

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Visualization of the zebrafish retinotectal projection and the role of GSK-3 β

和 訳 ゼブラフィッシュ網膜視蓋投射の可視化および GSK-3 β の役割

指導教官 三品昌美 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 徳岡宏文

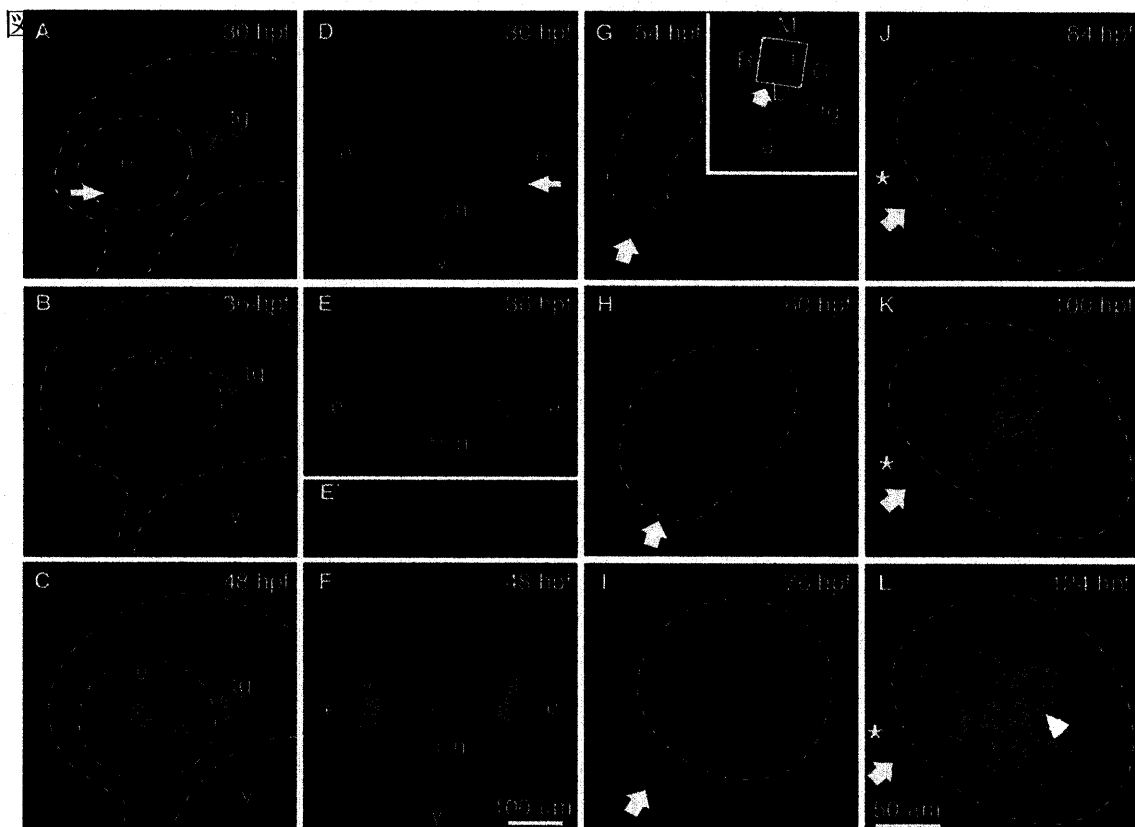
[序論]

脳の神経回路は、神経細胞が軸索・樹状突起を発達させ、これらがシナプスにより結合することで形成される。しかし、軸索・樹状突起の分枝形成やシナプス形成の分子機構はほとんど分かっておらず、特に生体内における知見は非常に乏しい。本研究では、生体内でシナプス形成の分子機構を解析するため、ゼブラフィッシュの網膜視蓋投射系に注目した。ゼブラフィッシュは胚が透明なため神経回路のイメージングに適し、また神経発生が早い。網膜視蓋投射系では、網膜神経節細胞 (RGC) の軸索と中脳視蓋神経細胞の樹状突起がシナプスを形成する。この系は、投射地図がトポグラフィックに形成されることや神経活動依存的なシナプス形成・除去が行われることから、中枢神経系の回路形成の分子機構を解析するのに優れている。

