

論文内容の要旨

Analysis of the Molecular Mechanism of Neurite Elimination in *Caenorhabditis elegans*

(線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いた神経突起除去の分子機構の解析)

氏名 林 悠

高等動物の脳では、発生時に神経突起（軸索や樹状突起）の局所的な除去が起こることが古くから知られている（図 1A, B）。こうした過程は、精密な神経回路の構築あるいは維持に重要であると提唱されてきた。しかしながら優れた研究モデルが少ないため、その生理的意義を示す直接的な証拠は未だに乏しく、また、分子機構に関しても不明な点が多い。

さて、神経発生学の分野では、線虫 *Caenorhabditis elegans* が、神経形態を生きたまま観察できることや、302 個の神経細胞全ての接続様式が明らかにされている等の特長から、魅力的な研究対象である。私は修士課程において、線虫の成長過程で AIM と呼ばれる 1 対の介在ニューロンにおいて神経突起の除去が起きることを発見し、この過程に新規な転写因子 MBR-1 が関わることを示した（図 1C, 2）。この知見を起点に分子生物学的解析を進めることで、脳の発達や維持の機構の理解に大きく貢献できるものと期待される。博士課程において私は、線虫における神経突起除去の生理的意義の解析及びその分子機構（MBR-1 の上流調節因子と下流遺伝子）の解析を行った。

本博士論文は3つの章からなる。まず第1章では、神経突起除去の生理的意義の解析結果について述べる。線虫は同じ匂いに曝され続けるとその匂いへの応答が低下する（嗅覚可塑性を持つ）が、*mbr-1* 変異株ではベンズアルデヒドという揮発性物質に対する嗅覚可塑性が見られないことが示されている。そこで私は、この行動異常と神経突起除去の異常との関連を検討するために、行動異常の原因となるニューロンの同定を試みた。*mbr-1* 変異株の様々なニューロンで野生型の *mbr-1* を強制発現させたところ、嗅覚可塑性の異常は AIM ではなく、RIF と呼ばれる一対のニューロンで発現させたときに回復することが判明した。RIF で神経突起除去が起こるかは不明であったので、RIF の神経形態を野生株と *mbr-1* 変異株とで比較したところ、*mbr-1* 変異株の成虫では AIM と同様に左右が余分な神経突起で接続していた（図 2）。幼虫期の RIF は左右の細胞体が近接しており神経突起が形成されているかを判断するのは困難であったが、神経接続部位に局在するタンパク質を可視化したところ、野生株、*mbr-1* 変異株とも左右の RIF の接点にはギャップ結合構成タンパク質 NSY-5 の局在が検出された。これらの結果は、RIF も幼虫期にはギャップ結合を介して左右が接続しており、成長過程で MBR-1 によりその接続が除去されることを強く示唆している。RIF におけるシナプスの分布は左右非対称であり、右側ニューロンのみが嗅覚受容ニューロンと接続を形成することから、*mbr-1* 変異株では左右の接続により嗅覚情報処理に異常が生じた可能性がある。線虫では RIF 以外にも、多くのニューロンが左右非対称な接続パターンを形成することから、神経突起除去は正しい情報処理を行う上で重要な役割を担うと考えられる。なお、近年ギャップ結合の神経発生過程への関与が複数の動物種で指摘されているが、このような知見を踏まえると、成長過程で除去される神経突起が単なる副産物ではなく何らかの発達過程に関わる可能性も考えられる。また、以上の結果は神経突起除去が線虫において AIM に固有な現象ではなく、普遍的な現象であることを示唆した点においても意義があると考えている。

第2章では、神経突起除去が特定のニューロン・サブクラスで局所的に誘導される機構を解明する目的で、*mbr-1* の上流調節因子の探索を行った結果について述べる。本研究では2種のホメオドメイン転写因子、UNC-86 と LIN-11 について、前者は *mbr-1*

のプロモーター領域に結合配列が見出されたことから、後者は変異株が *mbr-1* 変異株と同様にベンズアルデヒドに対する嗅覚可塑性に異常があることから、*mbr-1* の発現制御に関わる可能性を検討した。それぞれの変異株について調べたところ、*unc-86* 変異株では AIM での *mbr-1* の発現が消失しており、一方 *lin-11* 変異株では RIF での *mbr-1* の発現が消失していることが判明した。さらに、*unc-86* 変異株では AIM での神経突起除去に異常があることも判明した。以上の結果は、ニューロンのサブクラス (AIM・RIF) により異なるホメオドメイン転写因子が *mbr-1* の発現を誘導することで、神経突起除去を引き起こすことを示している (図 3)。

第 3 章では、MBR-1 の下流遺伝子を 2 つの方法を用いて検索した結果について述べる。1 つ目では、幼虫期の野生株及び *mbr-1* 変異株の遺伝子発現をマイクロアレイ法および定量的 RT-PCR 法により網羅的に比較した。2 つ目では、リコンビナント MBR-1 タンパク質に結合するゲノム断片をクローニングし、MBR-1 結合サイトを探索した。前者では、野生株と *mbr-1* 変異株とで発現量の異なる遺伝子が 13 種、後者では MBR-1 が近傍に結合する遺伝子が 20 種得られた。中でも、アセチルコリン (ACh) 受容体及びアポトーシス関連因子の遺伝子はそれぞれ 4 種得られ、こうした因子が神経突起除去に関与する可能性が示唆された。MBR-1 がアセチルコリン受容体の発現を促進することで神経接続の可塑性を増す可能性や、局所的にアポトーシス経路を活性化することで神経突起の構造を不安定化させる等の可能性が考えられる (図 3)。

