

Title	Involvement of afadin in the formation and remodeling of synapses in the hippocampus
Author(s)	真島, 崇
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58135">https://hdl.handle.net/11094/58135</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

### 〔 目 的 〕

海馬のシナプス部位において苔状線維終末とCA3錐体細胞の樹状突起との間には、高度に発達した神経伝達の間接的場であるシナプスジャンクション (SJ) と、その周囲に位置する接着装置Puncta adherentia junction (PAJ) が形成される。PAJには、接着分子系の一つであるN-カドヘリン-カテニン系に加え、免疫グロブリン様細胞間接着分子ネクチンおよびその細胞内領域に結合するアダプター分子アフアディンが存在する。PAJの形成にネクチンが重要であることは報告されているが、PAJにおけるアフアディンの役割と作用機構については不明であった。アフアディンを欠損したマウスは胎生期8.5日目まで個体発生が止まり胎生致死になることから、出生後の苔状線維終末のシナプスの発達におけるアフアディンの役割を解析することは困難であった。そこで、本研究では海馬の神経細胞でアフアディンが欠損する条件的欠損 (アフアディンcK0) マウスを作製し、シナプス形成におけるアフアディンの役割について検討を行った。

### 〔 方法ならびに成績 〕

#### I. 海馬特異的アフアディン欠損マウスの作製

本研究ではCre/loxP システムを用いて海馬特異的アフアディン欠損マウスを作製した。まず、マウスのアフアディン遺伝子のエクソン2を含む領域の上流と下流にloxP配列を挿入したターゲットロッキングベクターを作成した。このベクターをES細胞に導入してG418処理により選定し、サザンブロットング解析により相同組換えを起こしたES細胞を同定した。同定したES細胞をマウス受精卵の胚盤胞に注入してキメラマウスを作製した。得られたキメラマウスとBDF1マウスとの交配でヘテロマウス (アフアディン<sup>flox/flox</sup>) を得た。ヘテロマウス同士の交配により得られたアフアディン<sup>flox/flox</sup> マウスを、出生後の海馬に特異的に発現するCreリコンビナーゼを導入したマウス (CaMK-Creマウス) と交配し、海馬特異的なアフアディンcK0マウスを作製した。アフアディンcK0マウスの外観および行動は対照群のマウスと比較して変化が見られなかった。

#### II. 海馬特異的アフアディン欠損マウスの神経シナプスの解析

生後20週齢のマウスを麻醉下で灌流固定し海馬を摘出後、10 μmの厚さで凍結切片を作製し、海馬CA3領域を接着分子マーカーおよびシナプス前、後膜のマーカーで免疫染色した。対照群の海馬では、透明層 (Stratum lucidum) に存在する錐体細胞の樹状突起と苔状線維終末間で形成されるシナプスにおいて、ネクチン-1、ネクチン-3および N-カドヘリン、β-カテニンは免疫染色された。しかし、アフアディンcK0マウスの海馬ではこれらの分子は免疫染色されなかった。一方、シナプス前および後膜マーカーであるBassoonおよびPSD-95は、対照群およびアフアディンcK0マウスにおいて同様に免疫染色された。さらに、電子顕微鏡による詳細な観察では、アフアディンcK0マウス海馬CA3領域の透明層に投射された苔状線維終末におけるPAJ数は有意に減少していた。また、アフアディンcK0マウスのSJにおいて後シナプス肥厚の断片化が観察された。

### 〔 総 括 〕

本研究では、初めてアフアディンcK0マウスを作製し、海馬の神経シナプス、特に、ネクチンとN-カドヘリンによるPAJの形成において、アフアディンが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。PAJの形成はシナプス全体の形態に大きな影響を及ぼすが、免疫染色による光顕レベルの観察では、アフアディンcK0マウス海馬のSJマーカーの集積に大きな変化はなかった。しかし、電顕レベルの観察では、アフアディンcK0マウス海馬のSJ後シナプス肥厚の断片化と、有意ではないもののPSD数の増加が見られ、部分的ではあるがアフアディンがSJの形成制御にも関わっていると考えられた。アフアディンcK0マウスでSJの後シナプス肥厚の断片化が見られる原因として、1)アフアディンの欠損によりPAJの接着機構が减弱し、それがSJの形成・成熟化を阻害するという間接的な機序、2)アフアディンが直接的にSJの成熟化を抑制する機序、が考えられるが、この原因の解明は今後の課題である。また、アフアディンcK0マウスにおいて、PAJの異常の程度と比較してSJの異常は軽微であるが、その理由としてニューレキシニン-ニューロリギン系などの別の接着機構による代償機構が働いている可能性がある。ところで、今回用いたアフアディンcK0マウスでの行動学および電気生理学的な解析は行っておらず、この点については今後さらに検討していきたいと考えている。

[ 36 ]

氏 名	眞 島 崇
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 3 5 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 3 年 3 月 2 5 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体生理医学専攻
学 位 論 文 名	Involvement of afadin in the formation and remodeling of synapses in the hippocampus (海馬シナプスの形成とリモデリングにおけるアフアディンの役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 米 田 悦 啓 (副査) 教 授 原 田 彰 宏 教 授 山 下 俊 英

## 論文審査の結果の要旨

アフアディンは免疫グロブリン様細胞間接着分子ネクチンの細胞内領域に結合するアダプター分子で、中枢神経では神経伝達の間であるシナプスジャンクション(SJ)の周囲に位置する接着装置Puncta adherentia junction (PAJ)に存在する。アフアディンは、PAJの別の接着分子系であるN-カドヘリン-カテニン系と共にシナプスの形成と維持に必要であると考えられていたが、その詳細な機能については不明であった。アフアディン欠損マウスは胎生致死となるため、本研究では条件的アフアディン欠損マウスを作成し、海馬の神経細胞におけるアフアディンの役割について解析した。条件的アフアディン欠損マウスでは海馬CA3野におけるネクチン、N-カドヘリンおよびβ-カテニンのシグナルは検出できず、電子顕微鏡による観察でもPAJ数は減少していた。また、条件的アフアディン欠損マウスでは前シナプスおよび後シナプスマーカーの局在に異常はないものの、SJの後シナプス肥厚の断片化が観察された。以上より、アフアディンは神経細胞においてPAJの形成およびSJの形態を制御する重要な分子であると考えられ、海馬神経シナプスの形成とリモデリングに関与する可能性が新たに示唆された。このように本研究の成果はシナプスの機能とその分子機構の解明に大きく貢献するものと考えられる。したがって、本研究論文は学位の授与に値すると思われる。