

|           |                                           |
|-----------|-------------------------------------------|
| 氏 名       | 木 村 宏 史                                   |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (理 学)                                 |
| 学 位 記 番 号 | 理 博 第 3062 号                              |
| 学位授与の日付   | 平成 18 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    | 樹状突起の形態形成における 7 回膜貫通型カドヘリン Flamingo の機能解析 |

|        |                      |             |             |
|--------|----------------------|-------------|-------------|
| 論文調査委員 | (主 査)<br>教 授 大 野 睦 人 | 教 授 七 田 芳 則 | 教 授 阿 形 清 和 |
|--------|----------------------|-------------|-------------|

### 論 文 内 容 の 要 旨

機能的な神経回路網の形成は、個々の神経細胞が軸索と樹状突起とを適切に伸長させ、適切なパートナーに投射することによって達成される。近年の精力的な解析から軸索ガイダンス機構に関しては徐々にその分子機構が明らかにされてきているが、樹状突起の形態形成の分子機構はあまり解明されていなかった。種を越えて保存されている 7 回膜貫通型カドヘリン Flamingo (Fmi) は、ショウジョウバエの神経回路形成において、軸索ガイダンスに加え樹状突起の形態形成にも重要な役割を果たすことが示されていた。具体的には、fmi 変異体では樹状突起が一方向に過剰に伸長したり、同種ニューロンの突起間での反発作用が損なわれていると解釈できる表現型を示す。樹状突起の形態形成における Fmi の機能解析によって、神経回路形成の分子基盤の新しい側面を明らかにできると期待された。

しかしながら、Fmi の機能は分子レベルではほとんど明らかにされていなかった。7 回膜貫通領域のアミノ酸配列から、3 量体 G タンパク質と共役していることが推測されているが、それを支持するデータは得られていなかった。また Fmi の細胞外領域には、ホモフィリックな結合能を持つカドヘリンリピートに加えて、タンパク質-タンパク質間相互作用を示唆する他のモチーフも存在するが、それぞれの役割も不明なままであった。そこで、樹状突起の形態形成における Fmi の 1 次構造と機能との関係を明らかにするために、様々な Fmi の改変分子を作製し、それぞれの活性を主に個体レベルで検証した。

まず、これらの改変分子を用いて胚期の過剰伸長の表現型のレスキュー実験を行い、Fmi 全長分子のレスキュー実験から、Fmi が神経細胞自律的に機能していることが示された。また、カドヘリンリピートを含む大部分の細胞外領域を欠失させた分子  $\Delta N::EYFP$  でも部分的に過剰伸長をレスキューした。このことから、Fmi の細胞質領域と膜貫通領域、そして細胞外領域の一部が必要であることが示された。そして、この解析から Fmi が未同定のリガンドと結合するレセプターとして働くことが示唆された。

幼虫期には、ある神経細胞は、同種神経細胞の突起同士が重なり合わないよう受容野を形成することが知られていた。この現象はタイリングと呼ばれている。このタイリングにおいて、Fmi が機能することが示唆されていた。そこで、このタイリングにおけるレスキュー実験と野生型における強制発現実験を行った。その結果、この同種ニューロンの突起同士の反発において Fmi のホモフィリックな接着活性が重要であることを示唆する結果が得られた。

これらの結果から、Fmi が 2 種類の異なったメカニズムで樹状突起の形態形成を制御しているというモデルが示唆された。このモデル上の Fmi ファミリーのリガンドの同定を目指し、Fmi の哺乳類ホモログの 1 つ、Celsr2 の細胞外領域に直接結合する分子を 3 つ分離した。それらは CRF, FAM3C, Mgat2 と呼ばれるタンパク質であった。現在、これらの結合分子が、樹状突起の形態形成において、Fmi のリガンドとして機能するかどうかを検討している。

## 論文審査の結果の要旨

神経細胞の軸索の伸長制御に関する研究の進展に比べ、樹状突起の形態形成のメカニズムはいまだ不明な点が多い。ショウジョウバエの7回膜貫通型カドヘリン Flamingo (Fmi) は、発生過程において多様な役割を担っていることが示されてきた。Fmi 変異体の解析により、樹状突起の形態形成機構に Fmi が関与することは示されていたが、そこでの Fmi の分子機能は明らかにされていなかった。申請者は、Fmi の分子機能についての解析を行い、Fmi が時期特異的に2種類のメカニズムで樹状突起の形態形成を制御している可能性を示した。

Fmi の分子機能を解析するため、申請者は様々な改変分子を作製し、これらを用いて、胚期と幼虫期において、レスキュー実験や強制発現実験を行った。

胚期の過剰伸長の表現型の Fmi 全長分子のレスキュー実験から、Fmi が神経細胞自律的に機能していることを示した。カドヘリンリピートを含む大部分の細胞外領域を欠失させた分子  $\Delta N::EYFP$  でも部分的にこの表現型をレスキューした。このことから、Fmi の細胞質領域と膜貫通領域、そして細胞外領域の一部が必要であることを示した。この解析から、胚期の樹状突起の伸長制御においては、Fmi が未同定のリガンドと結合するレセプターとして働くことが示唆された。

幼虫期には、ある神経細胞は、同種神経細胞の突起同士が重なり合わないよう受容野を形成することが知られていた。この現象はタイリングと呼ばれている。申請者は、このタイリングにおけるレスキュー実験と野生型における強制発現実験を行い、この同種ニューロンの突起同士の反発において Fmi のホモフィリックな接着活性が重要であることを示した。これらの申請者の研究により、Fmi ファミリーが時期特異的に2通りのメカニズムで樹状突起の形態形成を制御している可能性が示された。

胚期と幼虫期の解析から  $\Delta N::EYFP$  が興味深い活性を有する分子であることを見出し、 $\Delta N::EYFP$  の分子機能を追究した。その結果、 $\Delta N::EYFP$  は Fmi のホモフィリックな接着活性を阻害することを示した。そして、その作用機序として、 $\Delta N::EYFP$  が Fmi に結合し、不活性型の複合体を形成する可能性が示唆された。この結果も、Fmi の分子機能を解明する上で、重要な発見である。

胚期のレスキュー実験の結果から、Fmi にはリガンドが存在する可能性が示唆された。申請者はこのモデルを検証するために、Fmi の哺乳類ホモログの1つである Celsr2 の細胞外に結合する分子をスクリーニングし、3つの結合分子を同定した。現在、申請者はこれらの分子が樹状突起の形態形成において、Celsr2 のリガンドとして機能しているかどうかを検討しているところである。本研究の進展により、これらの分子がリガンドとして機能しているかどうかを明らかにできるとともに、上記のモデルが検証できることが期待される。

よって、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る。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。