

学位論文題名

Cellular and molecular mechanisms  
of neuronal differentiation

(ニューロンの神経分化制御機構)

学位論文内容の要旨

脳には多数のニューロンが存在するが、それぞれは単独では意味が無く、ニューロン同士がシナプス結合を介した神経回路を形成することで初めて本来の機能を発揮できる。神経回路の形成は、ニューロンが闇雲に神経突起を伸長させることでは不十分で、特定のニューロンの神経突起が、遠隔にある特定の標的細胞に正確に投射することで達成される。脳の発生過程において、このような複雑かつ秩序だった神経回路がどのように形成されるのかは、現代の神経科学分野における最重要課題の一つである。そこで本研究では、培養ニューロンを用い、発生中のニューロンの神経分化機構について、特に神経突起形成機構に着目して解析した。さらには、完成した神経回路上での情報表現機構についても解析を行った。

神経分化機構を解析するための実験材料として、雑種神経細胞株NG108-15を用いた。NG108-15は、通常の培養液中では未分化な状態(神経芽細胞)であるが、細胞内cAMP濃度を上昇させると、増殖を止め多くの神経突起を伸長しニューロンに分化する。このように分化段階を人為的に制御できること、さらには培養皿内の細胞全てが単一のクローンなので生化学的に定量的な実験が容易なことから、NG108-15は神経分化機構を研究する上で好都合である。

はじめに、神経分化誘導されたNG108-15を形態学的に解析した。細胞表面の極微細形態を詳細に検討するために、原子間力顕微鏡観察を行った。原子間力顕微鏡は、鋭く尖った探針で試料表面をなぞることで試料の3次元形態をナノメートルの分解能で観察できる。しかしながら、原子間力顕微鏡による生物試料の観察は歴史が浅いので、得られた像の信頼性・妥当性を検証する必要性があった。そこで、第1章と第2章においては、原子間力顕微鏡観察のための試料作成法の開発と、得られた原子間力顕微鏡像と走査型電子顕微鏡像との詳細な比較検討を行った。その結果、原子間力顕微鏡を用いれば、走査型電子顕微鏡観察に必須な金属コーティングが必要無いため、より正確な細胞表面の極微細形態が観察できることが明らかになった。その上で、第3章においては、神経分化誘導されたNG108-15のプレシナプスに存在するシナプス小胞開口放出部位の極微細内部構造の観察に成功した。開口部は放射状の構造をしており、内部には直径数十ナノメートルの隆起が数個観察された。この結果は、ニューロンの神経伝達物質放出の分子機構を解明する上で重要な形態学的知見を提示するものである。

併せて第3章においては、電気生理学的手法・各種イメージング法を用いて、NG108-15における生理機能を解析した。その結果、神経分化したNG108-15においては、自発性の微小シナプス電流が検出されること、脱分極刺激に応じて細胞内カルシウム濃度の上昇が見られること、シナプス小胞膜のリサイクルが起こること等の、ニューロンに特有の生理機能が備わっていることが明らかになった。

続いて第4章においては、イムノブロット法・免疫細胞化学染色法・RT-PCR法を用いて、

神経分化誘導されたNG108-15におけるニューロン特異的蛋白質の発現を解析した。その結果、神経分化誘導されたNG108-15においては、MAP2・シナプトファイシン・シンタキシン1・コリンアセチルトランスフェラーゼ・電位依存性カルシウムチャンネル等の、ニューロン特異的な蛋白質が新たに発現することが明らかになった。その一方で、未分化な細胞では、これらの蛋白質の発現は見られなかった。

