

論文内容の要旨

申請者氏名 黄 利国

脳内神経回路の形成過程では神経細胞が軸索を伸長させる必要があり、そのためには膨大な量の膜成分がゴルジ・小胞体から小胞輸送により軸索先端へ供給されることが不可欠である。これまでに、申請者らの研究室の先行研究で、ラット培養海馬神経細胞において、Rab33aが細胞膜成分をゴルジ装置から軸索先端へ輸送し、軸索の形成と伸長に関与することが報告されている。しかし、生体内におけるRab33aの役割はまだ明らかになっていない。また、哺乳類では、Rab33aに加えてRab33bが存在し、最近、骨格形成の異常を示すSmith-McCort 異形成症の患者に、*RAB33B* の変異が報告された。しかし、Rab33b が生体内においてどのような役割をしているかについては明らかになっていない。

本研究で、申請者は、生体内におけるRab33の役割を明らかにするために、モデル脊椎動物であるゼブラフィッシュを用いた。ゼブラフィッシュは、半透明で脳内の軸索束の観察を容易に行うことができる。ゼブラフィッシュにおいては、3つの*rab33*遺伝子 (*rab33a*, *rab33ba*, *rab33bb*) が存在することが知られているが、脊椎動物の*rab33*の相動性解析と系統樹解析により、ゼブラフィッシュの*rab33a*がヒトの*RAB33A*のそしてゼブラフィッシュの*rab33ba*がヒトの*RAB33B*のそれぞれオーソログ遺伝子であることがわかった。また、*rab33a*と*rab33ba*のホールマウント *in situ* hybridization を行ったところ、*rab33a*と*rab33ba*が発現時期のゼブラフィッシュの前脳および後脳で発現することがわかった。特に*rab33a*は、前脳のdorsorostral cluster (DRC) および間脳のventrorostral cluster (VRC) に高発現していた。DRCおよびVRCに存在する神経細胞は、それぞれ左右の前脳の半球をつなぐ交連線維であるanterior commissure (AOC) およびpostoptic commissure (POC)を形成することが知られている。

次に、*rab33a*と*rab33ba*の機能を解析するために *rab33a*と*rab33ba*のゼブラフィッシュ変異体を作製した。軸索を抗acetylated tubulin 抗体でラベルし観察したところ、*rab33a*と*rab33ba*の二重ホモ変異体胚では、野生型に比べて、AOCとPOCの断面積が減少することがわかった。一方、*rab33a*と*rab33ba*の一重変異体では、AOCとPOCの断面積に有意な変化は見られなかった。また、Gal4/UAS システムを用いて、神経細胞を標識して、AOCに存在する神経細胞の交連線維における軸索投射を1細胞レベルで計測した。その結果、二重変異体の神経細胞の軸索の長さが、野生型と比べ有意に減少していた。これらの結果から、*rab33a*と*rab33ba*が前脳交連線維における神経細胞の軸索の伸長に関与することが明らかとなった。

以上の一連の結果から、*rab33a*と*rab33ba*がゼブラフィッシュの前脳および後脳、特に前脳の交連線維AOCとPOCを形成する神経細胞が存在するDRCとPOCで発現することがわかった。また、*rab33a*と*rab33ba*が協調して前脳交連線維の伸長を担うことが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 黄 利国

脳が正しく形成し、機能を獲得するためには、神経細胞が適切な場所に軸索を伸長して神経ネットワークを構築する必要がある。また、神経軸索の伸長には、膨大な量の膜成分の軸索細胞膜への付加が伴う。申請者らのグループは、これまでにラット培養海馬神経細胞を用いて、Rab33aが細胞膜をゴルジ装置から軸索先端へ輸送し、軸索先端の成長円錐における膜成分の付加と軸索の形成・伸長に寄与することを報告している。しかし、これらのデータは培養細胞を用いて得られたもので、実際の脳内におけるRab33aの機能は不明だった。また、哺乳類では、Rab33aに加えてRab33bが存在することが知られているが、Rab33bの神経細胞における機能もわかっていなかった。そこで申請者は、モデル脊椎動物ゼブラフィッシュを用いて脳内におけるRab33aとRab33bの機能解析を行った。

ゼブラフィッシュには3つの*rab33*遺伝子、*rab33a*、*rab33ba*、*rab33bb*が存在するが、まず、相動性解析および系統樹解析により、ゼブラフィッシュの*rab33a*がヒトの*RAB33A*の*rab33ba*がヒトの*RAB33B*のそれぞれオーソログ遺伝子であることがわかった。そこで次に、*rab33a*と*rab33ba*の発現と機能の解析を進めた。*In situ* hybridizationにより、*rab33a*と*rab33ba*が発現時期のゼブラフィッシュの前脳および後脳で発現することがわかった。特に*rab33a*は、前脳のdorsorostral cluster (DRC) および間脳のventrorostral cluster (VRC) に高発現していた。DRCおよびVRCの神経細胞は、それぞれ左右の前脳の半球を繋ぐ交連線維であるanterior commissure (AOC) およびpostoptic commissure (POC)を構成する軸索を伸長する。そこで、*rab33a*と*rab33ba*のゼブラフィッシュ変異体を作製し、軸索束を抗acetylated tubulin抗体でラベルし観察したところ、*rab33a*と*rab33ba*の二重ホモ変異体胚では、野生型に比べて、AOCとPOCの断面積が有意に減少することがわかった。一方、*rab33a*と*rab33ba*の一重変異体では、AOCとPOCの断面積に変化は見られなかった。また、神経細胞を標識して、AOCに存在する神経細胞の交連線維における軸索投射を1細胞レベルで計測した結果、*rab33a*と*rab33ba*の二重ホモ変異体胚では神経細胞の軸索の長さが、野生型と比べ、減少していた。これらの結果から、*rab33a*と*rab33ba*が前脳交連線維における神経細胞の軸索の伸長に関与することが明らかとなった。

本論文は、ゴルジ・小胞体から膜成分を小胞輸送により軸索先端へ供給すると考えられている*rab33a*が脳内で軸索伸長に寄与することを示した初めての報告である。また、*rab33a*が神経細胞で軸索伸長に関与することも初めて明らかとなった。

以上のように、本論文は神経回路網形成を担う脳内における軸索伸長の分子メカニズムの一端を明らかにしたもので、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。