

[課程-2]

審査の結果の要旨

名前 川田 慎也

本研究は生後発達期に起こるシナプスの刈り込みにおける絶対的なシナプス強度の役割を明らかにするため、小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスにおいてAMPA型グルタミン酸受容体 (AMPA) のシナプスへの運搬を司ると考えられる Transmembrane AMPAR regulatory protein (TARP) γ -2をプルキンエ細胞特異的に欠損させた γ -2 PC-KO mouseを作製し、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの発達への影響を調べた研究であり、下記の結果を得ている。

1. γ -2 PC-KO mouseもしくは野生型mouseの小脳虫部から作製した矢状断急性スライスにおいてプルキンエ細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い、登上線維が走行している顆粒細胞層を電気刺激して登上線維による興奮性シナプス後電流(EPSC)を記録した。まずP3-P43の間で登上線維応答の振幅を野生型と γ -2 PC-KO mouseで比較したところ、P6以降に γ -2 PC-KO mouseではおよそ半分程度に減少していた。一方、異なる線維間の相対的な強度の差に変化はなかった。すなわち γ -2 PC-KO mouseでは競合する異なる線維間の相対関係は保ったままシナプス強度が全般的に減少しているということが分かった。

2. 次にこのシナプス強度の全般的減少が登上線維-プルキンエ細胞シナプスの発達過程にどのような影響を与えているかを調べた。まず登上線維終末に発現している2型グルタミン酸トランスポーター (vGluT2) の免疫染色を行い、登上線維のプルキンエ細胞樹状突起への伸展の度合いを小脳皮質分子層の厚さと比較した。その結果、 γ -2 PC-KO mouseでは伸展が有意に低いことが分かった。次にP21-P43においてプルキンエ細胞を支配している登上線維の本数を電気生理学的に調べたところ、 γ -2 PC-KO mouseでは複数の登上線維に支配されているプルキンエ細胞が有意に多いことが分かった。これらの結果は、 γ -2 PC-KO mouseにおいて登上線維の樹状突起への進展と過剰な登上線維シナプスの除去が障害されていることを示している。

3. 登上線維シナプスの除去過程は前期過程と後期過程に分けられる。 γ -2 PC-KO mouseにおいてどちらの過程が障害されているかを調べるために、それぞれの境界前後の日齢で、プルキンエ細胞を支配する登上線維の本数を調べたところ、P11-P13では異常がみられな

いのに対して、P15–P17では、複数の登上線維に支配されているプルキンエ細胞が γ -2 PC-KO mouseでは有意に多いことが分かった。すなわち、 γ -2 PC-KO mouseでは登上線維シナプスの後期除去過程が特異的に障害されていることが明らかになった。

4. これまでの研究から登上線維–プルキンエ細胞シナプスの後期除去過程には代謝型グルタミン酸受容体1型 (mGluR1) を介する細胞内シグナル伝達経路及びプルキンエ細胞への抑制性入力の発達が寄与していることが知られていた。そこで γ -2 PC-KO mouseにおける後期除去過程の障害がこれらの経路の異常によるものかを調べたが両経路ともに正常に機能していることがわかった。

5. 最近の研究から登上線維シナプスの後期除去過程にはP/Q型電位依存性カルシウムチャネルを介した最初期遺伝子Arcの活性化が必要であることが明らかとなった。 γ -2 PC-KO mouseでは登上線維シナプス強度の減少により電位依存性カルシウムチャネルを介したこの経路が障害されている可能性が考えられる。そこで、まず登上線維入力に伴うプルキンエ細胞におけるカルシウム上昇を観察したところ、 γ -2 PC-KO mouseではカルシウム上昇幅が有意に減少していた。この結果は γ -2 PC-KO mouseにおいてカルシウムを介したArcの発現が十分でないために、登上線維シナプス除去が障害された可能性を示唆する。それならば、Arcを過剰発現させることでシナプス除去障害を回復できると考え、レンチウイルスベクターを用いたプルキンエ細胞特異的遺伝子導入法により γ -2 PC-KO mouseのプルキンエ細胞にArcを過剰発現させた。その結果、Arcを過剰発現したプルキンエ細胞では対照に比べて、支配する登上線維の本数が少なく、シナプス刈り込みの障害がレスキューされていた。次に γ -2 PC-KO mouseでArcノックダウンを行ったところ登上線維の本数分布には全く影響は見られなかったことから、 γ -2 PC-KO mouseではArcによるシナプス除去過程は機能していないと考えられた。これらの結果から γ -2 PC-KO mouseではArcを介したシナプス除去過程が障害されていることが明らかになった。

以上、本論文は γ -2 PC-KO mouseにおいて登上線維–プルキンエ細胞シナプス発達の解析から、絶対的なシナプス強度が登上線維のプルキンエ細胞樹状突起への伸展及び登上線維–プルキンエ細胞シナプスの刈り込みに寄与していること及びそのシナプスの刈り込みにおけるメカニズムを明らかにした。本研究は生後発達期における神経回路形成のメカニズム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。