以上の結果から、神経分化誘導されたNG108-15のモデルニューロンとしての有用性が明らかになったので、第5章・第6章では、神経回路形成において最も重要な現象の一つである神経突起形成制御機構を薬理的・生化学的に解析した。第5章においては、代表的な2つのセカンドメッセンジャーであるcAMPとカルシウムに着目した。まずはじめに、7日間強制的に細胞内cAMP濃度を上昇させることによって、神経突起の数が有意に増加することを確認した。続いて、脱分極刺激に応じた電位依存性カルシウムチャンネルからのカルシウム流入により、この神経突起の増加が有意に抑制されることを明らかにした。ところで、神経突起形成のような細胞の形態形成には、細胞骨格蛋白質であるアクチンが重要な役割を果たしている。そこで第6章では、cAMP・カルシウムの下流における細胞骨格蛋白質アクチンの動態制御機構について解析した。まず、アクチン重合阻害剤処理によって、cAMP誘導性の神経突起形成が抑制されることを確認した。また、cAMPの下流では、LIMキナーゼ1の発現が促進されていた。一方、カルシウムの下流においては、カルシウム依存的脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを経由して、LIMキナーゼ1の発現が抑制されることが明らかになった。LIMキナーゼ1は、アクチン結合蛋白質コフィリンの特異的なリン酸化酵素である。そこで次に、コフィリンのリン酸化状態を2次元電気泳動法を用いて確認したところ、LIMキナーゼ1の発現量に依存してリン酸化を受けることが明らかになった。コフィリンは、リン酸化を受けることでアクチンモノマーとの結合能を失い、その結果としてアクチンの重合が促進されることが知られている。これらの結果を総合すると、(1) cAMPの下流では、LIMキナーゼ1の発現が促進され、コフィリンがリン酸化状態に移行することでアクチンの重合が進み、神経突起の形成が促進される。(2) その一方で、カルシウムの下流では、カルシニューリンを経由してLIMキナーゼ1の発現が抑制され、コフィリンが脱リン酸化状態に移行することでアクチンの脱重合が進み、神経突起の形成が抑制される、という2つのセカンドメッセンジャーによる2方向性の神経突起形成制御機構が明らかになった。

最後に、第7章においては、ラット大脳皮質初代培養ニューロンを用いて、完成した神経回路中での情報表現機構を解析した。この実験系では、培養されたニューロン同士は培養日数の経過と共に多数のシナプスを形成し、自発的な神経活動を同期的に発生するようになる。この自発的な神経活動を回路全体の情報表現としてモニターし、シナプスレベルでの可塑的变化がネットワーク全体に与える影響を調べた。実験方法としてカルシウムイメージング法を用い、神経回路内のニューロンの電氣的活動を多点同時測定した。シナプスレベルでの可塑的变化を引き起こす薬物としては、アセチルコリンを用いた。自発的カルシウム振動を起こしている回路にアセチルコリンを投与したところ、振動の周波数がプレパレーションごとに変化することを発見した(増加・減少・不変)。この結果は、同一の入力によっても回路ごとに異なる情報処理を行うことを示すものであり、シナプスレベルでの可塑的变化とネットワーク上での情報表現との関係を明らかにする上での重要な手がかりになるものと考えられる。

以上の一連の研究結果は、神経回路形成における最も重要な現象の一つである神経突起形成機構の解明に大きな貢献を果たすものである。また、実際に完成した神経回路上での情報表現機構の解明に対しても重要な示唆を与えるものである。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 浦野 明 央  
副査 教授 小池 達 郎  
副査 教授 高畑 雅 一  
副査 助教授 伊藤 悦 朗

学位論文題名

## Cellular and molecular mechanisms of neuronal differentiation

(ニューロンの神経分化制御機構)

脳には多数のニューロンが存在するが、それぞれは単独では意味が無く、ニューロン同士がシナプス結合を介した神経回路を形成することで初めて本来の機能を発揮できる。神経回路の形成は、ニューロンが閼雲に神経突起を伸長させることでは不十分で、特定のニューロンの神経突起が、遠隔にある特定の標的細胞に正確に投射することで達成される。脳の発生過程において、このような複雑かつ秩序だった神経回路がどのように形成されるのかは、現代の神経科学分野における最重要課題の一つである。そこで本論文は、培養ニューロンを用い、発生中のニューロンの神経分化機構について、特に神経突起形成機構に着目して解析した。さらには、完成した神経回路上での情報表現機構についても解析を行った。

