

(論文内容の要旨)

ニューロンは樹状突起と呼ばれる複雑に分岐した突起を発達させて、シナプスを介する入力や感覚入力を受け取る。そして、突起の長さや分岐の数、そして密度などは、ニューロンのタイプごとに著しく異なる。この樹状突起パターンの多様性は、それぞれのタイプのニューロンに固有の生理機能に貢献していると考えられている。しかしながら、樹状突起の空間パターンを調節する分子機構は、ほとんど明らかにされていない。本論文では、微小管マイナス端モータータンパク質である細胞質ダイニンが Rab5 エンドソームを輸送し、樹状突起内の分岐の位置を制御するモデルを提唱した。

ショウジョウバエの胚期及び幼虫期の末梢神経系にある *dendritic arborization (da) neuron* は、複雑に分岐した樹状突起を発達させる。*da neuron* で蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックフライを用いれば、その樹状突起の形態を共焦点顕微鏡下で容易に観察できる。このことなどから、*da neuron* は樹状突起の形態形成を研究する優れたモデル系である。本論文では、樹状突起の形態を制御する遺伝的プログラムを明らかにするために、*da neuron* の樹状突起形態を指標とした突然変異体スクリーニングを行った。このスクリーニングより樹状突起内の分岐の位置に異常が生じる変異体 (*dandelion clock*, *dlic*) が分離され、その原因遺伝子は細胞質ダイニンのサブユニットの一つであるダイニン軽中鎖をコードすることを明らかとなった。野生型では樹状突起の遠位側が盛んに分岐する一方、*dlic* 変異体では遠位側ではほとんど分岐せず、近位側で盛んに分岐する表現型を示した。この表現型から、*dlic* は樹状突起内の分岐の位置を制御することが示唆された。樹状突起においてダイニンの挙動を推測するために微小管の極性を複数のマーカーを用いて調べたところ、樹状突起では多くの微小管のマイナス端が遠位側を、プラス端が近位側を向くことが示唆され、細胞質ダイニンが遠位側へ向かって動くことが予想された。ダイニンが遠位側に向かって樹状突起の分岐を制御する分子を輸送することで、樹状突起の分岐位置を制御するとの仮説を立て、これを検証する目的でショウジョウバエ脳において細胞質ダイニンに結合する分子を免疫沈降法で探索した。その結果、初期エンドソームを制御する低分子量 GTP アーゼである Rab5 を結合分子として見つけた。GFP を融合した Rab5 を *da neuron* で発現させると、野生型の樹状突起内に粒子状のシグナルが観察され、そのシグナルの生体内における動態を観察できた。GFP-Rab5 は、遠位側と近位側の双方向に動くものや、近位側のみ、あるいは遠位側のみ動くものが見られた。*dlic* 変異体では GFP-Rab5 は樹状突起に分布しないことから、野生型では GFP-Rab5 はダイニンに依存して樹状突起に分布することが示された。さらに Rab5 の樹状突起形成に果たす機能を調べた。*dlic* 変異体の近位側に異所的に見られる樹状突起は Rab5 の活性に依存すること、また、野生型の樹状突起内の特に末端突起の形成が Rab5 に依存することが明らかになった。これらのことから、細胞質ダイニンにより Rab5 を含む初期エンドソームが樹状突起内を輸送され、樹状突起の分岐位置を制御することが強く示唆された。

最後に、これまでの知見と本研究で得られた成果をもとに、個々のニューロンの樹状突起がそれぞれに固有の位置で分岐するメカニズムについて総括的に考察した。

(論文審査の結果の要旨)

ニューロンは感覚刺激やシナプスからの入力を受け取るために、樹状突起と呼ばれる複雑に分岐した突起を伸長させる。しかしながら、樹状突起の分岐形成を司る分子のメカニズムは不明な点が多い。本申請論文では樹状突起の分岐形成の制御機構を明らかにすることを目指して、ショウジョウバエを用いた樹状突起形態に異常が生じる突然変異体のスクリーニングを出発点として研究を開始した。そして得られた変異体の原因遺伝子を同定し、その遺伝子産物が樹状突起の形態形成に果たす役割について研究した。

ショウジョウバエの *da neuron* は、そのニューロンで蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック系統を用いると、その樹状突起を個体を生かしたまま容易に観察できる。まず、申請者はこの実験系を用いて、樹状突起の形態に異常が生じる突然変異体をスクリーニングした。その結果、樹状突起が単純化する変異体や十分に伸長しない変異体を単離した。十分に伸長しない変異体 *dandelion clock (dlic)* をさらに解析すると、その変異体では樹状突起の長さだけではなく、分岐の数と分岐の位置にも異常が生じることが明らかとなった。具体的には、野生型ではその遠位側で多くの樹状突起が分岐するのに対し、*dlic* 変異体では近位側で盛んに分岐した。*dlic* の原因遺伝子をクローニングした結果、それは微小管マイナス端モータータンパク質である細胞質ダイニンのサブユニットをコードすることが分かった。*da neuron* の樹状突起において、ダイニンのレールである微小管の極性を複数のマーカーを用いて調べた結果、そのマイナス端が遠位側を向くような構造であることを明らかにした。

ダイニンが樹状突起の分岐を制御する分子を輸送すると推測し、ダイニンに結合する分子をショウジョウバエ脳よりスクリーニングした。その結果、初期エンドソームを制御する低分子量 GTPase である Rab5 が結合分子として見つかった。申請者は Rab5 とダイニンの関係についてさらに追究した。Rab5 は樹状突起に分布することを見出し、生体の突起内における動態を観察した。Rab5 のシグナルは遠位側や近位側、そして双方向に動くことが観察されたことと、ダイニンの変異体では Rab5 が樹状突起に分布しないことを明らかにした。これらのことは、Rab5 はダイニンによる輸送の制御を受けることを支持する結果であった。さらに、*dlic* 変異体にみられた近位側の異所的な分岐は、Rab5 の機能を同時に喪失させることで抑制された。そして野生型ニューロンにおいて Rab5 の機能のみを喪失させた場合でも樹状突起の分岐が抑制されたことから、ダイニンは Rab5 を輸送することで樹状突起内の分岐の位置を制御することが示唆された。これらの結果は、樹状突起の形態形成機構の新しい一端を明らかにすることができたものと高く評価される。

以上のように、本研究により樹状突起の分岐に関する分子の機構の重要な局面が明らかになり、この分野の発展に寄与したことは高く評価される。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を認める。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。