

審 査 の 結 果 の 要 旨

関根 清薫

機能的な神経回路形成のためには、軸索と樹状突起がそれぞれの確な標的へターゲティングし、遺伝学的に規定されたシナフパートナーと出会うことが必要である。これまでの研究では、軸索ターゲティングに関する多くの分子機構が解明されてきた一方で、樹状突起ターゲティングについてはその形態の複雑さゆえほとんど研究が進んでいない。

ショウジョウバエの嗅覚系は一次感覚神経 (ORN) の軸索と二次投射神経 (PN) の樹状突起が、触角葉を構成する約50個の糸球体のうち1つを選別してターゲティングし、1対1の厳密な接続を行っている。本研究では先行研究のスクリーニングによって得られた樹状突起ターゲティング変異体 *meigo* (*medial glomeruli*; 迷子) の解析を通して、嗅覚系における回路形成の分子機構の解明を試みた。その結果、糖核酸トランスポーター *Meigo* がPN 樹状突起・ORN軸索両者のターゲティングにおいて、触角葉内の正中線-側方 (ML) 軸情報の認識に必須であることが明らかになった。また、軸索ガイダンスや細胞移動などさまざまな生命現象に関わるEphrin を過剰発現することで、*meigo* 変異体のPN 樹状突起ターゲティング異常が優位に抑制されることを見だし、触角葉のML 軸情報認識にEphrin が重要であることも示された。これらの結果は、シナフパートナーとしてのPN 樹状突起とORN 軸索が標的糸球体の位置認識をするために、共通の分子機構を用いていることを示唆するとともに、生体内でのEphrin シグナルにおける糖鎖修飾の重要性を提示するものである。

ショウジョウバエではMARCM 法 (遺伝学的モザイク解析法) を適用することで、単一神経のみを目的の遺伝子ホモ変異接合にし、かつその神経を遺伝学的にラベルすることができる。私は本学修士課程においてこのMARCM 法を用い *meigo* 変異体の表現型解析を行った。まずPN にMARCM 法を適用し、*meigo* 変異ホモ接合体のPN (*meigo*^{-/-}PN) を観察した結果、樹状突起は糸球体から溢れ出し、野生型よりも正中線側の糸球体にターゲティングした。樹状突起形態を定量解析したところ *meigo*^{-/-}PN の樹状突起は、背腹軸に関しての投射位置は正常である一方、ML 軸に関してのみ顕著な異常を示していることから、ML 軸に関する位置情報の認識に異常が生じていることが示唆された。

次にORN にMARCM 法を適用し、軸索ターゲティングを観察した。その結果、*meigo*^{-/-}ORNの軸索ターゲティングも正中線側へシフトすることが明らかとなった。したがって、*meigo* はORN 軸索にとっても、ML 軸情報の認識に必要であることが示された。これらの結果は、シナフパートナーであるPN 樹状突起とORN 軸索が標

的糸球体の位置情報を認識するうえで、それぞれ *meigo* の機能を必要としていること、すなわち異なる細胞種の異なるコンパートメント（樹状突起／軸索）において共通の分子メカニズムが採用されていることを示唆している。

meigo 遺伝子は酵母からヒトまで高度に保存されている8回膜貫通型蛋白質をコードしており、そのアミノ酸配列から糖核酸トランスポーターとして機能すると推定されている。C末端にはER 保留配列 (KKXX) が存在し、実際、抗Meigo 抗体を作製して免疫染色を行ったところショウジョウバエ培養細胞であるS2 細胞では主に小胞体マーカーと共局在した。興味深いことに、他の糖核酸トランスポーター遺伝子の変異体は、樹状突起ターゲティング異常を示さず、また、それらの遺伝子を過剰発現しても *meigo*⁻PN のターゲティング異常は抑制されなかった。この結果は、PN の樹状突起ターゲティングには、他の類似タンパク質には無いMeigo に特有の機能が必要とされていることを示唆している。

Meigo は主にER で機能し、さまざまな分子の糖鎖修飾及び折りたたみに関わることで、それぞれの分子の機能を間接的に調節していると考えられる。そこで、PN 樹状突起ターゲティングに必要な細胞膜タンパク質がMeigo によって機能調節されていると仮定し、その細胞膜タンパク質を同定するためにサプレッサースクリーニングを行った。ここでは糖鎖修飾がその機能に重要であると知られている糖タンパク質、および軸索ガイダンス分子を候補とし、それらの遺伝子の過剰発現で *meigo*⁻PN のターゲティング異常が抑制されるかを検証した。その結果、Ephrin の過剰発現が優位に樹状突起ターゲティング異常を抑制することが明らかとなった。また、細胞内ドメイン欠失型のEphrin過剰発現ではこのターゲティング異常を抑制する機能が弱かった。これらの結果によりEphrin はPN 樹状突起において受容体として機能していることが示唆された。

次に、PN におけるEphrin シグナルの必要性を確認するため、*ephrin-shRNA* を MARCM 法によって特定のPN にのみ発現させ、その表現型を解析した。その結果、樹状突起が糸球体から溢れ出るという *meigo*⁻PN とよく似た表現型を示した。その一方で、MARCM 法により特定のPN で *ephrin* を過剰発現させた結果、その樹状突起ターゲティングは側方にシフトするという *meigo*⁻PN とは逆の表現型を示した。以上の結果は、PN 樹状突起においてEphrinの発現レベルがML 軸情報の認識に関わることを強く支持するものである。

それでは、ER に局在するMeigo はどのようにEphrin シグナルに関わるのだろうか。一つの可能性として、Meigo がEphrin 自身の糖鎖修飾に関わり、その糖鎖修飾がEphrin シグナルを調節していることが考えられる。ショウジョウバエのEphrin には4ヶ所のN型糖鎖付加サイトがある。S2培養細胞において、あらかじめ内在性 *meigo* の発現を *dsRNA*により減弱させるところ、この4ヶ所全てにN型糖鎖修飾されているEphrinの比率が減少することを見出した。更に、N型糖鎖付加サイトに変異を

誘導した非糖鎖付加型Ephrin^{NQ1234}の過剰発現は、*meigo*¹/PNの表現型を抑制する機能が弱いことを明らかにした。これらの結果は、MeigoがEphrinの効率的な糖鎖修飾に関わっており、その結果Ephrinシグナルを正に制御することを示唆している。

本研究は、PN樹状突起ターゲティングにおいて糖核酸トランスポーターMeigo及び糖タンパク質Ephrinが、触角葉内のML軸情報の認識に重要であることを明らかにした。同様のML軸情報認識機構はORN軸索でも機能していることが示唆されており、限られた種類のターゲティング分子でシナプspartnerを同一の場所へ誘導するための合理的な戦略が存在すると考えられる。また、これまでEphrinシグナルにおける糖鎖修飾の重要性は注目されてこなかったが、今回検証したN型糖鎖付加サイトの一つは種をこえて広く保存されている。したがって、本研究によって明らかにされた糖鎖修飾による機能調節という視点は、神経回路形成だけでなくEphrinが関わる細胞移動、境界形成などの生命現象を解明する一助となることが期待される。以上より、本研究は博士(薬学)の学位に値すると判定した。