

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 青木 誠

分化後の神経細胞は周囲の組織から提供される誘因・反発性の因子によって誘導され標的組織に投射する。神経栄養因子は神経栄養因子受容体 (Trk) から引き起こされるシグナルカスケードによってその機能を発揮する。培養神経細胞の成長円錐は神経栄養因子の分泌組織に向かって誘導される。しかし、発生初期の動物から採取した三叉神経は神経栄養因子の一種 NGF による軸索の誘導が起きない。このことから発生初期の神経細胞は NGF に依存しないメカニズムで生存と軸索伸展を行う事が予測された。この結果は神経細胞の自発的な軸索の伸展には神経栄養因子は必要ないということを示唆する。後に、発生初期の三叉神経は神経栄養因子の一種である BDNF 及び NT-3 によって軸索の誘導がされることが判明した。両因子は三叉神経の投射先および軸索の通過する組織に発現し、軸索はその通り道に分泌される神経栄養因子の作用によって標的組織に投射されることが考えられた。しかし、BDNF および NT-3 両遺伝子のノックアウト動物の三叉神経投射には異常が見られなかった。これらのことから神経細胞は神経栄養因子に依らないメカニズムによって自発的な軸索伸展をおこなっていることが考えられる。

本申請者は Islet2a 遺伝子の下流で感覚神経細胞の末梢軸索伸展に関与する遺伝子スクリーニングから *Sidetrk1* を同定し、*Sidetrk1* が pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) による Trk のトランス活性化を促進し、軸索の伸展を促すことを発見した。まず、*Sidetrk1* がゼブラフィッシュ胚感覚神経の末梢軸索伸展に与える影響を遺伝子ノックダウンおよび遺伝子過剰発現によって調べた。次に培養細胞を用いて *Sidetrk1* が Trk の細胞内局在に与える影響を明らかにした。また、培養細胞を用いて *Sidetrk1* が PACAP による Trk のトランス活性化を促進する可能性を検討した。さらに、シグナル伝達阻害剤を用いた実験により Trk のトランス活性化がどのようなシグナル伝達系の活性化につながり、末梢軸索の伸展につながるかを調べた。最後にゼブラフィッシュ胚感覚神経の軸索伸展に PACAP が与える影響を検討し、*Sidetrk1* との機能的相互作用を解析した。その結果以下の内容から構成された博士論文を提出した。

1 *Sidetrk1* はゼブラフィッシュ感覚神経細胞の末梢軸索の伸展と分岐を促進する

Sidetrk1 は感覚神経細胞の末梢軸索伸展に関与する Islet2a 遺伝子によって転写制御を受ける遺伝子群のスクリーニングによって見いだされた遺伝子である。*sidetrk1* は受精後 24 時間胚の Rohon-Beard (RB) neuron を含む一次感覚神経において主な発現が見られた。*sidetrk1* の感覚神経軸索伸展に与える影響を明らかにするため、モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を用いた遺伝子ノックダウンおよび mRNA による過剰発現を行った。*sidetrk1*-MO 注入したゼブラフィッシュ胚は RB neuron の末梢軸索伸展と分岐形成が阻害された。一方、中枢軸索の軸索伸展には大きな変化は観察されなかった。*sidetrk1* の過剰発現は RB neuron の末梢軸索分岐数の増大を引き起こした。次に、胚発生後期に発生する感覚神経において *sidetrk1* の与える影響を調べた。*sidetrk1* は受精後 33 時間の胚の感覚神経 Dorsal Root Ganglion (DRG) neuron において発現が見られた。*sidetrk1* のノックダウンは DRG neuron の末梢軸索伸展を阻害した。

2 神経栄養因子受容体(Trk)は RB neuron の末梢軸索伸展に影響を与える

Trk の発現パターン解析の結果、RB neuron は *trkA*, *trkB1*, *trkC1* の三つのサブタイプを発現することが判明した。*trkA* のノックダウン表現型は *sidetrk1* と同様に RB neuron の末梢軸索伸展を阻害し、中枢軸索伸展には影響を与えなかった。*trkA* と *sidetrk1* のノックダウンが同様の表現型を示すことから両遺伝子が RB neuron の軸索伸展において機能的な相互作用をもつ可能性が考えられた。

