



Title	Cellular Function of Fasciculation and Elongation Protein Zeta-1 in Rat Embryo Hippocampal Neuron
Author(s)	生田, 潤子
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47689
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	い く た じゅん こ 生 田 潤 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 20874 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Cellular Function of Fasciculation and Elongation Protein Zeta-1 in Rat Embryo Hippocampal Neuron (ラット胎児海馬神経細胞における神経軸索誘導関連タンパク質 FEZ1 の機能解析)
論文審査委員	(主査) 教 授 谷澤 克行 (副査) 教 授 河村 悟 教 授 岡田 雅人 助教授 黒田 俊一

論 文 内 容 の 要 旨

FEZ1 (Fasciculation and Elongation protein Zeta 1) は脳特異的に発現する約 45 kDa のコイルドコイルタンパク質であり、線虫の神経軸索誘導に必須なタンパク質 UNC-76 と約 63% の相同性を示す。線虫 *unc-76* 変異株に FEZ1 を発現させると、その行動異常並びに神経束形成不全がほぼ完全に回復することから、FEZ1 は UNC-76 の哺乳類オルソログと考えられている。一方、ラット副腎褐色細胞腫由来 PC12 細胞では、神経成長因子 NGF (Nerve Growth Factor) 刺激により FEZ1 の発現が誘導されること、FEZ1 が PKC ζ (Protein Kinase C ζ) と相互作用しリン酸化を受けること、さらに常活性型 PKC ζ 変異体と FEZ1 を共発現させると NGF 非存在下でも神経様突起が有意に伸長することなどから、FEZ1 は哺乳類の神経軸索誘導機構に含まれるシグナル分子と考えられている。また最近では、FEZ1 が微小管の構成タンパク質チューブリンや細胞質から神経突起先端方向への輸送に関わるモータータンパク質キネシンと結合するが、その逆方向の輸送に関わるモータータンパク質ダイニンとは結合しないことも見出されている。そこで、本研究ではさらに段階を進め、ラット胎児海馬神経細胞における FEZ1 の役割を RNA 干渉法 (RNAi) により解析した。

【結果】

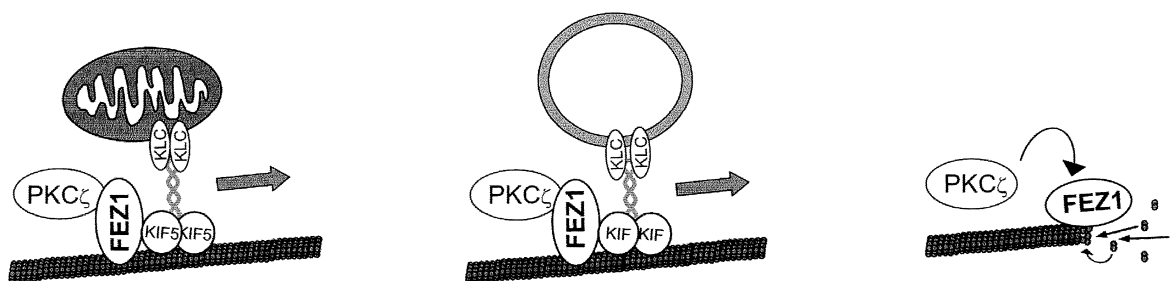
(1) 軸索形成決定過程における FEZ1 の関与：ラット胎児海馬神経の初代培養細胞 (単離後 3-4 日目 [DIV3-4]) の内在性 FEZ1 は、抗 FEZ1 抗体を用いる免疫染色法により、細胞質と神経突起の先端に顆粒状に局在することが判明した。次いで、軸索マーカー tau1 及び樹状突起マーカー MAP2 で免疫染色し、約 90% のニューロンに複数本の樹状突起と 1 本の軸索が特定できた。さらに、内在性 FEZ1 の発現を抑制する RNAi (FEZ1 RNAi) を発現するプラスミドを導入したニューロンを解析したところ、約 60% の細胞には tau1 抗体で染色される神経突起 (軸索) が存在しなかった。これらの結果から、FEZ1 はニューロンの軸索形成の決定に重要な役割を担っていることが示唆された。

(2) ミトコンドリア輸送における FEZ1 の関与：神経細胞が神経突起を伸長させ、極性を形成するためには神経突起先端へのエネルギー供給が必須である。ラット胎児海馬神経細胞 (DIV3-4) を蛍光色素 DsRedmito で処理し、FEZ1 RNAi を発現するニューロンの神経突起に存在するミトコンドリアの移動速度を蛍光顕微鏡で Time-lapse 解析した

結果、細胞質から神経突起先端への移動 (anterograde movement) 速度は通常では約 $0.65 \mu\text{m}/\text{秒}$ のところが、FEZ1 RNAi 細胞では約 $0.40 \mu\text{m}/\text{秒}$ に減速していたが、逆方向の移動速度は変化していなかった。一方、内在性 FEZ1 は神経突起においてミトコンドリアと部分的に共局在していた。また、通常のニューロンではミトコンドリアは細胞全体に顆粒状に存在しているが、FEZ1 RNAi ニューロンのミトコンドリアは細長く変形しているように観察され、その長径は通常ミトコンドリアと比較して約 1.6 倍であった。以上から、FEZ1 は、キネシンを介したミトコンドリア輸送とともにミトコンドリア同士の融合にも関与することが明らかになった。

【考察】

以上の結果から、FEZ1 は、①ニューロンの分化前期から中期において、細胞質内でキネシン、チューブリン、PKC ζ と相互作用してミトコンドリアの anterograde movement を促進し、同時にミトコンドリア同士の過度の融合を抑制すると考えられる。その結果、細胞質～神経突起内のミトコンドリアの流動性が高まり、神経突起伸長に必要なエネルギーの供給が促されると推定される。また、FEZ1 は、②シナプス小胞など他の細胞内小器官の輸送や、③微小管形成にも関与することにより、ニューロン分化前期の軸索決定に重要な役割を担っている可能性がある。



① Mitochondrial transport

② Other organelle transport

③ Microtubule polymerization

論文審査の結果の要旨

生田潤子さんは、神経の軸索誘導に不可欠で、線虫の UNC-76 タンパク質の哺乳類オルソログである FEZ1 タンパク質に関して、ラット胎児の海馬神経細胞を対象として RNA 干渉法を用いる機能解析を行った。その結果、哺乳類神経細胞の分化初期における軸索決定に内在性 FEZ1 が必須であることを直接証明することに成功した。また、ラット胎児海馬神経細胞では FEZ1 はミトコンドリアとは完全に共局在しないが、ミトコンドリアの軸索先端部への輸送に深く関与することを示した。すなわち、FEZ1 は伸長中の神経様突起において、プロテインキナーゼ C ζ 、モータータンパク質キネシン、チューブリンと複合体を形成し、ミトコンドリアを含む様々なオルガネラや物質の移動を促進していることが示唆された。以上から、神経細胞の軸索決定、ミトコンドリアの軸索先端部への輸送、微小管形成の促進など、FEZ1 はラット胎児海馬神経細胞において幅広い機能を有すると考えられた。本研究の成果は、神経細胞の高次構造形成の根幹をなす軸索誘導の新しい機構の発見である。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。