

論文の内容の要旨

新規蛋白質 Dogi による 初期エンドソーム成熟を介した軸索伸長機構の解明

佐久間 知佐子

【序】

神経細胞は高度に極性化した細胞突起(軸索・樹状突起)を有し、それらを適切に配線することによって複雑な神経回路網を作りだしている。神経突起の形態形成を正確に行うために、神経突起は周囲の環境を正しく認識し、突起内で時空間特異的に適切な分子を運ぶ必要がある。この過程において、エンドサイトーシスとその後のエンドソームの成熟、および輸送が非常に大きな役割を果たしている。例えば、伸長中の軸索突起先端において、細胞膜表面分子(接着分子やガイダンスレセプター)の量がエンドサイトーシス経路によって調節され、それにより軸索が正しい標的へと到達する。エンドソームの成熟に関して、培養細胞や初代培養系では研究が進み多くの分子の関与が明らかになっているが、生体内での生理的意義は殆ど解明されていない。本研究では、ショウジョウバエ嗅覚系神経回路を用いて脳内における初期エンドソームの成熟が軸索伸長に重要であることを示し、更にこの過程を制御する進化的に保存された新規分子 Dogi を同定し、その機能解析を行った。

【方法と結果】

1. *dogi* 変異神経は軸索伸長と樹状突起の枝分かれに異常を示す

ショウジョウバエ遺伝学的モザイク解析法：MARCM 法は、脳内で単一神経細胞のみを可視化し、且つ目的の遺伝子ホモ変異接合体にすることを可能にする(図 1a,b)。私は本学修士課程においてこの MARCM 法を用いて、*dogi*⁶⁻⁴⁰ 変異ホモ接合体 投射神経(*dogi*⁶⁻⁴⁰ PN)の表現型解析を行った。*dogi*⁶⁻⁴⁰ PN では、軸索が野生型に比べて顕著に短くなっていた。野生型軸索が側角でL字型の枝分かれをする(図 1c)のに対し、*dogi*⁶⁻⁴⁰ PN 軸索は側角の先端まで伸長しなかった(図 1e)。更に樹状突起においても野生型 PN が決まった一つの

