

氏 名	ふじ しま かず と 藤 島 和 人
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 3179 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	中 枢 神 經 系 ニ ュ ー ロ ン に お け る Septin3 の 動 態 と 機 能 解 析

論文調査委員 (主査) 教授 平野 丈夫 教授 阿形 清和 助教授 土井 知子

論 文 内 容 の 要 旨

ニューロンが細胞極性を獲得し、軸索と樹状突起を形成してシナプス接合することは、中枢神経系回路が正常に機能するために必須である。神経細胞の形態形成を制御する新規分子を同定する目的で、分化中の小脳顆粒細胞に時期特異的に発現する分子のスクリーニングを行った結果、グアニンヌクレオチド結合タンパク質 Septin ファミリーの一つ Sept3 を同定した。Septin は出芽酵母から哺乳類にいたるまで広く保存され、繊維構造を形成して細胞質分裂やエキソサイトーシスなどに関与することが示されている。Sept3 は分裂中の神経芽細胞には発現せず、分裂後のニューロンに特異的に発現することから、細胞極性形成に関与する可能性が示唆されたので、その分子的性質と生理機能を解析した。

Sept3 を HEK293 細胞に強制発現すると、アクチン骨格および微小管骨格には依存しない繊維構造を形成することが明らかになった。Sept3 の重合には GTP 結合型から GDP 結合型への変換が必要であり、さらに高次の繊維構造を形成するためにはイノシトールリン脂質と結合することが必要であることが明らかになった。Sept3 は小脳顆粒細胞のほか、大脳皮質や海馬の錐体細胞を含む多くの分裂後ニューロンに発現する。培養海馬ニューロンでは Sept3 は伸長を開始した神経突起の先端に蓄積し、分化が進むと軸索に強い発現を示す。これまでの報告では、Sept3 は成熟ニューロンでは軸索神経終末のシナプス部位に局在するとされてきた。しかし、詳細な観察結果から、Sept3 の局在はシナプス小胞マーカーの synaptophysin と重ならず、シナプス前終末の肥大部の両脇に発現することが明らかになった。また Sept3 は他の Septin ファミリー分子の Sept5 および Sept7 と保存性の高い中心領域で直接結合し、神経終末で共局在していることが明らかになった。このことから Sept3/5/7 複合体として神経終末側部で機能していることが予想された。

Sept3 の生理的な役割を調べるために、Sept3 遺伝子を欠損したマウスを作製した。Sept3 欠損マウスは正常に発達し、脳の組織構造に明らかな異常は認められなかった。小脳の顆粒細胞の細胞移動も正常であった。また Sept3 欠損マウス由来の培養海馬ニューロンも軸索と樹状突起を形成して正常な形態分化を行った。Sept3 非存在下で Sept5 と Sept7 はシナプス両側で正常に集積し、シナプスで発現する synaptophysin の局在にも影響は見られなかった。以上の結果から、Sept3 は神経発達において必須ではないことが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

複雑で精緻な哺乳類の中枢神経系回路網がいかに形成されるかを理解することは、神経科学における最重要課題の一つである。中枢神経系回路の素子であるニューロンは、情報の入出力を担う軸索と樹状突起を分化して極性化する。申請者は、小脳ニューロンの細胞極性形成をつかさどる分子を探索して、分化中の小脳顆粒神経細胞で時期特異的に発現する分子としてグアニンヌクレオチド結合タンパク質 Sept3 を同定した。そして Sept3 が自身や他の Sept ファミリー分子 Sept5 や Sept7 と重合して繊維構造を形成すること、Sept3/5/7 複合体がニューロンの情報出力部位である軸索終末のシナプス周縁部に局在することを示した。さらに、Sept3 欠損動物の表現型を詳細に解析し、神経発生における機能を探索した。申請者

は培養細胞を用いた強制発現実験で、Sept3 が細胞質で重合し、Septin ファミリー分子に特徴的な繊維構造を形成することを見出した。Septin 分子は大きく3つの領域に分けられ、GTP 結合部位を含む保存性の高い中心領域を挿み、イノシトールリン脂質結合部位を含む N 末端領域とタンパク質間相互作用に関与する coiled-coil 領域を含む C 末端領域からなる。Sept3 が多量体を形成するには中心領域の GTP 結合領域が重要であり、さらに高次の繊維構造に成長するためには N 末端領域の P-loop を介したリン脂質への結合が必要であることが明らかになった。また Septin 分子間の結合には、これまで C 末端領域の coiled-coil 部位が重要であると報告されていたが、coiled-coil 部位を持たない Sept3 は中心領域を介して Sept5 および Sept7 と結合することを明らかにした。申請者は中枢神経系における Sept3 の発現を詳細に解析し、発生中の中枢神経系で分裂後のニューロンに広く発現すること、分化中のニューロンでは伸長する突起の終末に集積し、分化後のニューロンでは軸索終末のシナプス周縁部に集積することを見出した。シナプス周縁部では Sept5 および Sept7 と複合体を形成していることも明らかになった。Sept3 の生理機能を明らかにするため、Sept3 欠損マウスを作成し、その表現型の解析を行った。分子動態と発現から、中枢神経系ニューロンの細胞極性形成、細胞移動と脳皮質形成、シナプス形成に焦点を当て野生型と比較解析したが、明らかな違いは認められず、発生は正常に進行していた。また Sept3 欠損下で Sept5 と Sept7 が正常に局在することから、Sept3 の機能は発生には必須でなく、他の Sept 分子により補完されると示唆された。

酵母の Septin 分子群の機能は詳細に明らかにされているが、ほ乳動物の Sept ファミリー分子には未知な点が多い。本論文では Sept3 の分子動態の詳細を明らかにし、関連分野の発展に寄与する重要な知見を提供した。欠損動物の表現型の解析では明らかな異常を認めなかったが、Sept ファミリー分子の機能解析の重要なツールとなることは間違いない。本研究で得られた知見は哺乳類中枢神経系の形成機構解明に寄与する成果であると評価できる。したがって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められる。また、論文内容とそれに関連した試問を行い、合格と認めた。