

細胞の形態変化の過程では、細胞骨格の再構築が繰り返され、これに伴いタンパク質が小胞輸送により各細胞内領域へ輸送される。神経細胞のような極性を有する細胞では、小胞輸送によるタンパク質の輸送は軸索及び樹状突起の形成・機能獲得に必須である。例えば、発生過程において、神経軸索の伸長やガイダンスに必要な受容体は軸索へと運ばれ成長円錐に局在し、種々のリガンドと作用することにより軸索伸長を制御している。このように、細胞内におけるタンパク質の輸送が正しく行われることが神経突起形成・伸長といった神経細胞の成熟においても重要であると考えられる。

近年、細胞内輸送を担う新たなタンパク質ファミリーとして、*sorting nexin* (SNX) の研究が進められている。SNX は *phox homology* (PX) ドメインを有する一連のタンパク質であり、酵母から哺乳類まで種を越えて広く保存されている。PX ドメインはホスファチジルイノシトール3リン酸 (PtdIns(3)P) と親和性が高く、それゆえ SNX は PtdIns(3)P を多く含む早期エンドソームに局在する。このような特徴から、SNX は細胞内の様々な機能、例えばエンドサイトーシスやエンドソームの輸送、そしてシグナル伝達等に関与し、細胞内の恒常性維持を含めた基本的かつ重要な機能を担っていることが示されている。

哺乳類の SNX は、そのドメイン構造やアミノ酸配列から、SNX<sup>PX</sup>、SNX<sup>PX-BAR</sup>、SNX<sup>PX-other</sup> の3つのグループに分類される。グループ1: SNX<sup>PX</sup> は、SNX のアミノ酸配列の大部分が PX ドメインで構成され、グループ2: SNX<sup>PX-BAR</sup> は、PX ドメインの他、C 末端側に Bin/amphiphysin Rvs (BAR) と呼ばれるドメインを有する。またグループ3: SNX<sup>PX-other</sup> は、PX ドメインの他、BAR ドメイン以外の様々なドメインを有する。

最近、マウス神経芽細胞腫 N1E-115 細胞における細胞体と伸長中の神経突起に局在しているタンパク質について網羅的なプロテオーム解析が行われ、複数の SNX が、細胞体と比べ神経突起に多く局在しているタンパク質として同定された。中でも SNX3 は神経突起での局在が細胞体の約 5.2 倍高く、SNX ファミリーの中で最も多く神経突起に局在していることが明らかとなった。このことは、神経突起伸長に必要な細胞内輸送機構に SNX3 が関与している可能性を示唆する。神経突起伸長過程においては種々の細胞内輸送が行われているが、細胞内輸送と SNX3 が属する SNX<sup>PX</sup> を関連づけた研究報告はない。このような背景のもと、申請者は、SNX<sup>PX</sup> ファミリーの機能を明らかにするため、神経突起伸長機構に焦点を当てて研究を行った。

本研究は以下の3章から構成されている。第1章では、培養細胞を用いて神経突起伸長における SNX3 の役割について検討した。第2章では、SNX3 の発現パターンについて、マウスを用いて解析を行い、胎生期から成体に至るまでの時空間的発現パターンの解明を行った。第3章では、SNX3 と相同性の高い SNX12 に着目し、培養細胞及びマウスを用いて、発現パターンと神経突起伸長における役割について検討した。

### 神経突起伸長における SNX3 の役割に関する検討

マウス神経芽細胞腫 N1E-115 細胞を用いて、神経突起伸長における SNX3 の関与を検討

した。GSK-3 $\beta$  阻害剤であるリチウムを細胞に添加したところ、30mM、添加後 24 時間において、突起伸長が観察された細胞が最も高頻度に認められた。次に、神経突起伸長時における SNX3 発現の変化を RT-PCR 法及びイムノプロット法で解析したところ、リチウム添加後 24 時間では、SNX3 mRNA は約 4.0 倍に、SNX3 タンパク質は約 2.1 倍に増大した。この結果から、SNX3 は神経突起伸長時に発現が増大することが示された。さらに、SNX3 を siRNA の導入によりノックダウンしたところ、リチウムによる神経突起伸長作用が有意に抑制されたことから、SNX3 は GSK-3 $\beta$  阻害による神経突起伸長作用に必要なタンパク質の 1 つであることが示唆された。

次に、SNX3 の正常な構造を有するコンストラクト (SNX3 (Full length))、N 末端側を欠損させた変異体コンストラクト (SNX3 $\Delta$ N) 及び C 末端側を欠損させた変異体コンストラクト (SNX3 $\Delta$ C) を作製し、GFP ベクターに組み込み細胞へ導入することで過剰発現させた。その結果、SNX3 (Full length) 及び SNX3 $\Delta$ N の導入では神経突起伸長が促進され、また導入した SNX3 は早期エンドソームに局在した。しかし、SNX3 $\Delta$ C の導入では神経突起伸長が促進されず、さらに早期エンドソームへの局在も観察されなかった。これらの結果から、SNX3 は神経突起伸長を促進すること、この突起伸長作用と SNX3 の細胞内局在には SNX3 の C 末端側領域が重要な働きをしている可能性が考えられた。そこで、SNX3 及びその変異体の組換えタンパク質を作製し、SNX3 の C 末端側領域のリン脂質への結合性を protein-lipid overlay assay 法により解析した。その結果、C 末端側領域は PtdIns(3)P、PtdIns(4)P 及び PtdIns(5)P と結合すること、この結合は C 末端側領域の塩基性アミノ酸残基をすべてアラニンに置換することで認められなくなることが分かった。したがって、SNX3 は PX ドメインに加えて、C 末端側領域もリン脂質への親和性を有することが新たに示唆された。

