

論文の内容の要旨

論文題目 **Receptor protein tyrosine phosphatase σ regulates synaptic vesicle accumulation in axon terminals of zebrafish olfactory sensory neurons**
(**Receptor protein tyrosine phosphatase σ はゼブラフィッシュ嗅神経細胞において軸索終末へのシナプス小胞の集積を調節する**)

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16年4月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名： 陳 西貴

軸索終末の分化と成熟は、アクティブゾーンの形成、アクティブゾーン周辺へのシナプス小胞の集積、細胞骨格や膜構造の再編成など特徴的な変化を伴うことが知られている。分化した軸索終末において、シナプス小胞は、構造的及び機能的に readily releasable pool, recycling pool, reserve pool、三つのプールに分類される。脊椎動物において IIa 型の Receptor Protein Tyrosine Phosphatase (RPTP) は Leukocyte common antigen-related (LAR)、PTP σ 、及び PTP δ の3つのファミリーから構成されている。IIa 型 RPTP はプレシナプスとポストシナプスの双方に局在することから、シナプス形成、或はシナプス機能に関与することが示唆されてきた。近年、線虫とショウジョウバエの遺伝学的スクリーニングから、LAR とその足場タンパク質 liprin α の欠損変異体では神経筋接合部においてアクティブゾーンが肥大することが報告された。一方、海馬培養神経細胞において、シナプス後細胞で IIa 型 RPTP をノックダウンすることにより、スパインが減少することが示されている。しかし、シナプス前細胞の IIa 型 RPTP が軸索終末の分化にどのような役割を担うかは不明であった。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ち、且つ遺伝学的手法の適用が可能なゼブラフィッシュをモデル動物として用いて、*in vivo* で IIa 型

RPTP の 1 つである PTP σ の機能を調べた。

はじめに、ゼブラフィッシュにおける PTP σ オルソログ遺伝子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、少なくとも 6 個の IIa 型 RPTP の分子があり、そのうち、マウスの PTP σ に最も相同性が高い遺伝子をクローニングし、PTP σ a と名付けた。ゼブラフィッシュ PTP σ a は、全長でマウス PTP σ 、LAR、PTP δ に対して 70%、62%、66% の相同性を有していた。ゼブラフィッシュの PTP σ a は、マウスの PTP σ 、LAR と PTP δ と同様に細胞外に 三つの Immunoglobulin-like domain と 八つの Fibronectin-like domain、細胞内に二つの Phosphatase domain を有していた。In situ ハイブリダイゼーション法によって、ゼブラフィッシュの胚内での PTP σ a mRNA の発現を調べたところ、PTP σ a mRNA のハイブリダイゼーションシグナルが嗅上皮や網膜ガングリオン細胞層を含む広い範囲で観察された。

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 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。プレシナプス形成における *in vivo* で PTP σ a の機能を検討するために、PTP σ a の脱リン酸化酵素の活性中心に点変異を導入し、不活性型に改変した PTP σ a (PTP σ aC1556S) を作成した。そして、VAMP2-EGFP と PTP σ a、VAMP2-EGFP と PTP σ aC1556S を同一の嗅神経細胞で発現させるための *omp* プロモーターを用いたダブルカセットベクター (Pomp-VG-PTP σ a と Pomp-VG-PTP σ aC1556S) を構築した。Pomp-VG-PTP σ a と Pomp-VG-PTP σ aC1556S をゼブラフィッシュ胚に導入し、嗅神経細胞において PTP σ a と PTP σ aC1556S を発現させて、軸索終末へのシナプス小胞マーカータンパク VAMP2-EGFP の集積を観察しました。PTP σ a は受精後 60 と 84 時間の VAMP2-EGFP の集積へは影響しなかった。一方、嗅神経細胞において PTP σ aC1556S を発現させると、VAMP2-EGFP の集積がレポーター遺伝子のみを発現させたコントロールに比べて受精後 60、84 時間いずれも増加することがわかった。一方、細胞膜のマーカータンパク GAP43-EGFP と PTP σ aC1556S のダブルカセットベクター (Pomp-GG-PTP σ aC1556S) を発現させ、軸索終末の形態変化を観察したところ、影響が認められなかった。

VAMP2-EGFP 集積の著しい増加が実際に軸索終末のシナプス小胞の増加に一致するかどうか調べるために、私は PTP σ aC1556S の発現ベクターを注入した

稚魚の嗅球におけるシナプス構造を電子顕微鏡で解析した。電子顕微鏡解析にはおよそ 30-40%の嗅神経細胞において導入ベクターからの遺伝子発現が認められる胚を選別し、用いた。金魚嗅球糸球体におけるシナプスの分類を行った岡博士(1983)の定義に従い、ベクターを導入した受精後 60 時間のゼブラフィッシュ胚の糸球体において主に嗅神経細胞-僧帽細胞シナプス及び、僧帽細胞-periglomerular 細胞シナプスの二種類のシナプスを分類した。PTP α C1556S の発現ベクターを導入した胚とレポーター遺伝子のみを発現した胚の嗅球糸球体において、嗅神経細胞-僧帽細胞シナプス及び僧帽細胞-periglomerular 細胞シナプスの数には差が認められなかった。次に、分類した嗅神経細胞-僧帽細胞様シナプス及び僧帽細胞-periglomerular 細胞様シナプスにおいてシナプス小胞密度、後シナプス肥厚部 (PSD) の長さ、アクティブゾーンにドッキングしたシナプス小胞(docked synaptic vesicle)の数、アクティブゾーンの近傍で集積したシナプス小胞(clustered synaptic vesicle)の数を定量した。PTP α C1556S の発現ベクターを導入した胚ではレポーター遺伝子のみを発現した胚に比べて嗅神経細胞-僧帽細胞様シナプスにおいてシナプス小胞密度、docked synaptic vesicle と clustered synaptic vesicle が増加していた。一方、PSD の長さには差は認められなかった。更に僧帽細胞-periglomerular 細胞様シナプスにおいては PTP α C1556S の発現ベクターを導入した胚とレポーター遺伝子のみを発現した胚の間でシナプス小胞密度、PSD の長さ、docked synaptic vesicle の数、clustered synaptic vesicle の数に差がなかった。

これらの結果は、プレシナプスの PTP α がゼブラフィッシュ嗅神経細胞の readily releasable pool とアクティブゾーン近傍でシナプス小胞の集積を調節することを示している。PTP α の活性中心に点変異を導入した PTP α C1556S が影響を示したことから、シナプス小胞集積の制御には PTP σ のチロシン脱リン酸化活性が重要と考えられる。PTP α はアクティブゾーンの足場タンパク質 liprin α と結合することを通して、GIT1、Piccolo、RIMs、CASK などアクティブゾーンの分子と繋がり、相互作用していることが想定される。これらのアクティブゾーンタンパク質との結合することが知られている Munc18-1 と Rab3a は docked synaptic vesicle の調節に関与することが欠損マウスの解析等から明らかとなっている。したがって、PTP σ は RIMs をはじめとするこれらアクティブゾーン構成分子との相互作用を介して docked synaptic vesicle の数や clustered synaptic vesicle の数を制御する可能性が考えられる。