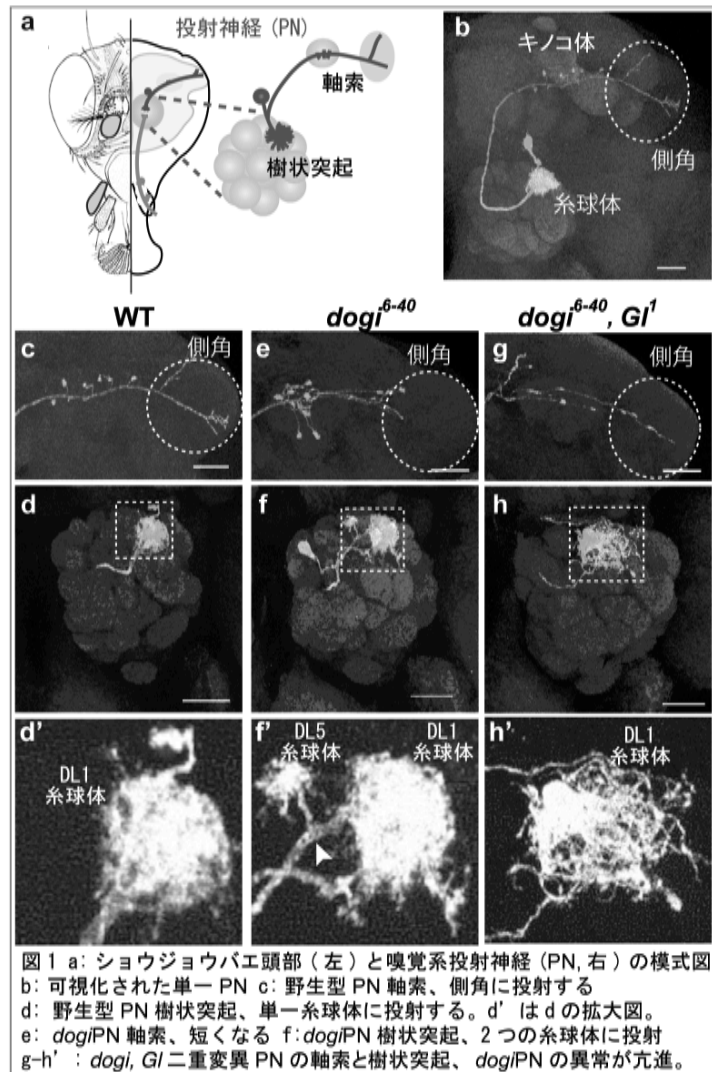


図 1 a: ショウジョウバエ頭部 (左) と嗅覚系投射神経 (PN, 右) の模式図
b: 可視化された単一 PN c: 野生型 PN 軸索、側角に投射する
d: 野生型 PN 樹状突起、単一糸球体に投射する。d' は d の拡大図。
e: *dogi*PN 軸索、短くなる f: *dogi*PN 樹状突起、2つの糸球体に投射
g-h' : *dogi*, *Gl* 二重変異 PN の軸索と樹状突起、*dogi*PN の異常が亢進。

糸球体に投射する(図 1d, d')のに比べ、*dogi*⁶⁻⁴⁰ PN では樹状突起の枝分かれ回数が一回増加し(f、矢頭)、2つの糸球体に投射していた(図 1f, f)。

2. *Dogi* は *Glued* と結合し、遺伝学的にも相互作用する

*dogi*⁶⁻⁴⁰ 変異体の原因遺伝子 *dogi* は酵母からヒトまで進化的に保存された蛋白質 *Dogi* をコードしている。*Dogi* は、既知の機能ドメインを有しておらず、その機能は未知である。私は *Dogi* の機能解析を行う目的で、酵母ツーハイブリッド法を用い、*Dogi* が相互作用する候補分子として、微小管輸送において重要な役割を果たす *Glued* (*Gl*, ヒト p150^{Glued} のホモログ)を単離した。ショウジョウバエ胚のライセートを用いた免疫共沈降実験により、内在性 *Dogi* が内在性 *Gl* と結合することを確認した。また、*dogi*⁶⁻⁴⁰, *Gl* の二重変異神経において、*dogi*⁶⁻⁴⁰ PN で観察された軸索伸長と樹状突起の枝分かれ異常が相乗的に増悪した(図 1g, h, h')。以上より、*Dogi* と *Gl* は生化学的にも遺伝学的にも相互作用することが明らかとなった。

3. 発生中の *dogi* 変異神経において初期エンドソームの局在に異常が生じた

GI は微小管逆行輸送のモーター蛋白質 Dynein を制御する Dynactin 複合体の主要構成因子である。そこで、Dogi も微小管輸送に関与し、発生中の神経突起において形態形成に必要な分子を輸送することで軸索伸長と樹状突起の枝分かれを制御すると仮定した。軸索伸長が起きている蛹期の投射神経において、Dynein/Dynactin によって微小管上を輸送される初期エンドソームの局在を観察したところ、野生型(図 2a)に比べ、*dogi*⁶⁻⁴⁰ PN では軸索束に局在する初期エンドソームの量が顕著に増加していることが判明した(図 2b,c)。