### 発生過程における SNX3 の発現パターンに関する検討

マウスにおける SNX3 の発現パターンについては、様々なデータベースに報告されているものの、発生過程における経時的かつ詳細な発現パターンについては明らかになっていない。様々な遺伝子の機能を解析する上で、時空間的な発現変動を解明することは有意義な情報となることから、本章では、E9.5 から生後 8 週にかけてのマウス SNX3 mRNA の発現パターンを whole mount 法を含む *in situ* hybridization 法を用いて解析した。

E9.5 では、SNX3 mRNA は前脳、咽頭弓、眼、体節、胎肢等に発現していた。この時期は器官形成が盛んであることから、SNX3 はこれら組織の形成に関与している可能性が示された。E15.5 以降は、大脳皮質では皮質版 (CP) 及び脳室帯 (VZ) に、海馬ではアンモン角 (CA1-CA3) 及び歯状回 (DG) に、嗅皮質では主に第 II 層に SNX3 mRNA の発現が認められ、さらに SNX3 mRNA の発現は成体に至るまで維持されていた。小脳では、胎生期では主に外顆粒層で、出生後は主にプルキンエ細胞で SNX3 mRNA の発現が確認された。脊髄では、胎生期から P7 にかけて、主に前角で SNX3 mRNA の発現が確認されたものの、P21 以降では発現が殆ど認められなかった。

以上, SNX3 mRNA が発生期において中枢神経系を含む多くの組織で発現していること, 胎生期から出生後にかけて組織ごとに多様な発現パターンを示すことが見出された. また, 既存のデータベースでは明らかになっていなかった SNX3 mRNA の胎生期から成体に至る詳細な発現パターンの変動を, 時空間的に明らかにした.

### 大脳皮質の発生及び神経突起伸長における SNX12 の役割に関する検討

N1E-115 細胞に GSK-3 $\beta$  阻害剤を添加したところ, SNX3 と同じ SNX<sup>PX</sup> グループに分類され, かつ SNX3 と最も相同性の高い SNX12 の mRNA 発現量が, 添加後 6 時間から増大し, 36 時間には約 2.5 倍に増大することが明らかになった. この結果より, N1E-115 細胞において, SNX3 と同様に SNX12 も GSK-3 $\beta$  の下流に存在し, 神経突起伸長に関与している可能性が示された. そこで本章では, SNX12 の神経突起伸長過程における関与と, マウスにおける SNX12 の発現パターンを解析した.

成体マウスの SNX12 タンパク質の発現をイムノブロット法により組織ごとに解析したところ, SNX12 は心臓, 肝臓, 腎臓等の末梢組織では発現が認められなかった一方, 中枢神経系に高く発現していることが分かった. また, 大脳皮質における SNX12 の発現を免疫染色により検討した結果, SNX12 は NeuN 陽性細胞で発現していたことから, SNX12 は神経細胞に発現していることが明らかとなった. さらに, 胎生期のマウス大脳皮質において, SNX12 は E12.5 から発現が認められ, その後, 神経突起伸長が盛んになる E18.5 をピークに発現が増大した. 免疫染色の結果, SNX12 は VZ よりも CP で強く発現しており, さらに SNX12 は CP において, Tuj-1 陽性細胞で強く発現していた. 発生過程の大脳皮質では, VZ から CP へ移動した細胞分裂後の神経細胞で突起伸長が起こることを勘案すると, SNX12 は CP において, これら神経細胞の突起伸長に関与している可能性が考えられた.

そこで, ラット初代培養大脳皮質神経細胞において, 神経突起伸長時における SNX12 発現の変化を RT-PCR 法及びイムノブロット法で解析したところ, 培養後 6 日では, SNX12 mRNA は約 2.3 倍に, SNX12 タンパク質は約 4.7 倍に増大した. この結果から, SNX12 は大脳皮質神経細胞の突起伸長時に発現が増大することが示された. また, SNX12 を siRNA の導入によりノックダウンしたところ, 神経突起の数には変化が見られなかったが, 一方, 最も長い神経突起の伸長が有意に抑制された. この結果から, SNX12 は神経突起伸長作用に必要なタンパク質の 1 つであることが示唆された.

以上のごとく, 本研究において申請者は, 細胞内輸送を担う新たなタンパク質ファミリー分子 SNX につき, SNX3 及び SNX12 が神経突起伸長に関与することを明らかにした. また, マウスにおける SNX3 及び SNX12 の発現パターンを詳細に検討し, 胎生期から成体に至るまで, 様々な組織で多様な発現パターンを示すことを示した. 以上のごとく本研究は SNX が神経突起伸長に果たす役割につき, 新たな神経薬理学・神経生化学的知見を加えるものであり, 博士 (薬学) の学位に相応しいものと判定した.