

論文内容の要旨

申請者氏名 宮下 俊雄

ゼブラフィッシュでは感覚神経細胞の細胞極性もしくは軸索の特異化、末梢軸索の伸展に LIM/ホメオドメイン型転写因子 Islet-2 が大きく関わっている事が知られている。しかし、Islet-2 がどのような機能を持った下流因子群を制御しているかは明らかではない。本論文ではゼブラフィッシュ初期感覚神経細胞で膜蛋白 PlexinA4 を Islet-2 の下流因子の候補として同定し、その機能が感覚神経末梢枝の枝分かれにある可能性を示唆している。

まず、申請者は Islet-2 とファミリーを形成している類似の遺伝子 Islet-3 により発現制御される DNA クローン D204 に着目した。D204 は中脳領域以外に体幹部では背側に位置する初期感覚神経細胞で発現している。そこで、Islet-2 の機能阻害を行うと、これらの細胞で D204 の発現が減少する事から、Islet-2 の下流因子である可能性が推測された。D204 クローンの全長をクローニングした結果、PlexinA4 をコードする遺伝子である事が明らかになった。PlexinA ファミリーに属する蛋白質群は、神経軸索反発因子である Semaphorin の受容体として機能する事が知られている。このことから Islet-2 は軸索走行に関与する分子の遺伝子発現を制御している事が明らかになった。

また、申請者はこの PlexinA4 の機能を検証するためにモルフォリノアンチセンスオリゴのゼブラフィッシュ胚への顕微注入や PlexinA の機能阻害型変異体を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを用い、PlexinA4 の発現低下が感覚神経細胞末梢軸索の枝分かれの減少を引き起こすことを確認した。以上の事から PlexinA4 は Islet-2 の下流因子としてゼブラフィッシュの感覚神経細胞末梢軸索の枝分かれに関与している事が示唆された。また、感覚神経細胞の軸索に枝分かれを誘発する分子として、分泌性蛋白質 Slit が知られている。そこで申請者は熱ショックプロモーター下で Slit2 を全身に発現誘導出来るトランスジェニックゼブラフィッシュを使い、Slit と PlexinA4 の関わりを検証した。PlexinA4 のノックダウンを行う。あるいは、掛け合わせにより機能阻害型 PlexinA4 を同時に発現させた胚においても Slit 過剰発現下での過剰分岐は抑制された。また、Slit 過剰発現胚では三叉神経節感覚神経細胞の中枝が神経管の中にはいる事が出来ずに体表を迷走するという表現系を示す。しかし、Slit 過剰発現と同時に PlexinA4 の機能阻害を行うと約 40%の胚でその表現系が救済される事が明らかになった。以上の結果より、申請者は、ゼブラフィッシュ胚において PlexinA4 は Islet-2 の下流因子であること、PlexinA4 の初期感覚神経細胞での機能はその末梢枝の枝分かれに関与すること、さらに枝分かれに関して分泌性蛋白質 Slit と相互作用する可能性を明らかにした。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 宮下 俊雄

申請者はゼブラフィッシュ胚で **Islet-2** の機能阻害を行った胚でその初期感覚神経細胞で発現の減少する分子として、**PlexinA4** を同定した。**PlexinA** ファミリーに属する分子群は神経軸索反発因子と知られる **Semaphorin** の受容体として知られている。このことにより **LIM**/ホメオドメイン型転写因子の下流因子として、神経軸索ガイダンスに関わる分子が存在することが示唆された。この **PlexinA4** の機能をモルフォリノアンチセンスオリゴによる翻訳阻害、並びに機能阻害型 **PlexinA4** を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統の確立し解析した結果、感覚神経末梢軸索の枝分かれに関与する可能性を提唱している。これら感覚神経軸索の枝分かれを誘発する分子として分泌性蛋白 **Slit** の存在が知られているが、**PlexinA4** の機能阻害はこの **Slit** による枝分かれの誘発を阻害した。また、三叉神経節感覚神経細胞における **Slit** の過剰発現による神経走行異常は、**PlexinA4** の機能を阻害することにより救済された。さらに、**Islet-2** の機能阻害を行うことも救済された。これらの結果から、申請者は、**PlexinA4** を含む **Islet-2** の下流因子が **Slit** シグナル伝達に関与する可能性を提唱している。実際 **Slit** のレセプターとして知られる **robo2** 遺伝子は三叉神経節感覚神経細胞で発現している。しかし、**robo2** の突然変異体である **astray** 変異体において **Slit** を過剰発現しても、約40%の胚でしかその軸索走行異常が救済されない。また、**Islet-2** の機能阻害胚においても **robo2** 遺伝子の発現が減少することなく、野生型と同様に発現することから、ゼブラフィッシュの感覚神経細胞において **Islet-2** 下流因子としての **PlexinA4** が **Slit** シグナル伝達に関与し、そのシグナル伝達経路は **robo2** に依存するものではない可能性を提唱している。

本研究はサブタイプ特異的に発現している転写因子により軸索ガイダンス分子の受容体が制御されていることを明らかにし、さらに軸索ガイダンス分子がシグナルを伝達する可能性で何らかのクロストークをしている可能性を示している。これらの結果は今後の軸索伸展の分子メカニズムのさらなる発展の糸口になると思われる。

以上のように、本論文は **PlexinA4** の機能を *in vivo* で解析し感覚神経細胞末梢軸索の伸展過程に於いて、その分子カスケード、並びに分子間のクロストークを理解するための重要な知見を得たもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。