

|             |                          |
|-------------|--------------------------|
| 氏 名         | うめ しま ひろ き<br>梅 嶋 宏 樹    |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (理 学)                |
| 学 位 記 番 号   | 理 博 第 3306 号             |
| 学位授与の日付     | 平 成 20 年 3 月 24 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 | 小脳顆粒細胞の移動を制御する細胞内分子機構の解析 |

論文調査委員 (主 査) 教 授 平 野 丈 夫 教 授 阿 形 清 和 教 授 七 田 芳 則

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文では小脳顆粒細胞をモデルとして、中枢神経系の発生過程に必須の現象である神経細胞の移動を制御する細胞内分子機構の解析を行なった。

第一章では、神経細胞における細胞核移動の作動原理の解明を目指し、微小管とその重合開始点である中心体の役割を検討した。これまでの研究で、神経細胞では中心体が細胞核に先立って前方へ移動し、その後、細胞核が中心体に収束した微小管を介して前方に引き寄せられると考えられていた。しかし、本論文においてタイムラプス顕微鏡による中心体の経時的観察を行なった結果、中心体と細胞核は独立に前方へ移動しており、核が中心体を追い抜いて前方へ移動する様子が頻繁に観察された。この結果から、従来の仮説とは異なり、中心体と細胞核の移動は各々独立に制御されると考えられた。また、微小管骨格の詳細な観察から、核周辺には、動的な微小管によって構成される核全体を覆う構造と、安定な微小管によって構成される核の前部のみに接触する構造が存在することが明らかになった。これらの微小管構造はこれまでのモデルとは異なり、中心体には収束せずに先端突起から伸長していた。中心体は、核周辺の微小管とは独立に先端突起の微小管束と結合していた。薬剤処理による動的な微小管の破壊は核移動に影響を与えないのに対して、安定な微小管の破壊または過形成は核移動を著しく障害した。このことから、細胞核は中心体には収束しない安定な微小管を介して前方へと運ばれることが示唆された。さらに、微小管モータータンパク質であるダイニンとその制御分子のLIS1の阻害によって核移動が抑制された。LIS1を阻害すると核と中心体が解離し、中心体のみが前方へと移動した。この際、中心体と先端突起の結合は保たれていた。以上の結果から、LIS1およびダイニンが中心体移動とは独立に細胞核移動を制御することが示唆された。

第二章では、接線移動と法線移動と呼ばれる顆粒細胞の異なる二つの移動様式に対するCDK5の役割について解析を行なった。CDK5の機能阻害分子を顆粒細胞に強制発現したところ、顆粒細胞の内顆粒層への配置が障害された。そこで、タイムラプス顕微鏡を用いて、CDK5の阻害が接線移動と法線移動の動態に及ぼす影響を解析した。その結果、CDK5の阻害は接線移動に大きな影響を及ぼさないのに対して、法線移動では形態の変化を伴う著しい移動の障害を引き起こすことが明らかになった。この結果から、CDK5は顆粒細胞の接線移動と法線移動に対して差次的に機能すると考えられた。法線移動におけるCDK5の機能はグリア線維への接触には無関係であり、また、LIS1の機能とも独立であることを示唆する結果を得た。LIS1の阻害では核移動が停止する一方で中心体は前方に移動し、中心体と核の距離が広がるのに対して、CDK5の阻害では核移動が停止するにも関わらず、中心体と核の距離に変化が認められなかった。この結果から、CDK5が核と中心体の移動を同時に制御する分子である可能性が考えられた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

脊椎動物の神経系を構成する膨大な神経細胞が正しく配置し、適切な回路を形成する上で、発生中の神経細胞移動は中心的過程である。重篤な脳奇形を併発する致死遺伝病の原因遺伝子として神経細胞の核移動を司る分子が複数同定されており、

神経細胞移動の分子機構解明は臨床医学的にも重要な課題である。

申請者はマウス小脳顆粒細胞をモデルとして移動を司る細胞・分子機構の解析に取り組んだ。皮質内での細胞相互作用を保持した条件で移動ダイナミクスを解析するために、生体電気穿孔法を用いて移動細胞を蛍光分子標識し、組織構築を保持した切片培養中で、細胞や標識したオルガネラの挙動を長期間タイムラプス観察する系を開発した。核と中心体各々を標識分子のGFPキメラ分子を強制発現させて可視化し、核移動のダイナミクスを解析した。その結果、核と中心体は微小管骨格を介して強く連結しており、核は常に移動前方に位置する中心体に牽引されるという従来のモデルに反し、核と中心体の移動ダイナミクスに相関はなく、核がしばしば中心体を抜き去ることを見出した。さらに核前半部に隣接する安定型微小管骨格が存在し、これらが中心体を介さず直接先端突起と核を連結していること、安定型微小管骨格を崩壊または過形成させると、核移動が停止する事を見出した。また、核移動を制御すると考えられる微小管モーター分子ダイニンとその制御因子Lis1の機能解析を行い、ダイニン／Lis1複合体は核移動を特異的に制御し、中心体移動には関与しない事を示唆する結果を得た。これらの結果から、移動神経細胞の核と中心体は、それぞれ独立の微小管を介して先端突起と連結し、異なるモーター分子の働きで独立に移動することが明らかになった。

申請者はさらに、顆粒細胞が生体内で層特異的に移動形態とダイナミクスを変えることに注目し、その分子基盤の解明に取り組んだ。申請者はCdk5シグナルが細胞自立的な移動制御シグナルであることを証明し、さらに外顆粒層における接線移動と分子層における法線移動で差次的に機能することを明らかにした。

本論文は、これまで支配的だった核移動の分子機構モデルを明瞭に否定し、新たな制御機構を提示したもので、関連分野へ強いインパクトを与えた。またLis1やCdk5等の制御分子が移動ダイナミクスやオルガネラにより異なる機能を持つ事を示し、関連分野の発展に寄与する重要な知見を提供した。本研究の成果は中枢神経系発生機構の解明に寄与するものであり、本論文は博士（理学）の学位論文として価値が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。