以上、本研究は線虫 *C. elegans* を用いて神経突起除去の生理的意義や分子機構を解析した初めての例であり、特定のニューロン・サブクラスで神経突起除去が誘導される生理的意義及びメカニズムの一端を明らかにした。本研究で同定した関連因子は動物種を越えて保存されており、本知見は、動物一般の神経突起除去の生理的意義とその分子機構を理解するための端緒となると期待される。

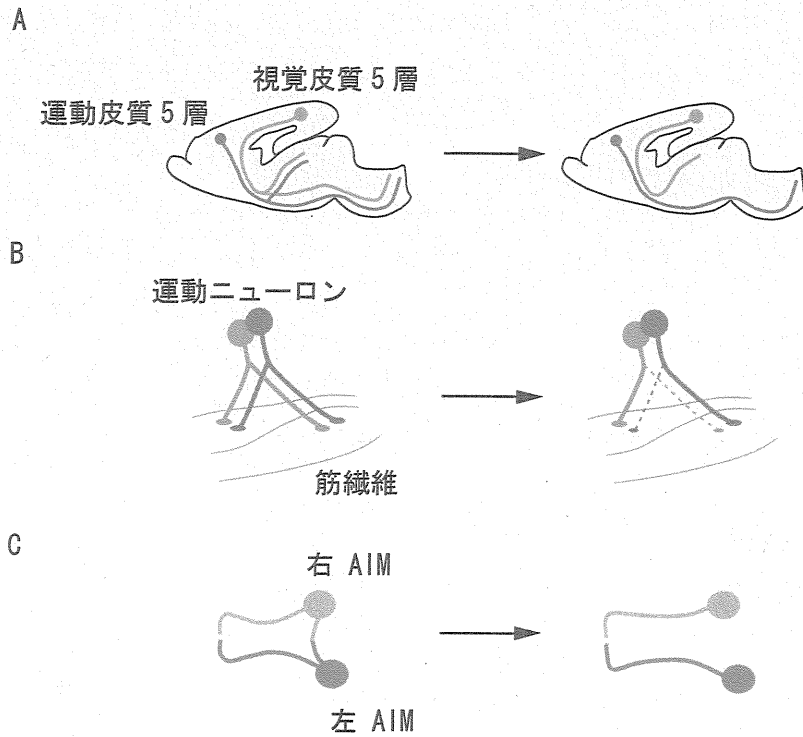


図 1 哺乳類では、生誕前後に大脳皮質 (A) や神経筋接合部 (B) で神経突起除去が見られる。一方、線虫では、AIM という頭部の介在ニューロンにおいて孵化直後に神経突起除去が起こることを私は見出した (C)。

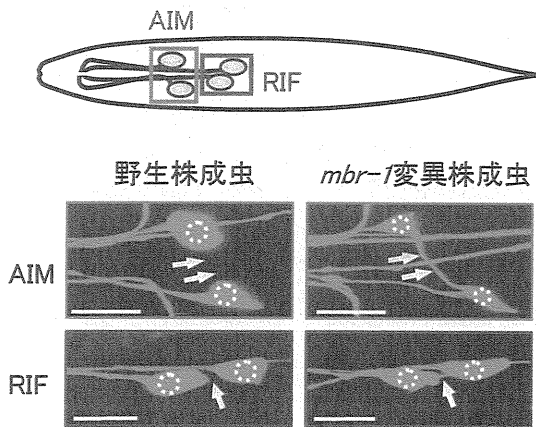


図 2 神経突起除去が起こらない *mbr-1* 変異株では、成虫期に AIM (上) や RIF (下) が余分な神経突起で接続している (矢印)。細胞体の位置を点線で示す。Bar = 10 μ m。

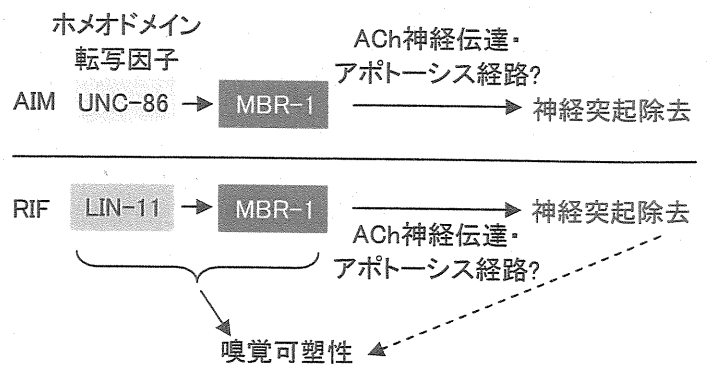


図 3 現在までの結果をまとめたモデル図。