

氏 名	た な べ こう じ 田 辺 光 志
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 80 号
学位授与の日付	平 成 18 年 5 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 高 次 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	網膜水平細胞の樹状突起形態形成におけるカドヘリンの機能解析

論文調査委員	(主 査) 教 授 竹 市 雅 俊	教 授 上 村 匡	教 授 根 岸 学
--------	----------------------	-----------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物の網膜では6種の神経細胞が適切な層に配置され、さらに個々の神経細胞は他の細胞種との間で特異的な神経回路を形成する。申請者は網膜の神経細胞がどのような調節を受けて細胞種特異的な形態を取り、緻密な神経回路を形成するのに興味を持ち、細胞の挙動を直接的に制御しうる分子として、カドヘリン細胞接着分子に注目して研究を行ってきた。

まず申請者は、網膜において細胞種特異的に発現するカドヘリンが存在するかを調べるために、発生過程のニワトリ胚網膜において発現するカドヘリン・ファミリー分子を網羅的にスクリーニングした。その過程で、水平細胞に特異的に発現する新規カドヘリン、cHz-カドヘリンを同定した。

cHz-カドヘリンはショウジョウバエのクラシック・カドヘリンであるDN-カドヘリンと相同な構造を取っていた。脊椎動物のクラシック・カドヘリンとショウジョウバエやウニなど、無脊椎動物のクラシック・カドヘリンではその一次構造が大きく異なっており、脊椎動物は脊椎動物型の、無脊椎動物は無脊椎動物型のクラシック・カドヘリンを独立に進化させてきたと考えられてきた。ところがcHz-カドヘリンは無脊椎動物のクラシック・カドヘリンに特異的なドメイン構成を取っており、脊椎動物においても無脊椎動物型のクラシック・カドヘリンが存在することが初めて示された。

次に申請者は水平細胞に注目し、全てのサブタイプのクラシック・カドヘリンの機能を同時に阻害するドミナントネガティブ分子を用いて、樹状突起の形態形成におけるカドヘリンの機能を調べようと考えた。樹状突起の形態形成を詳細に研究するためには、単一細胞レベルでの解析を行うために、少数の細胞でのみ外来遺伝子を発現させるような遺伝子導入法が必要である。また、樹状突起形態形成のような発生後期の現象を研究するためには、遺伝子発現を長期間持続させる必要がある。そのような方法として、申請者はTol2と呼ばれるトランスポゾンに応用したエレクトロポレーション法を用いた。この方法を用いることで、外来遺伝子が高効率でゲノムに組み込まれ、持続的な遺伝子発現が得られると同時に、少数の細胞でのみ外来遺伝子の発現が得られるため、単一細胞レベルでの解析が可能である。まず、この遺伝子導入法によって細胞膜結合型GFPを発現させて水平細胞を可視化し、その形態を詳細に観察した。その結果、ニワトリの水平細胞は樹状突起の形態や軸策の有無から3つのサブタイプに分類することができた。また、一部の視細胞を特異的にラベルするマーカーを用いることで、水平細胞はサブタイプごとに異なったパターンで視細胞に投射することを明らかにした。

次に、水平細胞の樹状突起形態形成におけるカドヘリンの機能を調べるために、ドミナントネガティブ分子の強制発現による機能阻害実験を行った。発生初期にドミナントネガティブ・カドヘリンを発現させると網膜の層構造が大きく乱されるため、Tet-ONシステムを上記の遺伝子導入法に応用し、層形成が終わった後、時期特異的にドミナントネガティブ・カドヘリンの発現を誘導した。その結果、カドヘリンの機能阻害によって樹状突起の伸長が大きく阻害された。この結果から、カドヘリンの正常な機能が樹状突起の適切な伸長において必須であることが示された。また、ドミナントネガティブ・カドヘリンの強制発現によって水平細胞の、サブタイプ特異的な樹状突起末端の形態やシナプスマーカーの濃縮が乱された。この結果から、カドヘリンは樹状突起の単純な伸長だけではなく、樹状突起の適切なパターン形成、さらには*in vivo*におい

てシナプス形成を制御していることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

神経細胞は複雑かつ細胞種特異的な形態の樹状突起を持ち、樹状突起の適切な形態形成は個々の神経細胞が正しい機能を持つ上で非常に重要である。これまでに樹状突起の形態形成を制御する分子として、転写因子やシグナル伝達分子などが同定されている。しかし、樹状突起の形態形成における細胞接着分子の機能については十分な知見が得られていない。申請者は神経系の中でも解析の行い易い、網膜を実験系として用いて、樹状突起の形態形成におけるカドヘリン細胞接着分子の機能について研究を行った。

申請者はまず、発生課程のニワトリ胚網膜において発現するカドヘリン・ファミリー分子を網羅的にスクリーニングし、その過程で、水平細胞に特異的に発現する新規カドヘリン、cHz-カドヘリンを同定した。cHz-カドヘリンはショウジョウバエのカドヘリンである DN-カドヘリンと相同な構造を取っており、これまで脊椎動物では見出されていなかった、無脊索動物型のカドヘリンの特徴を持っていた。cHz-カドヘリンの同定によって、脊椎動物においても無脊索動物型のカドヘリンが存在することが初めて示された。この結果はカドヘリン分子の進化について重要な知見を与えたものと言える。

申請者は次に、水平細胞に注目し、ドミナントネガティブ分子の強制発現によるカドヘリンの機能阻害を行い、水平細胞の樹状突起形態形成におけるカドヘリンの機能を調べた。ニワトリ胚はエレクトロポレーション法により外部からの遺伝子導入が簡便に行えるという利点を持つが、通常の発現ベクターを用いた場合、一過的な遺伝子発現しか得られず、発生後期の現象である樹状突起形態形成を解析することはできない。長期間持続する外来遺伝子の発現を得るために、申請者は Tol2 と呼ばれるトランスポゾンに応用したエレクトロポレーション法を用いた。また、この遺伝子導入法を用いると少数の細胞でのみ外来遺伝子の発現が得られるため、単一細胞レベルでの解析が可能であった。まず、GFP の発現によって可視化された水平細胞の形態を、単一細胞の解像度で観察した。その結果、ニワトリの水平細胞は形態的に区別される3つのサブタイプに分類され、さらに、水平細胞はサブタイプごとに異なった様式で樹状突起を視細胞に投射することを明らかにした。次にドミナントネガティブ・カドヘリンの強制発現を行ったが、発生初期におけるカドヘリンの機能阻害は網膜の層構造を著しく乱すことが知られている。このことから、Tet-ON システムを上記の遺伝子導入法に応用し、層形成が終わった後、時期特異的にドミナントネガティブ・カドヘリンの発現を誘導し、樹状突起形態形成におけるカドヘリンの機能を特異的に調べた。その結果、ドミナントネガティブ・カドヘリンの強制発現によって水平細胞の樹状突起の伸長が大きく阻害され、カドヘリンの正常な機能が樹状突起の適切な伸長において必須であることが示された。また、ドミナントネガティブ・カドヘリンの強制発現によって、水平細胞のサブタイプ特異的な樹状突起末端の形態やシナプスマーカーの濃縮が乱された。この結果から、カドヘリンは樹状突起の単純な伸長だけではなく、樹状突起の適切なパターン形成、さらには *in vivo* においてシナプス形成を制御していることが明らかになった。

上記の様に、申請者は独自の方法を用いて水平細胞の樹状突起形態形成について興味深い観察を行い、また、樹状突起形態形成やシナプス形成におけるカドヘリンの機能について重要な知見を得た。以上の理由から本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値有るものと認めた。なお平成18年3月28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られた。