

論文内容の要旨

申請者氏名 久保 祐亮

神経細胞の軸索が標的となる細胞に正しく到着するためには、軸索の先端に存在する成長円錐が、誘引・反発因子を受容することで伸長方向を決定し、軸索が伸長する際の駆動力を発生させると考えられている。これまでに、軸索伸長のメカニズムとしてクラッチメカニズムが提唱され、軸索伸長を促進させるタンパク質 Shootin1 がクラッチ分子として機能することがわかっている。しかしながら、クラッチモジュールを構成する他のコンポーネントは明らかになっておらず、その分子ネットワークは不明である。そこで本研究では、クラッチモジュールを構成する新規クラッチ分子を探索することで分子ネットワークやその制御機構を解明し、軸索伸長の分子機構を明らかにすることを目的とした。

まず初めに、F-actin と Shootin1 との連結を仲介する新規クラッチ分子を探索したところ Cortactin を同定した。成長円錐における Cortactin の局在を免疫細胞染色により解析したところ、成長円錐の末端領域で Shootin1 と共局在することがわかった。また、ラット脳のライセートを用いた免疫共沈降法や精製タンパク質を用いた *in vitro* binding assay により、Shootin1 と Cortactin は *in vivo* において相互作用し、直接結合することが示唆された。

次に、Cortactin が逆行性に移動する F-actin と相互作用しているのかを検討するために、EGFP-cortactin を線維芽細胞または神経細胞に発現させ、細胞内一分子計測を行った。その結果、EGFP-cortactin が F-actin と同じ速度で逆行性に移動することがわかった。続いて、F-actin と Shootin1 の連結を Cortactin が仲介するのかを検討するために、F-actin sedimentation assay を行った。F-actin と Shootin1 との直接的な相互作用は見られなかったが、Cortactin を加えることにより、Shootin1 が F-actin と共沈降したことから、Cortactin が F-actin と Shootin1 の連結を仲介することが示唆された。

F-actin がクラッチ分子により細胞接着分子と連結すると、F-actin の逆行性移動の速度が遅くなることが示唆されている。そこで、Cortactin 発現抑制細胞におけるアクチンの一分子計測を行ったところ、コントロール細胞よりも F-actin の逆行性移動の速度が有意に速くなった。さらに、F-actin の駆動力が Cortactin を介して伝わっているのかをビーズトラッキングにより検討したところ、コントロール細胞と比較して、Cortactin 発現抑制細胞ではビーズの動きの速度が有意に遅くなった。また、軸索が伸長する際に発生する力を定量したところ、コントロール細胞よりも Cortactin 発現抑制細胞のほうが牽引力が減少した。最後に、L1 コーティング上で培養した神経細胞の軸索の長さを比較したところ、コントロール細胞よりも Cortactin 発現抑制細胞のほうが有意に軸索の長さが短くなった。これらのことから、Cortactin は F-actin の駆動力を L1 に伝え、牽引力の発生に関与することで軸索伸長を促進させることが示唆された。

以上の結果より、Cortactin は Shootin1 および F-actin の逆行性移動と連結することで、F-actin の駆動力を細胞接着分子 L1 に伝え、牽引力を発生させることで軸索伸長を促進させるクラッチ分子として機能することが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 久保 祐亮

神経細胞が他の神経細胞と神経回路網を形成するためには、軸索を伸長させなければならない。その際に重要になるのが軸索の先端に存在する成長円錐である。この成長円錐が軸索を伸長させる駆動力や、外からの誘引・反発因子を受容することで方向転換すると考えられている。これまでに成長円錐が軸索を伸長させる駆動力を発生させる分子機構としてクラッチメカニズムが提唱されてきた。しかし、このメカニズムを構成するコンポーネントや制御機構は不明だった。申請者は、Cortactin が Shootin1 と複合体を形成することでアクチン線維と基質を連結するクラッチ分子として機能することを明らかにした。またこれらの複合体が軸索誘引因子 Netrin-1 により制御されていることも明らかにした。

申請者はまず初めに、Shootin1 と相互作用するアクチン結合タンパク質の探索を行ったところ、Cortactin を同定した。Cortactin と Shootin1 との相互作用や神経細胞における局在解析を行ったところ、内在性の Cortactin と Shootin1 は相互作用し、これらは直接結合することがわかった。また、Cortactin と Shootin1 は成長円錐の末端領域で共局在することがわかった。さらに、Cortactin が逆行性に移動する F-actin と相互作用すること、F-actin と Shootin1 の連結を Cortactin が仲介することが明らかになり、Cortactin がクラッチ分子として機能することが考えられた。

続いて、Cortactin 発現抑制細胞における F-actin の細胞内一分子計測、ビーズトラッキングにより、Cortactin が F-actin 逆行性移動の駆動力を細胞接着分子に伝えるクラッチ分子として機能することを見出した。次に、軸索伸長時の成長円錐下で発生する牽引力を解析したところ、Cortactin が軸索伸長のための牽引力の発生に関与することが明らかとなった。

さらに、Cortactin と Shootin1 の相互作用がどのように制御されているのかを解析したところ、Cortactin はリン酸化 Shootin1 とより結合することが明らかとなり、軸索誘引因子 Netrin-1 の下流に存在する PAK1 によりこれらの相互作用が制御されていることを見出した。

今回申請者が得た結果は、Cortactin が軸索伸長の分子機構の一つであるクラッチメカニズムに関与し、化学的シグナルを機械的な力に変換するインターフェースとして機能することが示唆された。本論文の研究成果は、神経軸索の伸長メカニズムおよびシグナルから力への変換機構の重要な側面を解明したと考えられる。

以上のように、本論文は神経細胞の軸索伸長の分子機構およびその制御機構について新たな知見を示すもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。