

(論文内容の要旨)

多細胞生物を構成する個々の細胞が組織を正しく形成し維持するためには、細胞どうしが接着することにより互いの間で情報を交換し協調し合う必要がある。その一端を担う分子の1つに細胞接着分子カドヘリンがある。カドヘリンはスーパーファミリーを形成しており、多様な組織形成や維持に関与している。近年カドヘリン研究は著しく進んだが、スーパーファミリーに属する多くの分子、さらにそれらと相互作用する分子については未解明な部分が多い。

OLプロトカドヘリンはカドヘリンスーパーファミリーの中でも特にユニークな細胞内構造を持つカドヘリンである。これまでの研究から、この分子が神経回路形成期では軸索に分布すること、この分子のノックアウトマウスでは大脳腹側部付近の神経線維が走行異常を示し、特に線条体の軸索伸長にOLプロトカドヘリンが重要な役割を果たしていることなどが示されてきた。しかし、その分子的機構は未解明のままであった。

申請者は、OLプロトカドヘリンがどのような分子メカニズムで機能し、軸索伸長を制御しているのかという問いに答えるため、OLプロトカドヘリンの細胞内に結合する分子を探索した。その結果、Nap1 (Nck-associated protein 1) を同定した。Nap1はWAVE等と複合体を形成して、アクチン骨格系を制御し、葉状仮足の形成や細胞運動に関与することが既に知られている。また、マウス大脳皮質におけるNap1の発現抑制実験や、ショウジョウバエでのNap1ホモログ変異体の解析から、この分子が軸索伸長や経路探索に重要であるとも示唆されていた。そこで、申請者は、U251細胞株(ヒトアストロサイトーマ)をモデル細胞として用いて、これにOLプロトカドヘリンを発現させた時の効果を調べた。その結果、Nap1が細胞接着面でOLプロトカドヘリンと共局在する様子が観察された。これらの知見から、OLプロトカドヘリンの機能にNap1が関与している可能性が示唆された。Nap1は細胞運動を制御することから、次に、OLプロトカドヘリンとNap1との結合がU251細胞の運動性に及ぼすかどうかについて、タイムラプス観察により調べた。その結果、OLプロトカドヘリンが細胞同士の接着依存的に細胞運動を促進する活性を有すること、この活性にはNap1が必要であることが明らかになった。さらにこの時、細胞接着面においてアクチンやNカドヘリンなど細胞骨格系と細胞接着構造が変化していることも明らかになった。

以上の結果から申請者は、細胞接着面におけるOLプロトカドヘリンのホモフィリックな相互作用が、Nap1-WAVE複合体を細胞接着面にもたらし、その下流のシグナル伝達経路を動かして、細胞運動を制御すると結論している。さらに、この研究から得られた分子モデルに従い、OLプロトカドヘリン・ノックアウトマウスで見られた神経回路形成異常の説明を試みている。すなわち、ノックアウトマウスの線条体の軸索が正常に伸び出すことができないのは、OLプロトカドヘリンに依存した運動促進活性を失った結果であると推論している。

(論文審査の結果の要旨)

カドヘリンは多細胞生物の組織形成と維持のために必要な分子群と考えられているが、構造的類似性があるカドヘリンスーパーファミリーのメンバーについては依然として機能未知なものが多い。申請者はその中で OL プロトカドヘリンに着目し、その機能解析を行った。

申請者及び申請者が所属する研究グループによる解析から、OL プロトカドヘリンが神経軸索やその成長円錐に分布すること、OL プロトカドヘリンのノックアウトマウスでは、線条体軸索の走行異常があること、などが明らかにされていた。申請者は、OL プロトカドヘリンによる神経軸索伸長を制御するメカニズムを解明したいと考え、まず、OL プロトカドヘリンの細胞内領域と結合する分子を GST プルダウン法によって単離することを試みた。その結果、Nap1 及び CYFIP が結合因子として同定された。これらの分子は、WAVE 等と複合体を形成しアクチン重合を促進させ、葉状仮足形成を制御することが知られていた。そこで申請者は、OL プロトカドヘリンと Nap1 との結合の生物学的意義を解明するため、高い運動性を有する U251 細胞をモデルとして用い、研究を進めた。U251 細胞は OL プロトカドヘリンを発現しないが、これに OL プロトカドヘリンを過剰発現させると、この分子が細胞境界面へ濃縮される結果、Nap1 が同領域にリクルートされるという興味深い事実をまず発見した。

Nap1 は元来葉状仮足にしか分布しないので、この分子の細胞境界面への分布は細胞の運動や接着に何らかの影響を及ぼすはずであると考え、申請者は OL プロトカドヘリンを発現させた U251 細胞の運動の様子をタイムラプス観察した。細胞が単離された状態では細胞の行動に変化はみられなかったが、細胞同士が互い接触している時や、wound healing の過程における運動の様子を観察すると、OL プロトカドヘリンの発現によって細胞の運動が促進されることが分かった。さらにこの時、細胞境界面の N カドヘリンやアクチン骨格の分布が異常になっていた。OL プロトカドヘリン発現細胞において Nap1 をノックダウンすると、運動性や N カドヘリン、アクチン骨格が正常に戻ったことから、OL プロトカドヘリンの活性は Nap1 との結合に依存することも確認された。

以上の観察から申請者は、OL プロトカドヘリンが Nap1 を細胞接着面にリクルートすることにより、その領域の細胞骨格系を変化させ、さらには細胞の運動性をも変化させるのであると推論している。このモデルは、OL プロトカドヘリン・ノックアウトマウスにおける線条体軸索の這い出し抑制現象をよく説明しており、カドヘリンスーパーファミリーに属する分子の新しい機能を明らかにしたばかりでなく、軸索走行のための新しい制御系の存在を示唆するものであり、細胞生物学上及び神経生物学上、重要な寄与をしたと判定できる。

よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認められる。なお、平成 20 年 7 月 22 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。