

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 吉田 知之

本研究は *in vivo* における神経回路網形成の分子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の軸索誘導と終末分化の過程を可視化し、同時にこれらの過程における種々のエフェクター分子の影響を見たものであり、以下の結果を得ている。

1. ゼブラフィッシュ嗅神経細胞特異的な *omp* プロモーター制御下に *tauEGFP* を発現するトランスジェニックフィッシュを作成し、嗅神経細胞の投射過程を可視化し、軸索誘導のタイムコースを示した。
2. 可視化した嗅神経細胞で優性変異型 *PKA* を同時に発現させることにより、*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観察した。その結果 *PKA* の機能促進は嗅球内で、機能抑制は嗅上皮内で軸索の湾曲を引き起こすことを見い出した。このことから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り、誘導分子に対する感受性を調節することが推察された。
3. 嗅神経細胞特異的に *VAMP2-ECFP* を発現するトランスジェニックラインとげっ歯類で僧帽細胞選択的に発現することが知られている *TBR1* 遺伝子のゼブラフィッシュホモログのプロモーター制御下に *EYFP* を発現するトランスジェニックラインを交配することによって、嗅神経細胞とその標的細胞間の接触を可視化した。またプレシナプスのアクティブゾーンマーカーと小胞マーカー分子を嗅神経細胞で発現させることによってプレシナプスの形成過程を可視化した。これらの方法によって受精 50 時間後より嗅神経細胞—僧帽細胞間のシナプスが形成されることが示唆された。
4. シナプス小胞のマーカーである *VAMP2-EGFP* のシグナルを定量すると経時的に軸索終末への集積が見られた。また *GAP43-EGFP* によって可視化される軸索終末の膜の形態はシナプス形成時期に仮足を伸ばした複雑な構造から仮足を欠いた単純な構造へと変化することを見い出した。
5. シナプス形成時期に起こる上述 4 の変化を指標に、軸索終末の分化に与え

る PKA, Ca/calmodulin 依存性脱リン酸化酵素(カルシニューリン)の影響を観察した。その結果、PKA の機能亢進はシナプス小胞の終末への集積を促進し、機能抑制はそれを抑制した。一方カルシニューリンの機能亢進は GAP43-GFP で可視化される軸索終末の構造変化を促進し、機能抑制はそれを抑制した。これらのことから軸索終末分化に伴うシナプス小胞の集積は PKA シグナルが、一方軸索終末の膜形態の変化はカルシニューリンシグナルが別々に調節することが示された。

以上、本研究はゼブラフィッシュ嗅神経細胞特異的遺伝子発現系を用いて *in vivo* において軸索誘導、軸索終末の分化を可視化すると同時に、可視化した神経細胞において種々のタンパク質リン酸化酵素の影響を解析したものである。これまで脊椎動物中枢シナプス形成に伴うプレシナプス分化の調節機構に関する知見は断片的で、培養神経細胞を用いた研究が主流であった。本研究は *in vivo* でプレシナプス分化に伴う構造変化を詳細に観察し、少なくとも2つの異なるタンパク質リン酸化シグナル経路によって終末の分化、成熟が調節されることを見出した。ことはこの領域の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。