論文の内容の要旨

論文題目　Disruption of cerebellar microzonal organization in GluRδ2 (GluD2) knockout mouse

（GluRδ2 (GluD2) ノックアウトマウスにおける小脳微小帯域構造の異常）

氏名　橋爪　幹

序文

小脳皮質には吻尾方向に沿った帯状の構成があり、それは多数の微小帯域と呼ばれる構造から成り立っている。この微小帯域は小脳の機能単位であると考えられている。小脳皮質の出力ニューロンであるプルキンエ細胞は延髄下オリーブ核由来の登上線維入力を受け取り、複雑スパイク(CS)と呼ばれる応答を示すことが知られている。そして複雑スパイクが同じ微小帯域内に存在するプルキンエ細胞集団の間で非常によく同期していることも報告されている。この CS の同期は、登上線維が吻尾方向に沿って展開した後にプルキンエ細胞と一対一で結合する形態的特徴と、下オリーブ核ニューロン同士がギャップ結合を介して電気的に共役していることによって生み出されていると考えられている。しかし、登上線維の投射パターンが機能的な微小帯域の構造にどの程度影響を及ぼすのかについてはほとんど調べられていない。

そこで、本研究では δ2 型グルタミン酸受容体（GluRδ2）のノックアウトマウスを材料に、プルキンエ細胞集団が示す CS を解析した。GluRδ2 はプルキンエ細胞の遠位樹状突起スパインに豊富に発現している分子で、平行線維シナプスの形成に必要とされる。それゆえ、この分子のノックアウトマウスでは平行線維シナプス数が半減し、その結果、登上線維が側枝を多数分岐させて複数のプルキンエ細胞と異所性のシナプス結合を作るようになる。このマウスは重篤な運動失調を呈し、運動学習が障害されている。

GluRδ2 ノックアウトマウスでは登上線維投射パターンに異常が見られることから、小脳皮質における微小帯域構造が乱れていると考えられた。そこで、本研究では GluRδ2 ノックアウトマウスの微小帯域活動を解析するために、2 光子励起顕微鏡を用いたカルシウムイメージングを行い、隣接するプルキンエ細胞集団が示す CS をカルシウムシグナルとして測定し、その同期を定量化した。この解析の結果、GluRδ2 ノックアウトマウスの微小帯域内における CS の同期は野生型よりも亢進しており、それは微小帯域の

適切な範囲を越えて伸長している登上線維の側方側枝と、発火パターンが変化した下オリーブ核ニューロンによって引き起こされていることが示唆された。

結果

麻酔下の野生型および GluRδ2 ノックアウトマウスの小脳半球 Crus IIa 領域に細胞膜透過型カルシウム指示薬の Oregon Green 488 BAPTA-1 AM を投与した。それから 30 分後、分子層の 200 μm 四方の範囲内をイメージングすることにより、個々のプルキンエ細胞の樹状突起からカルシウムシグナルを取得した。次にカルシウムシグナル間の同期を定量化し、内外側方向における細胞同士の距離との関係を調べた。その結果、野生型ではシグナル間の同期は細胞同士の距離が離れるにつれて減衰していく傾向が明らかとなった。一方、GluRδ2 ノックアウトマウスでは同期が野生型よりも大きく、さらに細胞同士の距離が遠くなってもほとんど減衰しなかった。これらの結果から、GluRδ2 ノックアウトマウスの微小帯域活動は著しく変化していることが示された。

次に、GluRδ2 ノックアウトマウスでは登上線維入力のパターンが変化しているかどうかを確認するため、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。電位記録の結果、野生型と GluRδ2 ノックアウトマウスとで CS の頻度や、プルキンエ細胞の自発発火である単純スパイクの頻度に有意差は見られなかった。また、両者とも CS が起きている時にのみ、カルシウムシグナルが観察された。一方 GluRδ2 ノックアウトマウスの場合は、Clustered firing (Cf)と呼ばれる異所性の登上線維入力を反映した応答が観察された。また、この Cf と CS はどちらも短い時間間隔で連続して発火していた。以上の結果から、GluRδ2 ノックアウトマウスでは下オリーブ核ニューロンの発火パターンが変化していることが示唆された。

先行研究から、CS の発火パターンと同期は、下オリーブ核ニューロン間のギャップ結合に送られている入力線維によって修飾されていることが判明している。そこでギャップ結合を薬理的に阻害すると、野生型でも GluRδ2 ノックアウトマウスでも同期の値は有意に減少した。また、内外側方向における同期の減衰率について解析したところ、野生型ではギャップ結合阻害によって減衰率は有意に大きくなっていたのに対し、GluRδ2 ノックアウトマウスの場合は薬剤投与の前後で減衰率に変化は見られなかった。このことから GluRδ2 ノックアウトマウスの内外側方向における同期の亢進にはギャップ結合以外のメカニズムが関与していることが示唆された。

