

審査の結果の要旨

氏名 佐野 慶和

本研究では、AMPA 補助サブユニットとして知られる SHISA6 が、発達期小脳で見られる登上線維(CF)-プルキンエ細胞(PC)シナプスの刈り込み、および興奮性シナプス後電流(EPSC)のキネティクスへの影響を調べた。子宮内電気穿孔法を用いて SHISA6 をマウス小脳の PC 特異的にノックダウン(Shisa6-KD)し、作成したマウスを電気生理学的記録法、および免疫学的染色法により解析することで、SHISA6 が CF-PC シナプスの刈り込みに及ぼす機能について調査し、下記の結果を得た。

1.RNA 干渉法により SHISA6 を KD する miRNA を含んだベクターを、子宮内電気穿孔法によって胎生 11-12 日目の PC に導入して、Shisa6-KD マウスを作製した。その後、生後 18 日齢以降のマウスを用いて急性小脳スライスを作製し、刺激電極を通じて CF を刺激することで生じる CF-EPSC を、PC からのホールセルパッチクランプ法で電気生理学的に計測した。その結果、Control 群と比較して Shisa6-KD 群では、PC に投射する CF の本数が有意に増加していた。また、CF-EPSC のキネティクスを調べた結果、Shisa6-KD 群では減衰時間が短縮していた。以上のことから、SHISA6 は CF-PC シナプスの刈り込みおよび正常な EPSC キネティクスの維持に必要であることが示唆された。

2. 続いて、Shisa6-KD によるシナプス刈り込み異常が、いずれの発達段階から生じるのかを検証するために、機能分化の時期にあたる P5-6、シナプス刈り込みの前期過程(P7-12)を含む P7-9 と P10-12、成熟後の P70 以降において Shisa6-KD の効果を電気生理学的に調べた。その結果、Shisa6-KD 群では、P7 以降で CF-PC シナプスの刈り込みが障害されており、その影響は成熟後まで継続して残存することが示された。また、CF-EPSC のキネティクスを調べた結果、SHISA6 の KD により P5 の段階で減衰時間の短縮がみられることから、SHISA6 は少なくとも P5 以降で CF-EPSC キネティクスに関与していることが示唆された。

3. 次に、CF のシナプス刈り込みの後期過程(P12 以降)に関与することが知られる平行線維(PF)-PC 間のシナプス伝達について、SHISA6 の KD による影響を調べた。その結果、Shisa6-KD 群では、PF-EPSCs の振幅の減弱および減衰時間の短縮がみられ、PF-PC 間の正常なシナプス伝達にも SHISA6 が必要であることが分かった。また、P10 以降のシナプス刈り込みに関与する PC への抑制性シナプス入力について、SHISA6 の KD が影響するかを調べるために、P11-12 において微小抑制性シナプス後電流(mIPSC)を記録した。その結

果、mIPSC の振幅および頻度のいずれにおいても、Control と Shisa6-KD に有意差は見られず、SHISA6 は PC における抑制性入力 of 発達には関与しないことが示唆された。

4. 最後に、SHISA6 の KD による PC への興奮性入力の変化について、免疫染色法を用いて形態学的に解析した。CF 終末のマーカーとして VGluT2、PF 終末のマーカーとして VGluT1、PC を Car8 で免疫染色した。その結果、Shisa6-KD 群では Control 群と比較して、分子層における CF 終末の伸展の度合い、PC 細胞体周辺に残存する CF 終末の数、PC 樹状突起に形成された CF および PF のシナプス終末の数のいずれにおいても、有意な差は認められなかった。以上のことから、Shisa6-KD により CF および PF シナプスに顕著な形態学的な変化は現れないことが示唆された。

以上、本論文は、SHISA6 がマウスの発達期小脳において CF-PC シナプスの刈り込みおよび正常なシナプス伝達に必要であることを明らかにし、シナプス刈り込みのメカニズムの解明に貢献したことから、学位（医学）の授与に値するものと考えられる。よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。