

氏名(本籍)	やま した まさ ひろ 山下正博(千葉県)		
学位の種類	博士(神経科学)		
学位記番号	博甲第5075号		
学位授与年月日	平成21年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Molecular and genetic analyses of the synapse formation and maintenance based on the cell-cell interaction at synapses (細胞間相互作用に基づくシナプス形成と維持に関する分子遺伝学的研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	志賀 隆
副査	筑波大学教授	理学博士	久野 節二
副査	筑波大学教授	博士(医学)	榊 正幸
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	一條 裕之

論文の内容の要旨

(目的)

神経回路網が正常に機能するためには、適切な細胞間でシナプスが形成され、その機能が維持されなければならない。この特異的なシナプス形成と維持において、プレシナプス・ポストシナプス細胞間の相互作用が重要な役割を果たす。これまで、シナプス形成における細胞間相互作用に関与する分子として分泌因子や膜タンパク質等が同定されてきたが、その具体的なメカニズムについては未だに不明な点が多い。そこで本研究ではシナプス形成における細胞間の相互作用を解明するために、(1) 標的的特異的なシナプス形成を制御するメカニズム、(2) 逆行性神経伝達を制御する分子メカニズムについて、モデル生物である線虫を用いて解析した。

(1) 標的的特異的なシナプス形成を制御するメカニズムの研究

(対象と方法)

線虫を用い、水溶性物質に対する走化性行動を制御する神経回路網に注目した。この行動に関する感覚神経 ASER (プレシナプス) のシナプス部位を可視化するために、シナプス小胞タンパク質シナプトブレビンと GFP との融合遺伝子を ASER 特異的に発現する形質変換体を作製した。そしてこの形質変換体を用い、ASER と介在神経 AIY (ポストシナプス) との間のシナプス形成が特異的に異常になる変異体を探索した。

(結果)

上記のようにして作成した形質変換体では ASER の軸索に沿ってドット状に GFP の局在が観察された。この GFP の局在は、これまで電子顕微鏡の連続切片解析から得られている ASER 神経のシナプス部位とほぼ同じパターンを示したため、適切にシナプスを標識していると推測された。この形質変換体を用い、ASER・AIY シナプスの形成に異常を示す変異体をスクリーニングした。その結果、約 1700 ゲノムの解析から 1 つの変異体 *ta104* を単離した。得られた変異体には、注目した ASER・AIY 間のシナプス形成以外には異常は観察されなかった。

(考察)

本実験で単離された変異体 *tal04* は, ASER・AIY シナプスに異常を示すが, それ以外には異常は観察されなかった。従って, この変異体は, ASER・AIY 間の特異的なシナプス形成を制御する分子メカニズムの解析に非常に有効であると考えられる。

(2) 逆行性神経伝達を制御する分子メカニズムの研究

(対象と方法)

線虫の神経筋接合部では, 筋肉から神経の活性を逆行性に制御するペプチド性シグナルが存在し, その調節因子として AEX-1 が機能していることが既に明らかにされている。AEX-1 はシナプス小胞の放出を制御する UNC-13 と同じタンパク質ファミリーに属することから, 筋肉からのペプチド小胞放出を制御すると推測される。AEX-1 を介した逆行的小胞放出を制御する分子機構を解明するために AEX-1 と相互作用する分子の単離とその解析を行った。AEX-1 と同じ分子経路で機能する分子を単離するために, *aex-1* 変異体と同じ排泄行動異常を示す変異体を探索した。それによって得られた *syn-1*/*SYN-1* について *aex-1*/*AEX-1* との相互作用について遺伝学的手法や two hybrid 法などを用いて解析した。

(結果)

aex-1 変異体と同じ排泄行動異常を示す変異体を探索した結果, *syn-1* 変異体を得た。クローニングの結果, *syn-1* は, SNARE タンパク質の1つであるシンタキシンをコードしていた。また発現解析により, *SYN-1* は AEX-1 と同様に筋肉や腸などの非神経組織 (ポストシナプス側) で発現し, その原形質膜上に局在していた。薬剤耐性を指標とした遺伝学解析では, 両者は同一の分子経路で機能していることが示唆されたが, AEX-1 と *SYN-1* のタンパク質間には two hybrid 法によって直接的な相互作用は見られなかった。さらに *syn-1* 変異型を用いた解析においても, AEX-1 が *SYN-1* の構造変化を促すことで小胞放出を制御することを示唆する結果は得られなかった。

(考察)

aex-1 変異体と同じ排泄行動異常を示す変異体の探索によって *syn-1* 変異体を単離した。*syn-1* は, シンタキシンをコード *SYN-1* は AEX-1 同様にポストシナプス側の原形質膜上に局在していた。線虫のプレシナプスには *SYN-1* とは別のシンタキシン UNC-64 が発現し, UNC-13 と直接相互作用する。また変異型 UNC-64 を用いた解析により, UNC-13 は UNC-64 の構造変化を促すことで, シナプス小胞の放出を制御していることが分かっている。これに対応して, ポストシナプスにおいても *SYN-1* と AEX-1 の相互作用が逆行性小胞を制御することが予想された。しかしながら, AEX-1 と *SYN-1* のタンパク質間には直接的な相互作用は見られなかった。さらに変異型 *SYN-1* を用いた解析においても, AEX-1 が *SYN-1* の構造変化を促すことで小胞放出を制御することを示唆する結果は得られなかった。これらの結果から, *SYN-1* は AEX-1 と同じ分子経路上で逆行性の小胞放出に関与するが, その分子機構はプレシナプス側の UNC-64/UNC-13 を介した機構とは大きく異なることが明らかになった。

審査の結果の要旨

本研究ではモデル生物である線虫を用いて, シナプス形成における細胞間相互作用を解析するために2つの実験を行なった。まず, ASER・AIY 間のシナプスにのみ異常を示す変異体を単離することに成功した。今後, この変異体はシナプス形成における標的認識の分子メカニズムを解明するのに有用な情報を提供することが期待される。またプレシナプスとポストシナプスにおける相互作用において, ポストシナプスからの逆行性伝達に関与する *syn-1* を見だし, 細胞に特異的な小胞放出機構が存在することを示した。従って,

本研究はシナプス形成の特異性を解析する実験系を確立し，またシナプスにおける細胞間相互作用に関する新規の分子機構を見いだした点で多いに評価できる。

よって，著者は博士（神経科学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。