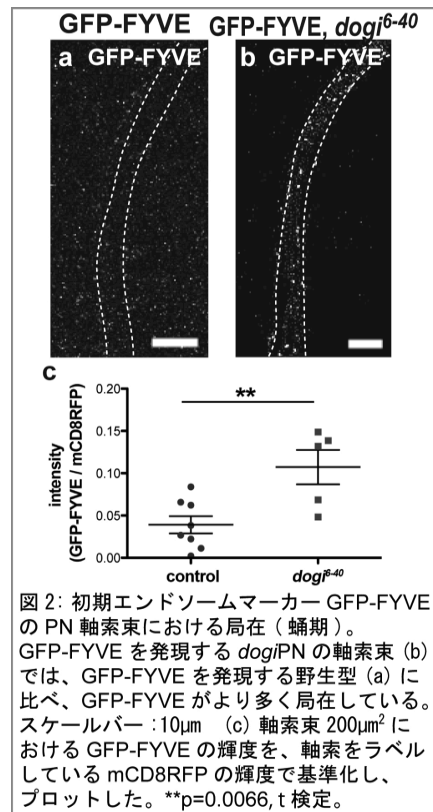


図 2: 初期エンドソームマーカー GFP-FYVE の PN 軸索束における局在 (蛹期)。GFP-FYVE を発現する *dogi*PN の軸索束 (b) では、GFP-FYVE を発現する野生型 (a) に比べ、GFP-FYVE がより多く局在している。スケールバー: 10 μ m (c) 軸索束 200 μ m² における GFP-FYVE の輝度を、軸索をラベルしている mCD8RFP の輝度で基準化し、プロットした。**p=0.0066, t 検定。

4. Dogi ノックダウン細胞において初期エンドソームの成熟に異常が生じる

Dogi がどのように初期エンドソームの輸送に関与しているかを解明するために、ショウジョウバエ S2 細胞において、初期エンドソームの局在を調べた。興味深いことに、Dogi ノックダウン細胞において、初期エンドソームマーカーの一つである Avalanche(Avl, Syntaxin 7 のホモログ)の免疫組織化学が減少し、コントロール細胞(図 3a,c)で観察された

Avl の核周辺への蓄積が観察されなかった(図 3b,c)。FM1-43 色素を用いて、コントロール細胞と Dogi ノックダウン細胞でエンドサイトーシスアッセイを行ったところ、いずれの細胞においてもエンドサイトーシスは確認された。しかし、

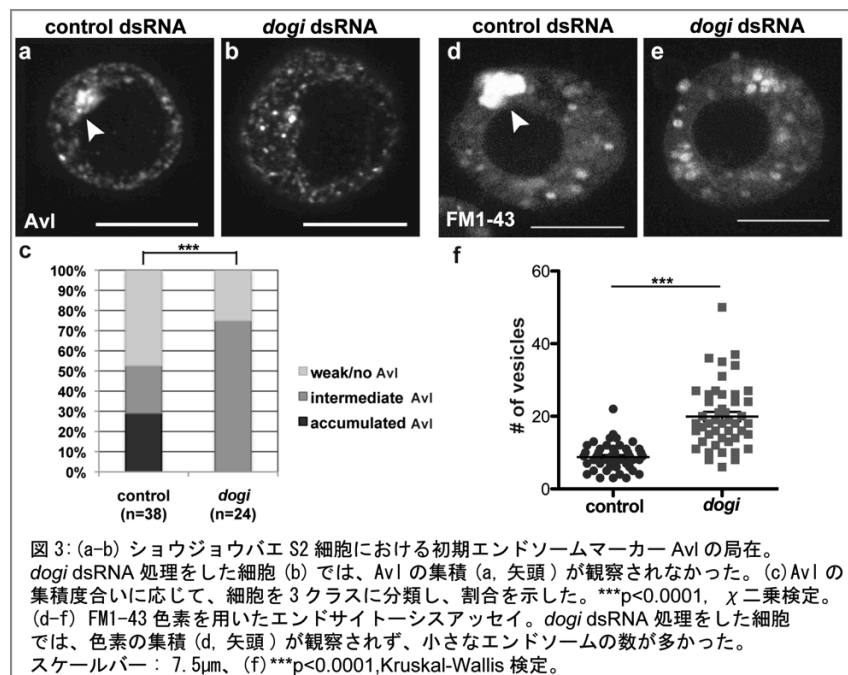


図 3: (a-b) ショウジョウバエ S2 細胞における初期エンドソームマーカー Avl の局在。*dogi* dsRNA 処理をした細胞 (b) では、Avl の集積 (a, 矢頭) が観察されなかった。(c) Avl の集積度合いに応じて、細胞を 3 クラスに分類し、割合を示した。***p<0.0001, χ^2 乗検定。(d-f) FM1-43 色素を用いたエンドサイトーシスアッセイ。*dogi* dsRNA 処理をした細胞では、色素の集積 (d, 矢頭) が観察されず、小さなエンドソームの数が多かった。スケールバー: 7.5 μ m、(f) ***p<0.0001, Kruskal-Wallis 検定。

