

論文の内容の要旨

論文題目 β -neurexin suppressed VAMP2-EGFP accumulation in axon terminals of zebrafish olfactory sensory neurons

和訳 β -neurexin はゼブラフィッシュ嗅神経系において軸索終末への VAMP2-EGFP の集積を抑制する

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13年4月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名： 増田 賢嗣

β -Neurexin はプレシナプスの細胞接着分子で、ポストシナプスの neuroligin と結合してシナプス形成の引き金を引く分子である可能性があることが *in vitro* の実験から示唆されている。しかし、その *in vivo* での機能はわかっていない。そこで我々は、体外で発生し胚が透明で、発生が早く、多産であるために、生きたまま神経回路網の形成過程を可視化して観察できるという特長をもつゼブラフィッシュをモデル動物として用いて、 β -neurexin の *in vivo* での機能を調べた。はじめに、 β -neurexin のゼブラフィッシュにおけるオルソログをクローニングした。ゼブラフィッシュゲノムデータベースサーチにより、6個の neurexin 候補配列が得られ、そのうち、ラットの neurexin I β に相同性が最も高いものをクローニングし、neurexin Ia β と名付けた。ゼブラフィッシュ neurexin Ia β は、全長でラット neurexin I β に対して 69% の相同性を有していた。Neurexin Ia β と human IgG Fc 領域との融合タンパクは、neuroligin 1-EYFP 融合タンパクを発現した細胞に特異的に結合した。また neurexin Ia β -Fc を用いた pull down 法によっても、neuroligin 1-EYFP が沈降されてきた。いっぽうイ

ーストツーハイブリッド法により、neurexin Ia β の細胞内領域が zebrafish CASKb と結合することがわかった。これらから、ゼブラフィッシュの neurexin Ia β は、ラットの neurexin I β と同様に細胞外で neuroligin 1 と、細胞内で CASK と結合することが示唆された。これまでにゼブラフィッシュの嗅神経細胞軸索終末が嗅球でシナプスを形成する際に、VAMP2-EGFP で標識されたシナプス小胞が軸索終末に集積し、一方で GAP43-EGFP で可視化した軸索終末は複雑な構造から単純な構造へと変化することが分かっている。Neurexin Ia β の、シナプス形成における *in vivo* での機能を試験するために、VAMP2-EGFP と neurexin Ia β が同一の嗅神経細胞で発現するダブルカセットベクターを構築した。Neurexin Ia β をゼブラフィッシュ嗅神経細胞に発現させると、軸索終末への小胞マーカータンパク VAMP2-EGFP の集積が抑えられた。しかし neurexin Ia β を発現させても軸索のマーカータンパク tau-EGFP を指標とした軸索の伸長および細胞膜のマーカータンパク GAP43-EGFP を指標とした軸索終末の形態変化には影響が認められなかった。Zebrafish neurexin Ia β の細胞外 N 末端領域を欠失した変異体を発現させても VAMP2-EGFP の集積への影響は認められなかったが、細胞内 C 末端領域を欠失した変異体を発現させると、VAMP2-EGFP の集積は抑えられた。また zebrafish neurexin Ia β と EYFP の融合タンパクは軸索終末に蛍光が認められ、その軸索は嗅神経細胞と僧帽細胞間が形成する糸球体構造に相当すると考えられる非細胞体領域に投射していた。以上の結果より、neurexin Ia β は、シナプス小胞の集積に特異的に関わっていることがわかった。Neurexin Ia β が、シナプス形成の引き金を引くというよりはむしろ、シナプスの成熟の場面で、特定の現象に限定的に関与していることが示唆された。