神経分化機構を解析するための実験材料として、雑種神経細胞株NG108-15を用いた。はじめに、神経分化誘導されたNG108-15を形態学的に解析した。細胞表面の極微細形態を詳細に検討するために、原子間力顕微鏡観察を試みた。しかし、原子間力顕微鏡による生物試料の観察は歴史が浅いので、得られた像の信頼性・妥当性を検証する必要性があった。そこで、第1章と第2章においては、原子間力顕微鏡観察のための試料作成法の開発と、得られた原子間力顕微鏡像と走査型電子顕微鏡像との詳細な比較検討を行った。その結果、原子間力顕微鏡を用いれば、走査型電子顕微鏡観察に必須な金属コーティングが必要無いため、より正確な細胞表面の極微細形態が観察できることが明らかになった。その上で、第3章においては、神経分化誘導されたNG108-15のプレシナプスに存在するシナプス小胞開口放出部位の極微細内部構造の観察に成功した。

併せて第3章においては、電気生理学的手法・各種イメージング法を用いて、NG108-15における生理機能を解析した。その結果、神経分化したNG108-15においては、自発性の微小シナプス電流

が検出されること、脱分極刺激に応じて細胞内カルシウム濃度の上昇が見られること、シナプス小胞膜のリサイクルが起こること等の、ニューロンに特有の生理機能が備わっていることが明らかになった。

続いて第4章においては、イムノブロット法・免疫細胞化学染色法・RT-PCR法を用いて、神経分化誘導されたNG108-15におけるニューロン特異的蛋白質の発現を解析した。その結果、神経分化誘導されたNG108-15においては、MAP2・シナプトファイシン等の、ニューロン特異的な蛋白質が新たに発現することが明らかになった。

以上の結果から、神経分化誘導されたNG108-15のモデルニューロンとしての有用性が明らかになったので、第5章・第6章では、神経突起形成制御機構を薬理的・生化学的に解析した。第5章においては、代表的な2つのセカンドメッセンジャーであるcAMPとカルシウムに着目した。まずはじめに、7日間強制的に細胞内cAMP濃度を上昇させることによって、神経突起の数が有意に増加することを確認した。続いて、脱分極刺激に応じた電位依存性カルシウムチャネルからのカルシウム流入により、この神経突起の増加が有意に抑制されることを明らかにした。続いて第6章では、cAMP・カルシウムの下流における細胞骨格蛋白質アクチンの動態制御機構について解析した。まず、アクチン重合阻害剤によって、cAMP依存的な神経突起の形成が抑制されることを確認した。また、カルシウムの下流においては、カルシニューリンを経由して、LIMキナーゼ1の発現が抑制されることが明らかになった。LIMキナーゼ1は、アクチン結合蛋白質コフィリンの特異的なリン酸化酵素である。そこで次に、コフィリンのリン酸化状態を2次元電気泳動法を用いて確認したところ、LIMキナーゼ1の発現量に依存してリン酸化を受けることが明らかになった。これらの結果を総合すると、(1) cAMPの下流では、LIMキナーゼ1の発現が促進され、コフィリンがリン酸化状態に移行することでアクチンの重合が進み、神経突起の形成が促進される。(2) その一方で、カルシウムの下流では、カルシニューリンを経由してLIMキナーゼ1の発現が抑制され、コフィリンが脱リン酸化状態に移行することでアクチンの脱重合が進み、神経突起の形成が抑制される、という2方向性の神経突起形成制御機構が明らかになった。

最後に、第7章においては、ラット大脳皮質初代培養ニューロンを用い、実際に完成した神経回路中の情報表現機構の解析にも着手した。

これを要するに、以上の一連の研究結果は、神経回路形成における最も重要な現象の一つである神経突起形成機構の解明に大きな貢献を果たすものである。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。