FM1-43 色素を加えた 40 分後には、コントロール細胞で FM1-43 色素の蓄積(図 3d,f)が見られる一方、Dogi ノックダウン細胞では FM1-43 色素の蓄積は観察されなかった(図 3e,f)。またヒト Dogi をノックダウンした HeLa 細胞において EGF-Alexa488 の取り込み実験を行った際にも核近傍における EGF-Alexa488 の蓄積が観察されなかった。

5. Dogi は Rab5 と協調的に初期エンドソームの成熟に関わることで軸索伸長を制御する

初期エンドソームは融合を繰り返し、より大きな初期エンドソームへと成熟する。低分子量 G 蛋白質の Rab5 とそのエフェクター分子群は、エンドサイトーシスと初期エンドソームの成熟に関与することが知られている。*Rab5²* PN は *dogi⁶⁻⁴⁰* PN と同様に、軸索伸長と樹状突起の枝分かれに異常を示した。そこで、*dogi⁶⁻⁴⁰* PN に恒常活性化型 Rab5 もしくは機能欠損型 Rab5 を強制発現したところ、恒常活性化型 Rab5 を発現した *dogi⁶⁻⁴⁰* PN では、軸索伸長の異常が改善され(図 4c, e)、機能欠損型 Rab5 を発現した *dogi⁶⁻⁴⁰* PN では、異常が顕著に亢進した(図 4d, e)。また、ショウジョウバエ胚ライセートを用いた免疫共沈降実験により、内在性 Dogi が内在性 Rab5 と複合体を形成することを確認した。以上の結果から、Dogi は Rab5 と協調的に働き、微小管上の初期エンドソームの成熟に関わることにより、PN の軸索伸長を制御していることが明らかとなった。

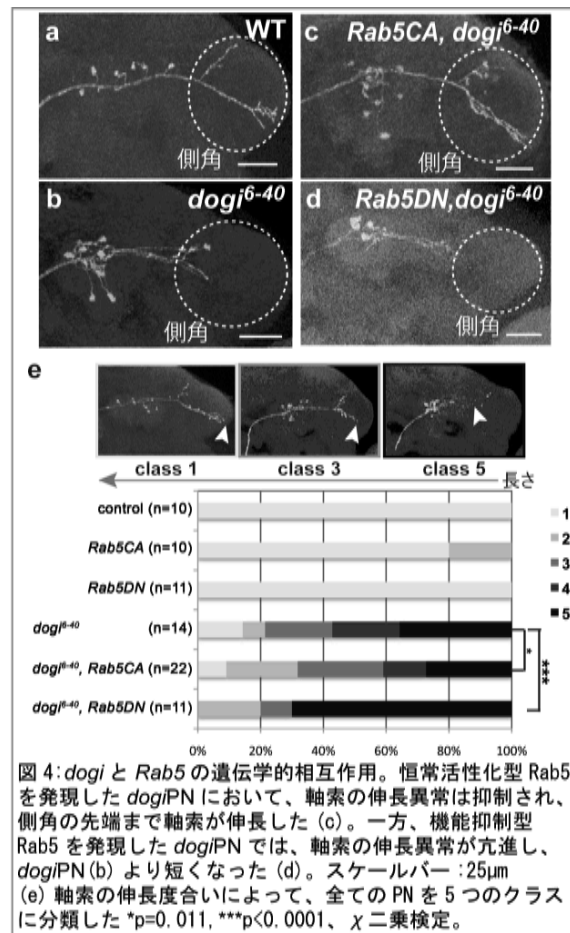


図 4: *dogi* と *Rab5* の遺伝学的相互作用。恒常活性化型 Rab5 を発現した *dogi*PN において、軸索の伸長異常は抑制され、側角の先端まで軸索が伸長した (c)。一方、機能抑制型 Rab5 を発現した *dogi*PN では、軸索の伸長異常が亢進し、*dogi*PN (b) より短くなった (d)。スケールバー: 25µm (e) 軸索の伸長度合いによって、全ての PN を 5 つのクラスに分類した **p*=0.011, ****p*<0.0001、 χ^2 二乗検定。