本研究では Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) に注目した。GSK-3 β はセリン/スレオニン・キナーゼであり、転写因子 β -catenin、微小管結合蛋白 MAP1B、Tau など多くの蛋白をリン酸化する。また、GSK-3 β は増殖因子から phosphatidylinositol3-kinase (PI3K)、Akt/PKB により介されるシグナルと、Wnt シグナルの 2 つのシグナルにより制御を受ける。これらの事から GSK-3 β は細胞の中で様々な役割を担っていると考えられている。GSK-3 β は脳に多く発現し、ラット脳では生後 20 日頃まで特に多く、これは神経回路形成が盛んに進む時期と重なる。培養神経細胞では、GSK-3 β の阻害剤であるリチウム (Li⁺) により、軸索微小管の再編成、またシナプス小胞タンパクであるシナプシン I の集積が起きることが報告されている。しかし in vivo 中枢神経系の回路形成における機能は依然として不明である。そこで、本研究ではまず RGC 特異的に遺伝子操作を行う系の開発を行い、RGC の軸索の可視化・観察を試みた。さらにその系を用いて GSK-3 β の神経回路形成における役割を調べた。

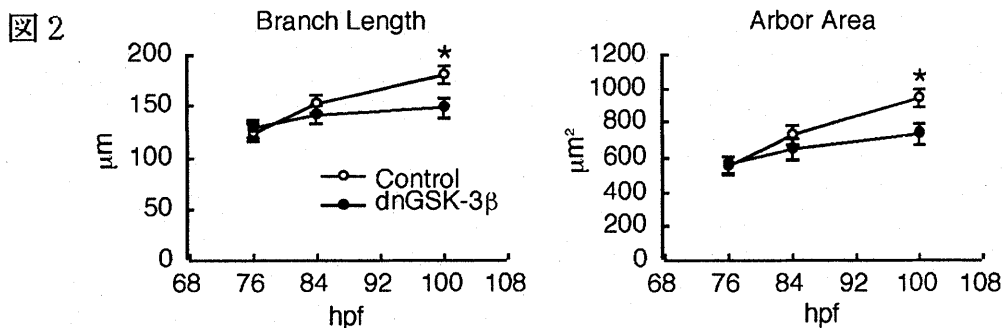
[結果]

まず網膜神経節細胞において遺伝子操作を行うため、RGC 特異的なプロモーターを検討した。ニコチン性アセチルコリン受容体 $\beta 3$ サブユニット (nAChR $\beta 3$) はキンギョ、ニワトリで RGC および他少数の組織にほぼ特異的に発現することが報告されていたため、そのゼブラフィッシュ相同遺伝子をクローニングした。予想翻訳開始点の 5' 上流 3.8 kb 配列の制御下で enhanced green fluorescent protein (EGFP) を発現させるベクターを受精卵に微量注入し、6つのトランスジェニック・ゼブラフィッシュのラインを得た。いずれも主に RGC、および三叉神経核、Rohón-Beard 感覚神経細胞において EGFP の強い発現が見られた。作成したトランスジェニック・ゼブラフィッシュを用い、視神経の発達を共焦点レーザー顕微鏡により観察した (図 1)。網膜における EGFP の発現は 30 hpf (hours postfertilization、受精後時間) より、鼻-腹側の一部の細胞から始まり、48hpf には神経節細胞層全体で発現が見られた (図 1 A-F)。視神経は 36hpf には先端が視交差を抜けて (図 1 E') 46 hpf には視蓋へ到達し、54 hpf には複数の軸索の視蓋への進入が確認された (図 1 G)。さらに、視蓋における視神経終末の発達を観察した所、54 hpf、から 84 hpf にかけては軸索の数が増え尾側内側方向へと活発に進展し、分枝が進んだ (図 1 G-J)。その後 84hpf 以後は発達がゆっくりとなる事が分かった (図 1 J-L)。また軸索終末の形態は視蓋において一様ではなく、側方では一部の軸索が bundle を形成していることが分かった。



さらに軸索終末を詳しく観察するため、発現ベクターを受精卵に微量注入し、低効率な一過性発現の条件下で少数の RGC を標識したところ、個々の軸索終末の分枝が観察できた。

