

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 増田賢嗣

本研究はシナプス形成の分子機構を明らかにする目的で、シナプス形成の引き金を引く分子の候補と見られてきた膜分子 β -neurexin のシナプス形成期での役割を、発達期のゼブラフィッシュ嗅神経細胞を生きたまま観察することによって解析したもので、下記の結果を得ている。

- 1、ほ乳類の β -neurexin の、ゼブラフィッシュにおけるホモログをデータベース検索し、6種類の候補配列を得た。そのうち neurexin I β に最も相同性が高いものをクローニングし、neurexin Ia β と名付けた。ついで *in situ* hybridization 法と RT-PCR 法により neurexin Ia β が発達期に発現していることを確認した。
- 2、Neurexin Ia β とヒト IgG Fc 領域との融合タンパクを精製して、neuroigin 1 を発現した HEK293 細胞にかけることにより、また neuroigin 1 を発現した細胞破砕物からのプルダウン法により、neurexin Ia β がほ乳類の neurexin I β 同様、細胞外で neuroigin 1 と結合することがわかった。またイーストツーハイブリッド法により、neurexin Ia β が、ほ乳類の neurexin I β 同様、細胞内で足場分子 CASK と結合することがわかった。
- 3、Neurexin Ia β とマーカータンパクとを同一のベクターに組み込み、一過的に胚に導入することによって neurexin Ia β を発現した細胞だけを可視化できるダブルカセットベクターを用いて、neurexin Ia β を嗅神経細胞に過剰発現させてシナプス小胞マーカータンパク VAMP2-EGFP の蛍光を観察し、その結果、発達に伴う軸索終末へのシナプス小胞の集積が neurexin Ia β 過剰発現によって抑えられることがわかった。
- 4、同様にダブルカセットベクターを一過的に導入する方式を用い、neurexin Ia β を嗅神経細胞に過剰発現させて軸索マーカータンパク tau-EGFP または軸索終末の細胞膜マーカータンパク GAP43-EGFP の蛍光を観察することによって、neurexin Ia β を過剰発現させても軸索の投射には影響がなく、

発達に伴う軸索終末の形態変化も正常に起こることがわかった。

- 5、同様にダブルカセットベクターを一過的に導入する方式を用い、neurexin Ia β の細胞外 N 末端領域を欠失した変異体ではシナプス小胞の集積に影響が見られないが、細胞内 C 末端領域を欠失した変異体ではシナプス小胞の集積が抑えられることがわかった。

以上、本論文はこれまでシナプス形成の引き金を引くと見られていた β -neurexin が、シナプス形成期に見られる 2 つの現象であるシナプス小胞の集積と軸索終末の形態変化のうち、シナプス小胞の集積に選択的に関与することを明らかにした。本研究は、これまでほとんど知られていなかったシナプス形成を司る生体内での分子機構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。