選択過程の可視化を行なっている。特に、ショウジョウバエ神経筋結合の持つ、標的細胞が大きいという利点を生かして、標的細胞上の標的認識分子の挙動を解析した。標的細胞（筋肉細胞）で、標的認識分子カプリシヤス（CAPS）と GFP との融合タンパク質を発現させたところ、標的細胞の出す突起の先端に濃縮した。このことは、標的選択過程において標的細胞はその目印を突起の先端に掲げ、積極的に成長円錐との相互作用に向かっていることを示唆する。筋肉細胞の出す突起（「マイオポディア」）が成長円錐と相互作用してシナプス形成に関わることは報告されているが、本論文ではこの突起が標的選択に関わっているというモデルを提起した。生きた状態（*in vivo*）で成長円錐と筋肉細胞の可視化を行なったところ、標的選択過程において、マイオポディアの先端が成長円錐と接触し、さらにこの接触すべてが安定化するわけではないことを見出した。このことは、マイオポディアと

成長円錐との接触の際、何らかの認識が行なわれていることを示唆する。従来は、成長円錐が標的選択の主役であると考えられていたが、本論文では、標的細胞にも積極的な役割があることを提起する。

シナプス構造は、様々なタンパク質や膜構造の集合体であることが知られている。ところが、シナプス構造が形成される過程を経時的に解析した例はまだ少ない。そこで、本論文の後半では、*in vivo* でのシナプス後細胞におけるタンパク質を可視化することで、シナプス形成過程を解析している。シナプス後膜部にとって、シナプス前膜との接着の維持は重要であり、ショウジョウバエ神経筋結合系において、そのような分子として、細胞接着分子ファシクリン2 (FasII) が同定されている。そこで、FasII と蛍光タンパク質の融合タンパク質を筋肉細胞に発現させ、その挙動を観察した。この融合タンパク質は標的選択過程においては特に局在を示さないが、シナプスができはじめるとシナプス部に局在する。このことは、シナプスの安定性を支える細胞接着分子が、*in vivo* においてシナプス形成の非常に早い段階で既にシナプス部に集積していることを示している。筋肉細胞上の FasII がシナプス部に局在するしくみを検討したところ、シナプス前膜の FasII が関与していて、タンパク質局在に関わる分子 Dlg は関与していないことが分かった。一方、成熟したシナプスでは、FasII の局在に Dlg が重要であることが報告されている。これらのことは、シナプス形成過程と、成熟したシナプスとでは、タンパク質の局在を支えているしくみが違うことを示唆する。以上の結果は、*in vivo* のシナプス形成過程におけるタンパク質のシナプス部局在のしくみを示した最初の例である。

本論文では、標的選択過程とシナプス形成過程について、GFP を用いた可視化で解析を行なった。標的選択過程において、標的細胞の積極的な役割を示唆する結果を得た。また、シナプス形成過程の早い段階で、シナプス構造維持を担うタンパク質が、シナプス部に集積する様子をとらえた。これらの結果は、それぞれの過程及び、標的選択過程からシナプス形成過程へ移行するしくみの理解の基礎となると考えられ、神経接続が作られるしくみの細胞レベル、分子レベルでの解明に多大な寄与をなすものである。

この論文の第一章は、林茂生博士、櫻井香代子氏、能瀬聡直助教授との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究を行ったもので、提出者の寄与が十分であると認められる。従って審査員一同、博士（理学）の学位を授与するのにふさわしい研究であると判断した。