可視化した少数の RGC で GSK-3 β の機能を操作するため、nAChR β 3 プロモーター制御下で EGFP を発現するベクターと GSK-3 β のキナーゼ活性を欠損させたドミナントネガティブ変異体 (dnGSK-3 β) を発現するベクターを結合し (ダブルカセットベクター)、受精卵に微量注入し、76、84、100 hpf において軸索終末の分枝を観察した。EGFP のみを発現させたコントロールの RGC ではこの時期に軸索終末の分枝が広がり発達した。一方 dnGSK-3 β 発現ベクターを導入したRGCでは、分枝の発達が低下した。分枝の形態の定量的評価のため、総ての分枝の長さの合計 (総分枝長)、分枝範囲の面積 (最初の枝分かれから、分枝の端を凸状に直線でつないだ多角形の面積)、分枝の数を測定した。dnGSK-3 β により、総分枝長は経時的に影響を受け、76 hpf ではコントロールと同程度の長さであったが、100 hpf においては低下した (図 2 左)。同様に分枝範囲の面積についても 76 hpf では差を示さず、100 hpf において低下した (図 2 右)。分枝の数に有意な違いは認められなかった。



次に、軸索終末の分化を調べるため、シナプス小胞蛋白である vesicle-associated membrane protein (VAMP2) と EGFP の融合蛋白 (VAMP2-EGFP) を用いて観察を行った。VAMP2-EGFP の集積を評価するため、個々の軸索上で varicosity 状のシグナルのない shaft 部分の輝度の 4 倍を閾値とし、それ以上の強度の点を puncta とした。VAMP2-EGFP のみを発現させたコントロールの軸索では puncta の大きさ、数ともに 76 hpf から 84、100 hpf とかけて増加が見られた。dnGSK-3 β の発現により、76 hpf, 84 hpf において puncta の大きさの増加が見られたが、100 hpf ではコントロールとほぼ同じ値であった。一方、puncta の数はコントロールと同程度の経時的増加を示した。

[考察]

本研究では、ゼブラフィッシュ網膜視蓋投射において前シナプス側となる、RGC 特異的に遺伝子操作する系を開発した。トランスジェニック・ゼブラフィッシュを用いて観察した RGC の発生、軸索の投射の時間経過や投射経路は、以前に DiI や horse

radish peroxidase (HRP)による観察報告とほぼ一致し、本研究の発現系は視神経軸索の発達を研究する上で優れた系であることが示された。さらに視蓋における軸索終末の発達を連続的に観察することが初めて可能となり、軸索終末の発達は初め活発であるが30時間ほどでゆっくりとなること、軸索終末の形態は一様ではなく一部の軸索が bundle を形成していることが新たに分かった。また、ダブルカセット・ベクターと、微量注入による低効率での発現系を用い、少数の軸索終末の発達を経時的に観察すると共に、機能分子の役割を調べることが可能となった。この発現方法は組織特異的であり、また組織へのダメージが少ないという点で優れている。

RGC の軸索はトポグラフィーを持った投射地図を形成するために、分枝することでそれぞれの投射野を形成する。dnGSK-3 β は軸索終末の分枝の発達を抑制したが、この効果は分枝発達初期の76 hpf では認められず後の100 hpf で見られた。このことは、dnGSK-3 β は単に軸索の伸長を抑制したのではなく、GSK-3 β の活性が視神経終末の分枝発達を制御していることを示唆する。

VAMP2-EGFP を用いた観察により、dnGSK-3 β は VAMP2-EGFP の puncta の大きさを分枝発達の初期の段階(76, 84 hpf)で増加させたが、数には影響を与えなかった。このことは GSK-3 β の抑制がシナプス小胞の集積を促すことを示唆する。以上のことから、GSK-3 β の活性は軸索終末の分枝発達に必要であること、逆に GSK-3 β の活性抑制は分枝発達を抑制し、前シナプスの分化を促進することが示唆された。

【結論】

本研究により、ゼブラフィッシュ網膜視蓋投射系において前シナプス側である網膜神経節細胞特異的に遺伝子操作する系を開発し、軸索の発達を GFP により in vivo で可視化することが出来た。また脊椎動物中枢神経系において、GSK-3 β が軸索終末の分枝発達およびシナプス小胞の集積を制御することが示唆された。