

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 世木 直喜

論 文 題 目

Close association of polarization and LC3, a marker of autophagy,
in axon determination in mouse hippocampal neurons

(マウス海馬ニューロンの軸索決定における分極とオートファジー・マーカーLC3の密接な関連性)

論文審査担当者 名古屋大学教授

主 査 委員 岡島 徹也
名古屋大学教授

委員 宮田 卓樹
名古屋大学教授

委員 勝野 雅央
名古屋大学教授

指導教授 今釜 史郎

論文審査の結果の要旨

本研究はニューロンの軸索決定におけるオートファジーの関与を検討したものである。筆者らはマウス胎児由来の海馬ニューロンおよびオートファジーのマーカーである LC3 を利用した。免疫細胞化学により LC3 の軸索決定前ニューロン内偏在を示し、GFP-LC3 ニューロンの生細胞イメージングにより単一の突起における GFP-LC3 シグナルの急激な増大、その後の突起伸長を示した。また、トレハロースによってオートファジーを活性化し、最長突起の伸長が有意に促進されること、Tau の polarity index により最長突起が有意に軸索の性質を持つこと、さらにオートファゴソームとリソソームの融合阻害剤であるバフィロマイシン A1 によってこの効果が打ち消されることを示した。

本研究に対し、以下の点を議論した。

1. RNA 干渉を利用したオートファジー関連分子のサイレンシングによる実験系を検討したが、分散培養ニューロンの軸索決定はおよそ 48 時間後には達成されており、サイレンシング発現に先立つため有用な結果が得られないと考えられた。このため、オートファジー関連分子のノックアウトと、GFP-LC3 トランスジェニックなどの複数の遺伝子改変に基づいた実験系が必要であると考えられ、今後の課題である。

2. オートファジー必須分子である Atg5 について、神経特異的 Atg5 ノックアウトマウスは生後一定期間ほぼ正常な神経機能を有すると考えられていることから、オートファジーは代替不能な軸索決定因子ではないと考える。オートファジーはこれまでに同定されてきた軸索決定因子に対して協力的にはたらいて軸索を決定することが第一に考えられる。

3. 大脳皮質分散培養によるニューロンの観察では同様の結果が得られた一方で、後根神経節ニューロンの観察では GFP-LC3 シグナルと突起伸長の間の相関関係は明らかではなかった。中枢神経系と末梢神経系、運動ニューロンと感覚ニューロンなどの差異が、影響を及ぼす因子として考えられる。

4. 透過型電子顕微鏡により神経突起中の多数のオートファゴソームの存在が確認できたが、未熟ニューロンの神経突起はきわめて微細で複数の突起を同時に観察することが困難であったため、突起間での分布を検討できなかった。FIB-SEM (Focused Ion Beam Scanning Electron Microscope) による観察では、突起の厚みは 100nm 未満であることが示され、同様にオートファゴソームの分布を示すことは困難であった。本研究は、ニューロンの軸索決定におけるオートファジーの関与について重要な知見を提供した。

以上の理由により、本研究は博士（医学）の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第	号	氏 名	世木 直喜
試験担当者	主査	岡島 徹也	副査 ₁	宮田 卓樹
	副査 ₂	勝野 雅央	指導教授	今釜 史郎
(試験の結果の要旨)				
<p>主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none">1. オートファジー開始を不活化する実験系について2. オートファジーは直接的に軸索決定をもたらすのか3. 海馬以外のニューロンについて4. 電子顕微鏡によるオートファゴソームの観察について <p>以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、整形外科学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。</p>				