GluRδ2 ノックアウトマウスの同期を亢進させたのは、登上線維の異所性側方側枝であると考えられたため、形態解析によって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調べた。そのためにアルドラーゼ C という、微小帯域の範囲と密接な関係を示す分子マーカーの発現パターンと、登上線維の側枝との位置関係を解析した。野生型では、短い側枝が内外側方向に伸びている様子が観察されたが、この側方側枝は隣のプルキンエ細胞とシナプス結合を作ることはなく、アルドラーゼ C 帯域を超えること

もなかった。対照的に GluRδ2 ノックアウトマウスでは、最大で約 180 μm の長さの側方側枝が隣のアルドラーゼ C 帯域まで伸長し、その途中で複数のプルキンエ細胞の樹状突起とシナプス結合を作っていた。この結果は、GluRδ2 ノックアウトマウスの側方側枝は微小帯域の適切な範囲を越えて伸長し、その過程で複数のプルキンエ細胞に興奮性の入力を送っていることを示唆している。

最後に、この異所性の側方側枝がプルキンエ細胞の樹状突起にカルシウムを流入させることができるかどうかを確かめるために、GluRδ2 ノックアウトマウスの単一プルキンエ細胞に対しホールセル記録とカルシウムイメージングとを同時に行った。その結果、Cf が起きた時に局所的なカルシウムシグナルが遠位樹状突起で観察された。この局所カルシウムシグナルは、スライス標本において異所性の登上線維を刺激した時に観察されるものとよく似ていた。また、この局所カルシウムシグナルは CS によって引き起こされる全体的なカルシウムシグナルと同程度の振幅を示した。以上から、異所性の側方側枝による局所カルシウムシグナルが、GluRδ2 ノックアウトマウスの内外側方向における同期を亢進させるのに貢献していることが示唆された。

考察

本研究から、GluRδ2 ノックアウトマウスのプルキンエ細胞集団では CS の同期が野生型よりも亢進していることが明らかとなった。また野生型とは異なる点として、内外側方向における細胞同士の距離が大きくなっても同期はほとんど減衰しないことも判明した。それゆえ、GluRδ2 ノックアウトマウスでは機能的な微小帯域の範囲が拡大していると予想される。この拡大は内外側方向における微小帯域の範囲を越えて伸長する登上線維の側方側枝と、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ニューロンによって引き起こされていると考察される。一方、ギャップ結合における変化は、内外側方向における同期の亢進にはほとんど影響しないと考えられる。

GluRδ2 ノックアウトマウスにはシナプス結合を作る側方側枝があるため、下オリーブ核ニューロンで発生した活動電位は、登上線維が主な標的としている単一プルキンエ細胞に CS とそれによる全体的なカルシウムシグナルを引き起こす一方、側方側枝を介して周囲のプルキンエ細胞集団に Cf とそれによる局所カルシウムシグナルを引き起こしていると考えられる。また、GluRδ2 ノックアウトマウスでは下オリーブ核ニューロンが短い時間間隔で連続して発火していることも示された。以上から、ある一つのプルキンエ細胞に注目した場合、周囲の細胞集団で全体的なカルシウムシグナルが観察されているときに、局所カルシウムシグナルが樹状突起の様々な部位でほぼ同時に発生し、見かけ上全体的なカルシウムシグナルが起きていると予想される。このようなメカニズムによって、GluRδ2 ノックアウトマウスのカルシウムシグナルの同期が亢進させられたと考察される。

GluRδ2 ノックアウトマウスの下オリーブ核ニューロンの発火パターンが変化した原

因は、プルキンエ細胞集団が示すCSの時間的・空間的なパターンの変化が、その投射先である小脳核を介したフィードバックループを伝わり、下オリーブ核の活動を修飾したためであると考察される。先行研究から、下オリーブ核ニューロンの活動パターンはグルタミン酸性・GABA性の入力線維によって修飾されること、これらの入力線維は小脳核からの直接・間接経路に属することが知られている。また、ある微小帯域に属するプルキンエ細胞集団で同期したCSが起きると、その投射先である小脳核の特定の領域にあるニューロンで、強い過分極とそれに続くリバウンド興奮によって誘発されるバースト状の活動電位が発生することが分かっている。それゆえ、GluRδ2 ノックアウトマウスではほとんどのプルキンエ細胞で同期したCSやCfが起きているため、小脳核ニューロンのほとんどがリバウンド興奮を起こしていると考えられる。この興奮は小脳核から中脳間脳の神経核を介する興奮性経路によって下オリーブ核に伝えられ、そこでバースト状の活動を誘発すると考えられる。一方、小脳核からの直接的な抑制性経路によって、下オリーブ核に過分極とそれに続くリバウンド興奮が引き起こされると予想される。

GluRδ2 ノックアウトマウスでは、内外側方向における同期の亢進と過剰に伸長した側方側枝の異所性投射によって、異なる機能を割り当てられている複数の微小帯域が常に同期して活動していると予想され、それが動物の運動協調に大きな影響を及ぼしていると推測される。以上から、登上線維とプルキンエ細胞間の神経結合が正常に発達していくことが、小脳の機能単位である微小帯域の適切な範囲を定め、その時間的・空間的な活動パターンを作り上げる基礎となっていると結論づけられる。