

〔別紙2〕

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 佐久間 知佐子

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機能的な神経回路を構築し、記憶や学習、全身の統合を司る。近年、神経の形態形成におけるエンドソームの重要性が注目されている。神経突起は周囲の環境を適切に認識し、突起内で時空間特異的に適切な分子を運ぶ必要があり、この過程に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ことが示されている。しかし、エンドソームの成熟・輸送に関して、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。そこで本研究は、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点で重要である。

申請者の所属研究室の先行研究によって、神経形態に影響を与える変異体として単離されたものの一つに *dogi* 変異体がある。この変異体の表現型解析を行うために、軸索並びに樹状突起形態の定性・定量的な解析が容易であるショウジョウバエ嗅覚系投射神経(PN)を用いた。PNにおいて脳内単一モザイク解析法(MARCM法)を用いることで単一PNを可視化及び遺伝子操作し、*dogi* 変異ホモ接合体投射神経(*dogi* PN)の表現型解析を行ったところ、軸索は野生型に比べて顕著に短くなり、樹状突起の枝分かれが増加していた。

これら表現型の原因遺伝子を遺伝学的マッピングにより同定したところ新規の遺伝子であったため、*dogi* 遺伝子と名付けた。*dogi* 遺伝子のコードする *Dogi* 蛋白質は酵母からヒトまで高度に保存されているが、既知の機能ドメインを持たない。そこで *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逆行性輸送を調節する *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ライセートを用いた免疫共沈降実験より内在性 *Dogi* と *Gl* の結合を確認した。また、*dogi*, *Gl* の二重変異 PN において、それぞれ単独変異 PN より軸索伸長と樹状突起の枝分かれ異常が相乗的に増悪することを観察した。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判明し、*Dogi* も *Gl* と同様、微小管輸送に関与する可能性が示唆された。

脊椎動物の培養細胞の系において、軸索におけるエンドサイトーシスおよびエンドソームの逆行性輸送が軸索の伸長・生存に必要であることが既に示されていたため、*Dogi* がエンドソームの輸送に影響を与えることで軸索伸長を制御すると仮定した。まず、*dogi* PN において初期エンドソームマーカーの GFP-FYVE を発現し観察したところ、野生型 PN では GFP-FYVE が軸索突起先端に多く局在するのに対し、*dogi* PN では軸索束に多く局在する様子が観察された。以上より、*Dogi* が初期エンドソームの輸送に関与することが予想された。

更に 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 細胞を用いて初期エンドソームの局在を調べた。コントロール細胞では初期エンドソームマーカーの一つである Avalanche (Avl) が核周辺に集積しているのに対し、Dogi ノックダウン細胞では Avl の集積が観察されず、Avl の免疫組織化学染色も減少していた。この結果より、Dogi はエンドサイトーシスに影響を与える可能性が考えられた。この可能性を検証するため、細胞膜に挿入された際にのみ蛍光を発する FM1-43 色素の取り込み実験を行ったところ、コントロール、Dogi ノックダウン細胞のいずれにおいても FM1-43 色素の細胞内への取り込みが観察された。以上より、Dogi ノックダウン細胞においてエンドサイトーシスは起きるが、初期エンドソームが核周辺へと集積し融合する過程「初期エンドソームの成熟」に異常が生じたと考えられる。同様の初期エンドソーム成熟の異常は、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も観察された。

初期エンドソームの成熟に関与する分子として低分子量 G 蛋白質の Rab5 が広く知られている。そこで、MARCM 法を用いて Rab5 PN を作成したところ dogi PN と同様の軸索伸長と樹状突起の枝分かれ異常が観察された。更に dogi PN に恒常活性化型 Rab5 を強制発現したところ dogi PN の軸索伸長異常が顕著に抑制された。一方、dogi PN に機能欠損型 Rab5 を強制発現したところ dogi PN の軸索伸長異常が顕著に増悪した。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より、内在性 Dogi と Rab5 が複合体を形成することも明らかにした。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で、PN の軸索伸長を制御していることを示した。

本研究ではショウジョウバエ嗅覚系 PN において、新規分子 Dogi が初期エンドソームの成熟に関与す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。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担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の調節も行う。そのため、初期エンドソームの形成・成熟は細胞にとって重要な過程と考えられているが、その生体内での働きは殆ど解明されていなかった。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。

また Dogi の結合相手である Gl 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り、代表的な変異は p150^{Glued} の微小管結合ドメインに生じている。微小管逆行性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る。Dogi が Gl や Rab5 と共に、軸索伸長に必要なシグナルを逆行性輸送で伝達していること、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。よって、本研究で同定された新規蛋白質 Dogi の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。

以上より、本研究は博士(薬学)の学位に値すると判定した。