3 *Sidetrk1* は細胞表面への Trk の輸送を阻害し Trk のトランス活性化を促進する

Trk は翻訳後に糖鎖修飾を受け、140 kDa と 100 kDa の分子種が存在する。*Sidetrk1* 過剰発

現細胞では高分子量の Trk が減少した。次に免疫沈降法により Sidetrk1 と Trk の結合を調べた。その結果、Sidetrk1 は全てのサブタイプの Trk に結合し、低分子量の Trk と優位に結合することが判明した。Trk の輸送は糖鎖修飾によって影響を受けることが知られていることから、次に Sidetrk1 の発現が Trk の細胞内局在に与える影響を調べた。Sidetrk1 共発現細胞において Trk をビオチン化し、免疫沈降法によって Trk の細胞表面の発現量を調べた。細胞表面の Trk は Sidetrk1 の共発現によって減少した。同様の結果は HeLa 細胞をもちいた両遺伝子の共発現実験においても支持され、細胞表面で発現する Trk は Sidetrk1 の共発現によって消失し、細胞内のゴルジ体および細胞内小胞で両タンパク質の共局在が観察された。PACAP による Trk のトランス活性化がゴルジ体内で起きること。Sidetrk1 が Trk の細胞表面への輸送を妨げ、ゴルジ体内への保持をする事実から、Sidetrk1 が Trk のトランス活性化を促進している可能性が考えられた。Trk を安定発現する 615 細胞を用いて Trk と Sidetrk1 を安定発現する細胞株を樹立し、222 および 2210 細胞とした。222 細胞と 615 細胞を PACAP で刺激し細胞内のリン酸化された Trk の量を 615 細胞と 222 細胞の間で比較した。その結果、Sidetrk1 を共発現する 222 細胞では 615 細胞に比べ細胞内の Trk が増加し、それに伴ってリン酸化 Trk も増加した。このことから Sidetrk1 は細胞内にとどまる Trk の量を調節し、細胞内で起きる Trk のトランス活性化を促進する事が考えられた。次に Sidetrk1 発現細胞で神経突起形成に変化が現れるかどうかを調べた。222 および 2210 細胞は Sidetrk1 を共発現しない 615 細胞と比較して PACAP 刺激による突起形成が促進された。

4 Sidetrk1 は MAPK シグナルを選択的に活性化し RB neuron における末梢軸索伸展を行う Trk は MAPK シグナル伝達系および PI3K シグナル伝達系を下流にもつことが既に知られている。どの下流シグナルが軸索伸展繋がるかを調べる為にシグナル分子阻害剤を用いた実験を行った。*sidetrk1* を過剰発現するゼブラフィッシュ胚に MAPK シグナル阻害剤の U-0126 (MAPK の上流因子 MEK-1 の阻害剤) を作用させ RB 細胞の末梢軸索伸展を観察した。その結果、*sidetrk1* 過剰発現による RB 細胞軸索の過剰分岐は見られず、軸索の伸展は起きなかった。また *sidetrk1* ノックダウン胚では MAPK リン酸化特異抗体で染色される RB neuron の数が有意に減少する一方、リン酸化 Akt 特異抗体で染色される RB neuron の数に変化は見られなかった。以上のことから、Sidetrk1 は MAPK シグナルを優位に活性化することで RB neuron の末梢軸索伸展を促進することが考えられる。

5 RB neuron は PACAP を発現し Trk のトランス活性化を起こす

RB neuron で Trk のトランス活性化が起きるかどうかを調べる目的で Trk のトランス活性化に必要な遺伝子の発現を検討した。受精後 17 時間および 24 時間のゼブラフィッシュ胚で RB neuron は *pacap1b*, *pac1a* 及び *vipr2* を発現することが分かった。よって RB neuron では PACAP による Trk の活性化が起きることが考えられた。末梢軸索の伸展が始まる受精後 17 時間における *pacap1b* の発現は、Trk トランス活性化が軸索伸展初期に必要なことを示唆した。*pacap1b* が RB neuron の末梢軸索伸展に関与するか否かをノックダウンによって調べた。*pacap1b* ノックダウン胚では RB neuron の末梢軸索伸展が起きなかった。一方、*pacap1b* の過剰発現は末梢軸索の分岐を増加させた。*pacap1b* と *sidetrk1* の機能的相互作用を明らかにするために、*pacap1b* の過剰発現と *sidetrk1* ノックダウンを同時に行った。*sidetrk1* のノックダウン条件下では、*pacap1b* 過剰発現は RB neuron の末梢枝の分岐を増加させなかった。同様に、*pacap1b* ノックダウン条件下では、*sidetrk1* の過剰発現は RB neuron の末梢枝の伸展を促進しなかった。これらの結果から、Sidetrk1 は PACAP1b による Trk の活性化を促進し、RB neuron の末梢軸索の伸展に関与することが考えられた。

以上、本研究により、Sidetrk1 は Trk の細胞内局在を制御し PACAP による Trk のトランス活性化を促進することが明らかになった。この成果は、投射先からの栄養因子に乏しい分化後の神経細胞が自ら分泌する PACAP によって Trk シグナルを活性化し、生存や軸索伸展を行うメカニズムを提唱するもので、神経発生分野において新たな発見であると考えられる。

以上の成果は学術上、応用上資するところが大きく審査委員一同は本論文を博士（農学）の学位を授与するに値すると認めた。