

審査の結果の要旨

氏名 徳岡 宏文

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、網膜神経節細胞 (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。下記の結果を得ている。

1. RGC 特異的なプロモーターとして、ニコチン性アセチルコリン受容体 $\beta 3$ サブユニット (nAChR $\beta 3$) 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、Rohon-Beard 感覚神経細胞において EGFP の強い発現が見られた。
2. 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。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。視神経は 36hpf には先端が視交差を抜けて 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。さらに、視蓋における視神経終末は、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。その後 84hpf 以後は発達がゆっくりとなった。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わかった。
3. 可視化した少数の RGC で GSK-3 β の機能を操作するため、nAChR $\beta 3$ 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た。76、84、100 hpf において、軸索終末の分枝を、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）、分枝の数の3点について測定した。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。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。分枝の数に有意な違いは認められなかった。

4. 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) を用いて軸索終末の分化の観察を行った。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。

以上、本論文は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EGFP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。

本研究はこれまであまり行われてこなかった、生体内での軸索分枝・シナプス形成の分子機構を解析するための実験系を確立し、GSK-3 β の役割の一端を明らかにしたものであり、中枢神経系における神経回路形成機構の解明に重要な貢献を成すと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。