【まとめと考察】

本研究ではショウジョウバエ嗅覚系投射神経(PN)において、新規分子 Dogi が初期エンドソームの成熟に関わることにより、軸索伸長を制御していることを明らかにした。本研究で新しく同定した Dogi は、Dynein モーターの調節を担う Dynactin 複合体の主要構成因子である Glued と結合する。更に、初期エンドソームの成熟を担う Rab5 とも複合体を形成する。これまで初期エンドソームの融合を担う Rab5 と、初期エンドソームの輸送を行う

Dynein、Glued の働きはそれぞれ明らかにされていたが、両者を結び付ける研究はなされていなかった。今回、この両者と複合体を形成する新規蛋白質 Dogi を見出し、Dogi がエンドサイトーシス直後の未成熟な初期エンドソームの輸送を Dynein、Glued と共に調整することで、Rab5 およびそのエフェクター蛋白質による「未成熟初期エンドソームの融合」を促進していることを示した。このような Dogi の働きにより、初期エンドソームの成熟は円滑に進められる。成熟した初期エンドソームは、エンドサイトーシスされた分子が分解されるか、膜表面へとリサイクルされるかの運命決定を行う重要な細胞内小器官であり、加えて細胞の生存や増殖に関わる種々のシグナル経路を活性化させる働きも行う。そのため、初期エンドソーム自身の形成・成熟は細胞にとって重要な過程と考えられているが、その生体内での役割はそれほど解明されていなかった。よって本研究は、脳内での軸索伸長過程に初期エンドソームの成熟が重要であることを示した初めての報告であり、神経回路形成におけるエンドソームの役割について新たな洞察を与えたと言える。また、初期エンドソームの成熟は神経以外の細胞でも広く起きる現象であるため、様々な細胞におけるエンドサイトーシス経路の役割の理解にも Dogi の研究は新たな洞察を与えることが期待される。

Dogi は進化的に高度に構造が保存されている蛋白質である。*dogi*⁶⁻⁴⁰ PN にマウスオルソログの cDNA を強制発現しレスキュー実験を行ったところ、軸索伸長および樹状突起の枝分かれ異常が回復した。このことより、Dogi の機能も種間で保存されていることが予想された。哺乳類神経発生における Dogi の機能を調べる目的で、子宮内電気穿孔法を用い、マウス大脳皮質の錐体神経において Dogi をノックダウンしたところ、錐体神経の移動に異常が生じた。既に錐体神経の大脳皮質における移動には、Rab5, 7, 11 などによる、N-cadherin のトラフフィッキングが重要であることが報告されているため、マウスにおいて Dogi は Rab5 と協調的に錐体神経の移動を調節していることが推察される。

また Dogi の結合相手の Glued のヒトオルソログ p150^{Glued} は、神経変性疾患の原因遺伝子である。代表的な変異は、p150^{Glued} の微小管結合ドメインである CAP-Gly ドメイン内に生じている。微小管逆行輸送は軸索突起先端の置かれている状況を細胞体に伝える役割があり、この情報に応じて神経は不適切な環境にある軸索を変性させたり、生存シグナルを活性化させたりする。逆行性輸送に異常が生じると、突起の情報が伝わらないため、軸索の変性が始まると考えられている。Dogi が Glued や Rab5 と共に、軸索伸長に必要なシグナルを逆行性輸送によって伝えていること、および Dogi が神経回路形成終了後の神経にも発現していることから、Dogi が軸索変性に積極的に関与する可能性も考えられる。以上より、今後、Dogi 機能の理解を更に深めることは、神経発生のみならず病理学的にも新たな洞察を与える可能性を秘めている。