

## [課程-2]

### 審査の結果の要旨

氏名 秋 明貞

本研究は発達期小脳の登上線維-プルキンエ細胞シナプスの刈り込みにおける脳由来神経栄養因子 (BDNF) の働きを明らかにするために、プルキンエ細胞において BDNF を欠損するマウスと、プルキンエ細胞および登上線維において BDNF の受容体を欠損するマウスを作製し、これらの電気生理学的解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. プルキンエ細胞において BDNF 遺伝子をノックアウトしたマウス (BDNF ノックアウトマウス) 及び BDNF に対する miRNA を生後 0-1 日の小脳に導入してプルキンエ細胞特異的に BDNF をノックダウンしたマウス (BDNF ノックダウンマウス) において、生後 21 日以降に小脳スライスを作製してプルキンエ細胞からホールセル記録を行い、登上線維を電気刺激して、興奮性シナプス応答を記録した。これらのマウスでは登上線維シナプス刈り込みが阻害されていたことから、プルキンエ細胞由来の BDNF が登上線維シナプス刈り込みに関与することが明らかになった。
2. BDNF ノックアウトマウス及び BDNF ノックダウンマウスの登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達について 1. と同様の方法で電気生理学的解析を行った。登上線維シナプス刈り込みは、生後 12 日以前の前期過程と生後 12 日以降の後期過程に分かれるが、この解析の結果、BDNF は生後 15 日目以降に作用することが明らかになった。
3. BDNF ノックダウンマウスの形態学的解析により、成熟期マウスプルキンエ細胞の細胞体周辺において登上線維のシナプス前終末が観察された。正常マウスでは、細胞体周辺の登上線維シナプスは後期過程終了までに大半が除去されることから、BDNF はシナプス刈り込み後期過程において、細胞体から過剰な登上線維シナプスを除去する働きに関わると結論した。
4. BDNF の高親和性受容体 TrkB 及び低親和性受容体 P75<sup>NTR</sup> の遺伝子を、それぞれプルキンエ細胞でノックアウトしたマウスでは、登上線維シナプス刈り込みは正常であった。一方、TrkB に対する miRNA を生後 1 日の下オリブ核 (登上線維の起始神経核)

に導入して、TrkB を登上線維においてノックダウンしたマウスでは、登上線維シナプス刈り込みが障害されていたが、同様の方法で P75<sup>NTR</sup> を登上線維においてノックダウンしたマウスでは異常はみとめなかった。この結果から、プルキンエ細胞ではなく、登上線維に存在する TrkB が登上線維シナプスの刈り込みに関与することが明らかになった。

5. プルキンエ細胞の BDNF と登上線維の TrkB をダブルノックダウンした場合の登上線維シナプス刈り込みに対する影響は、それぞれを単独でノックダウンした場合の効果と等しかった。この結果から、プルキンエ細胞由来の BDNF が登上線維の TrkB に逆行性に作用して、登上線維シナプスの刈り込みを促進すると結論した。
6. プルキンエ細胞には、登上線維シナプス以外に、平行線維からの興奮性シナプスと抑制性介在ニューロンからの抑制性シナプスが存在する。電気生理学および形態学的解析の結果、BDNF と TrkB の登上線維シナプス刈り込みへの作用は、平行線維シナプスや抑制性シナプスの変化による間接的な影響ではないことを明らかにした。
7. 登上線維シナプス刈り込みには、代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1)、P/Q 型電位依存性カルシウムチャンネル (P/Q-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel)、デルタ 2 グルタミン酸受容体 (GluD2) という 3 種類のシグナル経路が関与する。BDNF がこれらのどの経路と関係するかを明らかにするため、BDNF ノックアウトマウスのプルキンエ細胞において mGluR1、P/Q channel、GluD2 のいずれかを miRNA でノックダウンしてその効果を調べた。BDNF が欠損したプルキンエ細胞では mGluR1 ノックダウンの効果はみとめられなかったが、P/Q channel と GluD2 のノックダウンの効果はみられた。この結果から、mGluR1 シグナルと BDNF-TrkB シグナルは、登上線維シナプス刈り込みにおいて、同一経路上で働くと結論した。

以上、本論文は発達期小脳の登上線維-プルキンエ細胞シナプスの刈り込みにおいて、プルキンエ細胞由来の BDNF が登上線維の TrkB に逆行性に作用して、生後 15 日以降にプルキンエ細胞の細胞体から過剰な登上線維シナプスを刈り込むことと、このシグナル経路が mGluR1 シグナルと同一経路上にあることを解明した。発達期の神経系におけるシナプス刈り込みの代表的モデルである小脳登上線維シナプス刈り込みのメカニズムの理解を進めたのみならず、重要な神経栄養因子である BDNF の新たな機能を明らかにしたものであり、生後発達期の機能的神経回路成熟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。