

## [課程一 2]

### 審査の結果の要旨

氏名 渡辺 文寛

本研究は、高等動物において様々な生命現象で重要な役割を演じていると考えられる非受容体型チロシンキナーゼ focal adhesion kinase (FAK)のマウス脳内での役割を明らかにするため、Cre/loxP 遺伝子組換えシステムを用いて FAK 欠損マウスを作成し、小脳に焦点をあて、解剖学的解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 従来の FAK 欠損マウスは胎生致死を示すため、FAK 欠損による小脳発達過程への影響を解析するにあたり、Cre/loxP 遺伝子組換えシステムを用いた部位特異的 FAK 欠損マウスの作製を試みた。Cre 組換え酵素活性依存的に FAK を欠損させるために、FAK 遺伝子内のキナーゼ翻訳領域を含む exon15 を Cre 認識部位である loxP 配列で挟んだ、TT2 胚性幹細胞由来の遺伝子組換えマウス *Fak<sup>lox</sup>* マウスを得た。そして、神経系全体で Cre を発現する Nestin-Cre マウスとの交配により神経/グリア特異的 FAK 欠損マウス (Mutant)を、また小脳プルキンエ細胞(PC)に特異的に Cre を発現する GluRδ2-Cre マウスとの交配によりプルキンエ細胞特異的 FAK 欠損マウス (PC-mutant)を得た。
2. 小脳の小葉構築への FAK の欠損効果を解析したところ、Mutant では小脳の虫部において、小葉 VI と VII を区切る裂 (intercrustral fissure)の欠如が観察された。また小葉構築の異常は多様性を示した。小葉 I/II と III を区切る裂 (precentral fissure) の欠如を示す個体、さらに小葉 IV/V と VI の間で融合を示す個体も確認された。また小脳虫部での各小葉の面積を定量したところ、Control より縮小しており、それらの面積の減少率には勾配が認められた。以上の結果から、FAK は小葉構造の構築に関与することが明らかとなった。
3. FAK の小脳での発現分布を免疫染色により詳細に解析したところ、FAK シグナルは、プルキンエ細胞の樹状突起や細胞体、バークマングリアの細胞体や放射状グリア、及び抑制性神経細胞の樹状突起や細胞体で斑点状のシグナルを示した。また平行線維、登上線維、及び抑制性神経細胞の神経終末においても FAK シグナルが観察された。これらの結果から、FAK は小脳の神経細胞、及びグリア細胞内に広く分布していることが明らかとなった。
4. 小脳の細胞の配置に対する FAK 欠損の影響を解析したところ、Control

5. PCへの登上線維 (CF)の支配様式に対するFAK欠損の影響を解析したところ、Controlでは、CFの支配領域は、分子層の3/4まで観察されるのに対し、Mutantでは、分子層の底部に低下していた。さらにCFの投射様式をレーザー蛍光標識により解析したところ、Mutantでは、野生型のCFの発達初期にみられるPC細胞体でのCF終末が確認され、また一つのPCに対し、複数のCFの投射が観察された。以上の所見から、FAKはCFの支配領域の形成、及び余剰なCFの排除に関与することが明らかとなった。
6. CF支配の近位退縮により、PCの近位樹状突起に異所的な棘突起が形成され、しばしば平行線維の近位拡大がみられることが知られている。そこでPC樹状突起染色、および電子顕微鏡解析により、PC近位樹状突起での棘突起を観察、定量化を試みたところ、Mutantでは、PC近位樹状突起での棘突起の密度が有意に増加していた。以上の所見から、FAKは平行線維支配領域の遠位樹状突起への駆逐に関与することが示唆された。
7. PC-mutantを用いてCFの支配領域を検討したところ、PC-mutantにおいてもCFの支配の近位退縮を示したが、その程度はMutantより小さいことが明確になった。さらにPCへのCFの投射様式では、PC細胞体でのCFの終末形成が確認されたが、多重支配は観察されなかった。以上の結果から、PCのFAKがCFの支配領域の形成の一部に関与することが明らかとなった。

以上、本論文は二系統のFAK欠損マウスの解析から、小脳の発達において、FAKが小葉の構築、及びバグマングリアの細胞体の配置に関与することを明らかにした。またFAKはCFの支配領域の形成にも影響を与え、PCのFAKが一部関与することを明らかにした。本研究は、これまで解析がほとんどなされていなかった小脳でのFAKの役割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。