

論文の内容の要旨

論文題目 Roles of ACF7, a large linker protein interacting with both microtubules and filamentous actin, in dendrite morphogenesis and postsynaptic maturation

(樹状突起の形態形成及びシナプス後部制御における細胞骨格相互結合タンパク質 ACF7 の機能解析)

柏木 有太郎

神経細胞は誕生後にその形態を劇的に変化させ、典型的には一本の長い軸索と複数本の比較的短い樹状突起を形成する。アクチンは神経突起の先端部に集積して存在し、アクチンが重合することで細胞膜が押し進められて神経突起が伸長する。一方で微小管は神経突起の内部に束ねられて存在し、主に接着分子や膜を輸送する足場として神経突起の伸長に寄与する。アクチンに富んだ神経突起の先端部には一部の動的な微小管が侵入しており、この領域で微小管と繊維状アクチンが相互作用していると考えられている。微小管と繊維状アクチンは細胞骨格結合タンパク質によって物理的に連結されており、これが2つの細胞骨格の協調した動態変化に重要な役割を果たすと考えられている。この微小管-アクチン相互作用は真核細胞に共通して起こる普遍的な現象であるが、神経突起の伸長制御にも必須であることが明らかにされてきた。

シナプス形成後の興奮性神経細胞において、微小管とアクチンは異なった空間的配置を見せる。アクチンは樹状突起スパインと呼ばれる興奮性シナプス後部構造に高度に集積しており、その重合・脱重合はスパインの形態を直接的に変化させる。さらに繊維状アクチンはミオシン依存的な細胞輸送のレールとして、またシナプス後部分子が集積する足場と

して働き、シナプス後部機能の制御に必須の役割を果たす。一方で微小管は主に樹状突起の内部に限局して見られることから、細胞体からシナプス近傍までの細胞輸送のレールとして機能し、間接的にシナプスの発達に寄与するとされてきた。

しかし近年の生細胞タイムラプス観察から、一部の動的な微小管がスパインに短時間侵入することが明らかにされた。Hoogenraad らは、スパインへ侵入する微小管は EB3/p140Cap/Cortactin 経路を介してアクチンの重合を引き起こし、スパインの頭部体積を直接的に増大させると言う仮説を提唱している。しかし Dent らは、可塑性を誘導する刺激に伴ってアクチンが重合し、それに続いてスパインへ侵入する微小管の滞在時間が上昇すると言う別のモデルを提唱している。スパインに存在する微小管は繊維状アクチンと相互作用することで機能し、シナプスの発達に寄与しうると考えられる。しかしスパインにおいて微小管と繊維状アクチンを相互作用させる分子メカニズムは解明されておらず、微小管-アクチン相互作用の機能的意義は未だ不明なことが多い。

微小管とアクチンの両方に結合する特性を持ち、さらに哺乳類の中枢神経系に発現が見られるタンパク質として、私は ACF7 に着目した。ACF7 は N 末端に繊維状アクチン結合ドメイン、C 末端に微小管結合ドメインを持つ分子量の大きな (>600 kDa) 細胞骨格相互結合タンパク質である。ACF7 を欠損した非神経細胞の知見から、ACF7 は2つの細胞骨格を物理的に連結し、微小管の動態を繊維状アクチンと協調させる機能を持つとされる。

ACF7 は脳、肺、皮膚、胃、腎臓など様々な組織で発現している分子であり、ACF7 を全身性に欠損したマウスは胎生致死である。その後、神経系における ACF7 の機能を調べるために Nestin-Cre を用いた神経系特異的な ACF7 欠損マウスが作製された。神経系特異的に ACF7 を欠損したマウスは生後 24~36 時間で死亡するが、このマウスの脳では皮質と海馬における層構造の乱れや脳梁の欠損と言った表現形が見られている。また ACF7 はシナプス後部画分の質量分析でも検出されるタンパク質であり、シナプス後部で機能する可能性が

ある。しかし ACF7 の欠損動物が致死であることから、分化した神経細胞において ACF7 が持つ生理機能の全貌は解明されていない。

本研究で私は分化後の神経細胞において ACF7 が持つ生理機能の解明を目指し、海馬分散培養を用いて ACF7 の発現を制御し、その表現形を解析した。まず ACF7 特異的抗体を用いた Western blotting 法によってタンパク質の発現変化を調べると、出生後の脳において ACF7 の発現は大腦、小脳、海馬のいずれにおいても生後一週間で最も高く、その後減少するが生後四週まで継続していた。次に神経突起成長時の海馬分散培養における ACF7 の分子局在を免疫染色法によって検証すると、神経突起の先端や成長円錐において、微小管と繊維状アクチンの境界部に ACF7 が局在していた。そこで神経突起の形成における ACF7 の機能を明らかにするため、発達初期の神経細胞にベクター性の shRNA を導入して ACF7 の発現を抑制したところ、樹状突起の伸長が著しく阻害された。

次にシナプス形成後の神経細胞における ACF7 の分子局在と機能に着目した。まず脳を分画して Western blotting したところ、ACF7 は細胞質に存在し、さらに Triton X-100 不溶性のシナプス後部画分にも存在していた。また海馬分散培養の免疫染色から、ACF7 はシナプス後部に集積し、スパインの内部に局在することが明らかにされた。そこでシナプスの発達における ACF7 の機能を明らかにするために、樹状突起形成後の神経細胞にベクター性の shRNA を導入して ACF7 の発現を抑制すると、頭部が細く小さい未熟な形態をしたスパインが多く見られ、また興奮性シナプス後部マーカーである PSD-95 が減少した。

本研究によって ACF7 が樹状突起の形態形成を促進し、またシナプス後部の発達を促進する分子であることが新たに明らかにされた。細胞骨格相互結合タンパク質 ACF7 がシナプス後部に局在して機能することを見出した本研究の成果は、微小管-アクチン相互作用がシナプスの発達に与える影響を理解する上で新たな知見を提供するものである。