

論文内容の要旨

申請者氏名 馬場 健太郎

神経回路網の形成のためには、神経細胞の軸索が脳内の化学分子に誘導されて正しい標的細胞に向かって伸長しなければならない。この軸索の化学走性のための推進力を生み出す仕組みのひとつとしてクラッチ機構が想定されている。神経軸索先端の成長円錐では、アクチン線維が重合・脱重合を繰り返し進行方向に対して逆行性の移動をする。これまでに、Shootin1 が逆行性移動をするアクチン線維と細胞接着分子 L1 を連結することにより軸索伸長に必要な推進力を生み出すクラッチ分子として機能することが報告された。また、軸索誘引因子 Netrin-1 の刺激により Shootin1 が Pak1 を介してリン酸化されると、軸索伸長のための推進力が促進されることが示された。さらに、Cortactin が逆行性移動をするアクチン線維と Shootin1 との相互作用を直接的に介在することや、Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と Cortactin の相互作用が促進されることが示された。しかし、Shootin1 と L1 が直接あるいは他の未知の分子を介して相互作用するかという点は不明であり、これらの分子群が実際に神経軸索の化学走性に関与するかという点も解っていない。

そこで申請者は、Shootin1 と L1 の精製タンパク質を用いて *in vitro* binding assay を行い、Shootin1 と L1 が直接結合することを見出した。また、精製タンパク質や HEK963T 細胞を用いた解析により、Shootin1 が Pak1 によりリン酸化を受けると Shootin1 と L1 と結合が促進されることが解った。さらに、培養海馬神経細胞を用いた解析により、Netrin-1 刺激により Shootin1 が Pak1 によるリン酸化を受け、Shootin1 と L1 の結合が促進される結果が得られた。これらの解析結果により、Netrin-1 による Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1 の結合が促進されることが示唆された。

次に L1 および Cortactin が結合する Shootin1 の領域を *in vitro* binding assay により解析し、N 末端側の Shootin1 (1-125 a.a.) が L1 と結合するが Cortactin とは結合しないことが解った。さらに、免疫沈降実験により Shootin1 (1-125 a.a.) が Shootin1 と L1 の相互作用を阻害するデータが得られたため、Shootin1 (1-125 a.a.) をドミナントネガティブ体として用いて培養海馬神経細胞の Shootin1 と L1 の相互作用を阻害したところ、Netrin-1 による成長円錐の推進力の促進と軸索伸長の促進が抑えられた。さらに、Netrin-1 の濃度勾配刺激により成長円錐内で非対称に分布する Shootin1 リン酸化の亢進が引き起こされ、Shootin1 (1-125 a.a.) による Shootin1 と L1 の相互作用の阻害により、Netrin-1 の濃度勾配により誘引される軸索の化学走性が阻害された。

以上の一連の結果とこれまでに報告された研究により、アクチン線維、Cortactin、Shootin1、L1 からなるクラッチ機構を担う分子群が明らかとなった。また、今回の結果から Shootin1 と L1 の結合が Netrin-1 による Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化シグナルを軸索の化学走性のための推進力に変換することが示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 馬場 健太郎

正常な脳神経回路網の形成のためには、神経細胞の軸索が標的細胞に正しく到達する必要がある。軸索の先端に存在する成長円錐は、脳内の誘引分子や反発分子のシグナルを受容し、方向性を持った力を生み出すことで軸索の伸長方向を決定し軸索のガイダンスを引き起こすと考えられている。成長円錐の先端ではアクチン線維が重合・脱重合を繰り返し進行方向に対して逆向きの移動をするが、成長円錐が化学シグナルを力に変換するしくみとして想定されているのがクラッチ分子によるアクチン線維と細胞接着分子の連結である。すなわち、シグナル伝達によりクラッチ分子によるアクチン線維と細胞接着分子の連結が強まると、アクチン線維の動きが細胞接着分子に伝わることで成長円錐の推進力が強まると想定されている。これまでに申請者らのグループにより、クラッチ分子として Shootin1 とアクチン線維結合タンパク質 Cortactin が同定され、これらがアクチン線維の動きを細胞接着分子 L1 に伝えて軸索伸長のための推進力をうみだすこと、また軸索誘引因子 Netrin-1 の刺激により Shootin1 が Pak1 を介してリン酸化されると Shootin1 と Cortactin の直接相互作用が促進されることが示された。しかし、Shootin1 と L1 がどの様に相互作用するかという点は不明であり、これらの分子が実際に神経軸索の化学走性に関与するかという点も解っていなかった。

申請者は、本研究で Shootin1 と L1 が直接相互作用をすることおよび Netrin-1 による Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化により Shootin1 と L1 の結合が促進されることを見出した。Shootin1 のドミナントネガティブ体を用いて培養海馬神経細胞の Shootin1 と L1 の相互作用を阻害したところ、Netrin-1 による成長円錐の推進力の促進と軸索伸長の促進が抑えられた。また、マイクロデバイスを用いた Netrin-1 の濃度勾配刺激により成長円錐内で非対称に局在する Shootin1 リン酸化が引き起こされることを証明した。さらに申請者は、Shootin1 と L1 の相互作用の阻害することにより Netrin-1 の濃度勾配により誘引される軸索の化学走性が阻害されることを示した。

本研究の成果とこれまでに報告された一連の研究から、神経軸索のクラッチ機構を担う分子連結の一つがアクチン線維から L1 へ至るまで途切れなく明らかとなった。また、Pak1 を介した Shootin1 のリン酸化によって Shootin1 と L1 間および Shootin1 と Cortactin の二か所の連結が強まることがわかり、この二重の調節によって細胞外 Netrin-1 によって引き起こされるシグナルを軸索の推進力に効率よく変換する可能性が示唆された。さらに、これらのアクチン線維、Cortactin、Shootin1 および L1 からなる分子集合体が、Netrin-1 の濃度勾配刺激により成長円錐内で非対称に活性化されて軸索の化学走性のための方向性を持った推進力を引き起こすことが示唆された。

以上のように、本論文は神経軸索ガイダンスの分子メカニズムに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。