

氏名	やまもとみさと 山本美暁
学位(専攻分野)	博士(生命科学)
学位記番号	生博第102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	生命科学研究科統合生命科学専攻
学位論文題目	神経細胞と周辺非神経細胞との相互依存的な形態形成制御

論文調査委員 (主査) 教授 上村 匡 教授 竹市雅俊 教授 渡邊 大

### 論文内容の要旨

神経細胞は高度に極性化された細胞であり、樹状突起や軸索などのいくつかの細胞内区画に明確に分割されている。神経回路が適切に機能するためには、軸索が適切な相手に投射されることに加えて、各タイプの神経細胞特異的な樹状突起形態が形成されることが必要である。申請者は、神経細胞と非神経細胞が近接して存在する複雑な環境である生体内においては、樹状突起形態形成の制御のために神経細胞と周辺組織との相互作用が重要と考え、ショウジョウバエ末梢神経系の dendritic arborization neuron (da neuron) において細胞間認識に関わるタンパク質を見いだすことを目的に、da neuron に発現する膜タンパク質を探索した。得られた候補分子の一つが Neuroglian (Nrg) であった。

*nrg* 変異胚においては、da neuron のひとつである ddaE が、軸索および樹状突起の顕著な形態異常を示した。軸索からは異所的な分岐が生じ、その分岐は樹状突起マーカーポジティブかつ軸索マーカーネガティブであり樹状突起様の性質を持っていた。また、変異 ddaE の樹状突起に軸索マーカーが分布したことから、細胞体と軸索という区画を分けるシステムが損なわれた可能性が示唆された。さらに、細胞タイプごとに Nrg の発現を戻して表現型をレスキューする実験によって、異所的な分岐形成を抑制するためには、Nrg が ddaE およびその軸索を包むグリア細胞で発現することが必要であることを明らかにした。従って、Nrg を介する軸索とグリア細胞との相互作用が、樹状突起と軸索を分離し特徴づけるシステムにおいて重要な働きをすると考えられる。一方、*nrg* 変異体での ddaE の樹状突起は、分岐が少なく、2次の枝の伸長方向が胚の前後軸に沿わず大きく湾曲してしまう。Nrg を ddaE とグリアで発現させると、樹状突起の二次枝の伸長方向は異常なままだが、分岐の数は正常に戻った。このことから、Nrg を介する軸索とグリア細胞との相互作用は、樹状突起の分岐数の調節にも働いていると推察できた。さらに、樹状突起全体の正常な形態形成のためには、Nrg が樹状突起を覆う表皮にも発現することが必要であることも明らかにした。野生型胚では、樹状突起と表皮細胞境界とが沿うように位置する傾向が見られるが、*nrg* 変異胚においてはその配置が乱れていたことを考え合わせて、申請者は表皮細胞直下に展開する樹状突起が、Nrg 依存的に表皮細胞境界と相互作用して、そのパターン形成を調節しているという仮説を提出した。以上の結果から、da neuron とグリア細胞、および da neuron と表皮細胞境界との Nrg 依存的な相互作用が、軸索分岐抑制と樹状突起のパターン形成において重要であることが示された。

さらに、Nrg の細胞質領域に結合し、膜の裏打ち骨格にアンカーすることで Nrg を介した細胞接着を強固にする Ankyrin (Ank) の役割を RNAi 実験により検討した。ddaE において Ank の発現をノックダウンすると、*nrg* 変異体と同様に軸索から異所的な分岐が生じた。また、ddaE において Nrg あるいは Ank をノックダウンすると、グリア細胞の構造にも変化が生じた。さらに、今度はグリア細胞において Nrg あるいは Ank をノックダウンすると、グリア細胞自身の形態および構造に変化が生じ、かつ隣り合う野生型 ddaE における一部のタンパク質の分布が異常になった。以上のことから、グリア細胞と ddaE 間の Nrg-Ank 複合体依存的な相互作用が、お互いの形態形成に重要な役割を果たすことが示された。

Nrg が属する L1 ファミリー分子は、神経発生の様々な局面に関わっていることが示されてきたが、その機能が損なわれ

たときの神経細胞の形態について単一細胞レベルでの解析は報告されていなかった。本研究は、細胞タイプ選択的な高解像度の機能解析によって、Nrg 依存的な神経細胞と周囲の非神経細胞との相互作用が、それぞれの形態形成に寄与すること、グリア細胞との相互作用においては Ank が Nrg とともに寄与することを、初めて明らかにした。

### 論文審査の結果の要旨

神経細胞が各タイプ特異的な樹状突起形態を形成するために、神経細胞と周辺組織との相互作用が果たす役割はこれまで不明であった。申請者は、ショウジョウバエ末梢神経系の dendritic arborization neuron (da neuron) において、Neuroglian (Nrg) がその樹状突起の形態形成に関与する可能性を検討した。

まず申請者は、*nrg* 変異胚においては、da neuron のひとつである *ddaE* が、軸索から野生型にはない分岐を生じること、および、樹状突起の顕著な形態異常を示すことを見出し、数値化を行った。さらに、軸索分子マーカーが樹状突起にも分布すること、樹状突起分子マーカーが、軸索から生じた分岐に局在することなどから、*nrg* 変異胚の *ddaE* においては、軸索と樹状突起との区画を分離するシステムが損なわれていることを初めて示した。

また申請者は、細胞タイプごと *nrg* をノックダウンする実験および、*nrg* 変異体において細胞タイプごとに Nrg の発現を戻してレスキューする実験によって、以下のように、Nrg の発現が必要な現象と細胞とを明らかにした。

1) 軸索からの異所的な分岐形成を調節するためには、Nrg が *ddaE* およびその軸索を包むグリア細胞で発現することが必要である。また、2) 樹状突起と軸索という区画を分離するためにも、Nrg が *ddaE* およびその軸索を包むグリア細胞で発現することが必要である。そして、3) 樹状突起の2次の枝の数の調節にも、Nrg が *ddaE* とグリア細胞で発現することが必要であり、これは2)の区画の分離が成されることによって調節されている可能性が示唆された。さらに、4) 樹状突起全体の正常な形態形成のためには、Nrg が *ddaE* とともに、樹状突起を覆う表皮にも発現することが必要であることも明らかにした。

さらに申請者は、上記の4)に関連して、野生型個体においては樹状突起と表皮細胞境界近接した位置関係を示すことを見出し、その位置関係が *nrg* 変異胚において乱れていたことから、表皮細胞直下に展開する樹状突起が、Nrg 依存的に表皮細胞境界と相互作用して、そのパターン形成を調節しているという可能性を初めて報告した。

最後に、申請者はグリア細胞の形態形成における Nrg およびアダプター分子 Ankyrin の関与を、グリア細胞特異的なノックダウン実験によって検討した。そして、グリア細胞において Nrg あるいは Ank をノックダウンすると、グリア細胞の伸長の制御が異常になり構造に変化が生じることを初めて報告した。

以上の結果から、神経細胞・グリア細胞の周辺組織との相互作用依存的な形態形成において、Nrg が重要な役割を果たすことを示した。神経細胞とグリア細胞との相互作用による軸索からの分岐の抑制、樹状突起の2次枝の数の調整、また表皮細胞との相互作用による樹状突起パターン形成、そしてグリア細胞の伸長調整という機能は、L1 ファミリー分子機能としてこれまで報告はなく、今回初めて見出されたものである。

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た。

平成19年1月22日、論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。