

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 橋爪 幹

本研究は小脳プルキンエ細胞と下オリーブ核由来の登上線維との結合が、小脳の機能単位である微小帯域の神経活動にどのような影響を及ぼすのかを解明するために、登上線維の投射パターンに異常のある **GluRδ2** ノックアウトマウスの小脳に対して *in vivo* 2 光子カルシウムイメージングを行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. 個々のプルキンエ細胞で観察される、登上線維入力による自発カルシウムシグナルを細胞集団から同時に取得し、それらシグナル間の同期を相互相関係数の算出によって定量化すると、**GluRδ2** ノックアウトマウスでは同期が野生型マウスよりも亢進していた。また 200 μm の測定範囲内において、野生型マウスでは **mediolateral** 方向におけるプルキンエ細胞同士の距離が離れるにつれて同期の値が減衰していくのに対し、**GluRδ2** ノックアウトマウスではほとんど減衰しなかった。この実験により、**GluRδ2** ノックアウトマウスの微小帯域における神経活動は著しく変化していることが示された。
2. 次に、カルシウムシグナルの特徴を詳しく調べると、**GluRδ2** ノックアウトマウスにおける自発カルシウムシグナルは頻度が野生型よりも低く、半値幅が長くなっていた。このことから、登上線維入力のパターンが変化していると予想された。そこでカルシウムシグナルと登上線維入力との関係を調べるために、細胞外電位記録とカルシウムイメージングを同時に行ったところ、**GluRδ2** ノックアウトマウスでは、正常・異常な登上線維入力が短い時間間隔で連続して発生していることが判明した。以上の結果から、**GluRδ2** ノックアウトマウスの下オリーブ核の発火パターンは野生型とは大きく異なるものになっていると考えられる。
3. **GluRδ2** ノックアウトマウスで観察された同期の亢進の原因を調べるために、登上線維入力の発生源である下オリーブ核のギャップ結合を薬剤によって阻害し、カルシウムイメージングを行った。その結果、野生型でも **GluRδ2** ノックアウトマウスでも同期の値は減少した。一方、**mediolateral** 方向における同期の減衰率を調べたところ、野生型ではギャップ結合阻害によって有意に大きくなったのに対し、**GluRδ2** ノックアウトマウスでは全く変化しなかった。以上から、**GluRδ2** ノックアウトマウスで観察された **mediolateral** 方向における同期の亢進には、ギャップ結合はほとんど関与していないことが示唆された。
4. 先の実験結果を踏まえ、**GluRδ2** ノックアウトマウスの同期を亢進させたのは

登上線維の側方側枝が原因ではないかと考え、微小帯域との対応が示唆されているアルドラーゼ C の発現パターンを指標にして、側方側枝が微小帯域の範囲を越えて伸長しているかどうかを確認した。そのために野生型マウスおよび GluR δ 2 ノックアウトマウスの下オリーブ核に蛍光トレーサーを注入して登上線維をラベルした後に、小脳皮質をアルドラーゼ C と登上線維終末に対する抗体を使って染色した。野生型マウスの登上線維では、興奮性終末を持たない短い側方側枝が観察され、それらは分岐前の登上線維が投射しているアルドラーゼ C 帯域の範囲を越えることはなかった。一方、GluR δ 2 ノックアウトマウスでは、側方側枝が約 180 μ m にわたって伸長し、隣のアルドラーゼ C 発現・無発現帯域まで及んでいることが明らかとなった。またこれらの側方側枝が *mediolateral* 方向に並ぶプルキンエ細胞集団の樹状突起に多数の興奮性終末を送っている様子も観察された。このことから、GluR δ 2 ノックアウトマウスの微小帯域における登上線維応答の空間的なパターンの異常は、登上線維側方側枝が主な原因であると予想される。

5. これら側方側枝が実際にカルシウムシグナルを引き起こしているかどうかを確認するため、単一プルキンエ細胞に対しホールセル記録法とカルシウムイメージングを同時に行った。すると、異常な登上線維入力があったときに、プルキンエ細胞の遠位樹状突起に局所的なカルシウムシグナルが観察された。これは正常な登上線維入力が引き起こす全体的なカルシウムシグナルの振幅と同程度であることも確認された。

以上の結果から、GluR δ 2 ノックアウトマウスの *mediolateral* 方向における同期の亢進は、微小帯域の適切な範囲を越えて伸長する登上線維側方側枝と、バースト状の発火パターンを示すようになった下オリーブ核によって引き起こされたと考察される。登上線維が微小帯域の適切な範囲を越えて伸長し、多数の異所性シナプスを形成している GluR δ 2 ノックアウトマウスでは、微小帯域におけるプルキンエ細胞の空間的・時間的な活動パターンが著しく損なわれていることが判明した。本研究は神経結合が正常に形成されていくことが、モジュール化されたニューロン集団の適切な神経活動に必要であることを解明したものであり、学位の授与に値するものと考えられる。