

氏 名	しま やす ゆき 島 康 之
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2817 号
学位授与の日付	平 成 16 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	哺乳類 7 回膜貫通型カドヘリンの発現と樹状突起維持・成長における役割の解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 上 村 匡 教 授 平 野 丈 夫 教 授 森 和 俊

論 文 内 容 の 要 旨

樹状突起は、情報の入力を受け取る突起として神経細胞の機能に重要な役割を果たしている。樹状突起は神経ごとに多様な形態を見せるが、突起の伸長がどのように制御されているのかについては、まだあまり知見が得られていない。本論文では、哺乳類 7 回膜貫通型カドヘリン *Celsr* 遺伝子の発現分布の解析と、*Celsr2* の樹状突起形成における役割について報告する。

7 回膜貫通型カドヘリン Flamingo はショウジョウバエの発生において多様な役割を果たしている。上皮においては平面内細胞極性を調節する一方、神経系においては軸索ガイダンスと、樹状突起の伸長の制御を行っている。哺乳類でも 7 回膜貫通型カドヘリンのホモログが発生過程において重要な役割を果たしていることを期待し、その解析を行った。

哺乳類の 3 種の *fmi* ホモログ、*Celsr1*, -2, -3 の発現分布を解析した。*Celsr* 遺伝子は神経発生の初期から神経系で広範に発現しており、それぞれのパラログは、細胞の分化状態に対応するかのような特徴的な発現パターンを示した。また、感覚神経、臓器や毛根など、*Celsr* 遺伝子は多くの器官で発現していた。*Celsr2* のタンパク質は樹状突起に分布しており、*Fmi* と同様に樹状突起の伸長制御に関与していると期待できた。

Celsr2 の樹状突起形成における機能を解析するために、プラスミドベクターによる RNA interference 法 (RNAi) を利用した。この方法では、細胞内で転写されたヘアピン型 RNA (small hairpin RNA, shRNA) のヘアピン部分が分解され、結果生ずる small interference RNA (siRNA) が、配列特異的に mRNA の分解を引き起こすことを利用する。培養細胞を利用した探索の結果、*Celsr2* の発現を特異的に抑制する siRNA を同定した。標的と siRNA の間に 1 塩基のミスマッチを導入すると発現抑制活性が失われたことから、*Celsr2* に対する siRNA は高度に配列特異的に作用すると考えられた。

siRNA 発現プラスミドを EGFP 発現プラスミドと共に、遺伝子銃を用いて脳スライスに導入したところ、大脳皮質錐体細胞と小脳プルキンエ細胞の樹状突起が過度に縮退した。siRNA による表現型は、siRNA による分解を受けない *Celsr2* を共導入することにより復帰した。このことは、*Celsr2* の発現抑制が樹状突起の縮退を引き起こしたことを強く指示している。

siRNA による表現型を復帰させる活性を指標としてドメイン機能解析を行い、復帰活性には細胞外領域のカドヘリンドメインと細胞内の保存された領域が必須であることが分かった。カドヘリンドメインを持った分子は細胞間接着活性を示したことから、*Celsr2* が細胞間でホモフィリックに結合して樹状突起を維持していると予想される。また、過剰発現の表現型から、カドヘリン以外の細胞外領域が別個の役割を果たしていることと、スプライスバリエントが樹状突起の伸長制御において反対の効果を持つことを支持する結果を得た。以上の結果から、7 回膜貫通型カドヘリンが樹状突起の維持と伸長制御において、多様な役割を果たしていることが示唆された。

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事が示されてきた。変異体の解析より、樹状突起形成にもFmiが関与する事が示されているが、神経系におけるFmiの活性化の分子メカニズムは不明だった。申請者は、樹状突起の維持と伸長制御にFmiの哺乳類ホモログの一つのCelsr2が関与している事を明らかにした。

哺乳類には3種の*fmi*ホモログが存在し、*Celsr1-3*と名付けられている。申請者は、そのうちの一つのクローニングと、3種の遺伝子のmRNAの発現分布を解析した。*Celsr*遺伝子は、神経系において発生初期から発現しており、それぞれの遺伝子が中枢神経系で特徴的に分布していた。さらにCelsr2に対する抗体を作成し、Celsr2タンパク質の細胞内分布を解析した。Celsr2タンパク質は複数種類の神経細胞で樹状突起と軸索に分布しており、Fmiと同様の役割を哺乳類でCelsr2が果たしている事が示唆された。

申請者は、Celsr2の樹状突起伸長制御における役割を解析するために、RNA interference (RNAi) 法による遺伝子特異的な発現抑制をおこなった。プラスミドベースのRNAi法を利用する事により、申請者は*Celsr2*特異的に制御するsmall interference RNA (siRNA) を同定した。その遺伝子発現抑制効果の特異性を、siRNAと*Celsr2*に変異を導入する事によって示した。遺伝子銃を用いてsiRNA発現プラスミドを脳スライス培養下の神経細胞に導入し、*Celsr2*の発現抑制が樹状突起の単純化を引き起こす事を発見した。siRNAに耐性を持つ*Celsr2*の共導入によりsiRNAによる樹状突起の単純化の表現型を復帰させ、siRNAの効果の特異性を示した。また、改変分子によるsiRNAの表現型復帰実験から、表現型復帰活性にカドヘリンドメインと細胞内領域の一部分が必須である事が分かった。分子の過剰発現の実験から、カドヘリンドメイン以外の領域も樹状突起の伸長制御に重要である事を示した。

申請者の研究により、7回膜貫通型カドヘリンファミリー活性化の分子の基盤が初めて示された。発現抑制と過剰発現の実験からCelsr2が異なったリガンドによって活性化される可能性を見だし、Celsr2が樹状突起伸長制御において多様な役割を果たしている事が示唆された。

また申請者は、スライス培養下の神経細胞に対するRNAi法を導入した。耐性遺伝子を用いた表現型復帰の実験によりsiRNAの特性を示した。RNAi法は、神経細胞に対してはまだ応用例が少なく、また表現型復帰の実験までおこなった例は皆無だった。さらにsiRNAの表現型復帰活性を指標としたドメイン機能解析を行った。これらの一連の研究で開発された手法は、脳神経系におけるタンパク質の機能解析の有用なツールになると期待できる。

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。

論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。