

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 : **Regulation of neural circuit formation in zebrafish
olfactory system by protein phosphorylation**

タンパク質リン酸化によるゼブラフィッシュ嗅神経回路網形成の制御

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 11 年 4 月 入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 : 吉田 知之

タンパク質リン酸化によるゼブラフィッシュ嗅神経回路網形成の制御機構について、嗅神経細胞の軸索誘導過程と軸索終末の分化過程に分けて 2 部構成とした。

1. Regulation by Protein Kinase A Switching of Axonal Pathfinding of Zebrafish
Olfactory Sensory Neurons through the Olfactory Placode-Olfactory Bulb Boundary

誘引、反発分子による軸索誘導は神経回路網形成において重要な役割を担っている。しかし、誘引、反発分子に対する感受性を制御する成長円錐内の情報伝達機構についてはほとんど解明されていない。そこで、嗅神経の軸索誘導における A キナーゼ(PKA)の役割を透明なゼブラフィッシュ胚を用いて解析した。嗅神経細胞特異的な OMP プロモーターに tauGFP を繋いだレポーターカセットと OMP プロモーターに優性変異型 PKA を繋いだエフェクターカセットを同一 DNA 断片上に繋ぎ合わせてゼブラフィッシュ胚に微量注入することによって、PKA シグナルの変化が嗅神経細胞の軸索誘導に与える影響を可視化する

ことができた。恒常活性型 PKA による機能亢進は嗅上皮嗅球境界近傍の嗅球内で局所的に軸索の湾曲を促進させたのに対して、恒常不活性型 PKA による機能抑制は嗅上皮内で湾曲を促進させた。更に、恒常不活性型 PKA を発現する嗅神経細胞の一部は軸索を嗅上皮嗅球境界を越えて嗅球側へ伸ばすことができなかった。これらの結果より、軸索誘導時に嗅神経細胞内で PKA シグナルのスイッチが起こることが示唆された。PKA シグナルのスイッチは軸索が嗅上皮嗅球境界を通過できるように、誘導分子に対する感受性を調節すると考えられた。

2. Dual Signaling for the Axon Terminal Differentiation of the Zebrafish Olfactory Sensory Neurons

成長円錐はガイダンスによって標的まで到達し、神経伝達物質放出を担う前シナプスへと分化する。この軸索終末の分化にはシナプス小胞の集積、アクティブゾーン形成、細胞骨格、膜構造の再構成など特徴的な変化を伴うことが知られている。軸索終末の成熟、分化の調節機構を明らかにするために、ゼブラフィッシュ嗅神経細胞軸索終末の成熟過程におけるカルシニューリンと A キナーゼシグナルの役割について解析した。これらの分子の遺伝子導入を行わない嗅神経軸索の軸索終末を Growth-associated protein (GAP)43-EGFP 融合タンパク質で可視化すると、軸索が伸長している受精後 36 時間と嗅球内の標的近傍で伸長をとめた直後の 60 時間には多くの突起を出した複雑な形態を示した。ところが嗅球上に糸球体構造が明確に形成される受精後 84 時間になると軸索終末の形態は突起が少ない簡単な構造へと変化した。また、嗅神経軸索終末におけるシナプス小胞の集積をマーカー分子である Vesicle-associated membrane protein (VAMP)2-EGFP 融合タンパク質でモニターすると、受精後 36、60、84 時間と徐々に数とその大きさが増加することが分かった。これらの経時的な変化は軸索終末の分化のよい指標になると考えられた。

恒常活性型カルシニューリンを嗅神経細胞に発現させると軸索終末の形態は受精後 60 時間ですでに突起の少ない簡単な構造へと変化する事が分かった。またカルシニューリン阻害薬であるサイクロスポリン A が受精後 60 時間から 84 時間にかけて起こる軸索終末の構造変化を妨げることが分かった。一方、恒常活性化型 A キナーゼを発現させた軸索終末は受精後 36 時間と 60 時間におい

てより複雑な構造をとるが、84 時間には単純な構造へと変化した。

恒常活性型 A キナーゼは受精後 36 時間において嗅神経軸索終末への VAMP2-EGFP シグナルの集積を増加させた。また恒常不活性型 A キナーゼは受精後 60 時間、84 時間において VAMP2-EGFP の集積を阻害した。しかしながら恒常活性型カルシニューリンは VAMP2-EGFP シグナルの集積には影響を与えなかった。これらのことから成長円錐の形態の成熟と終末におけるシナプス小胞の成熟はカルシニューリンシグナルと A キナーゼシグナルによって別々に制御されることが示された。従って神経終末の分化成熟にはカルシニューリンシグナルと A キナーゼシグナルの協調的な活性化が重要であると考えられた。