

学位論文題名

Impaired Parallel Fiber → Purkinje Cell Synapse  
Stabilization during Cerebellar Development  
of Mutant Mice Lacking the Glutamate  
Receptor  $\delta$  2 Subunit

(グルタミン酸受容体  $\delta$  2 サブユニット欠損マウスにおける  
小脳平行線維→プルキンエ細胞シナプスの生後発達)

学位論文内容の要旨

はじめに

グルタミン酸は中枢神経において主要な興奮性刺激の伝達物質であり、シナプスの可塑性にも関わっている。この興奮性伝達に関与するグルタミン酸受容体にはイオンチャンネル型受容体と代謝型受容体が存在する。これまで16種のイオンチャンネル型グルタミン酸受容体サブユニット(GluR)が同定されており、そのアミノ酸配列の相同性から $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\zeta$ の6つのサブファミリーに分類されている。GluR  $\delta$  2は胎生期から成熟段階に至るまで小脳プルキンエ細胞にのみ発現する特異なサブユニットである。その蛋白分子は小脳顆粒細胞の軸索である平行線維終末とシナプスを形成するプルキンエ細胞棘突起に選択的に局在している。

遺伝子ノックアウトマウスの解析から、GluR  $\delta$  2の分子欠損は平行線維・プルキンエ細胞間シナプスの著明な減少を引き起こし、長期抑制現象が消失し、協調運動が障害される。本研究では、平行線維シナプス形成におけるGluR  $\delta$  2の機能的役割を解明する目的で、この分子を欠損するノックアウトマウスの小脳を光顕および電顕的に形態計測法を用いて解析した。

方法

光学顕微鏡：生後35日齢の野生型、変異型マウス各3個体を深麻酔下にて4%パラフォルムアルデヒド(PFA)・0.2%ピクリン酸・0.1M磷酸緩衝液(PB)で灌流固定し抜脳した。100  $\mu$ m厚の小脳虫部正中の矢状断切片をニッスル染色し、分子層、顆粒層、白質の各面積をポイントカウンティング法を用いて計測した。隣接切片を抗カルビンジン抗体を用いた免疫染色を行いプルキンエ細胞を可視化した。

電子顕微鏡：生後7, 14, 21, 35日齢の野生型、変異型マウスを各3個体を深麻酔下にて、0.5%グルタルアルデヒド・4%PFA・0.1Mカコシル酸緩衝液で灌流固定し抜脳した。さらに小脳虫部切片を固定液に12時間浸した後、1%オスミウム酸・0.1MPBで後固定2時間行い、エポン樹脂に包埋した。小脳虫部IV+V葉の矢状断超薄切片を2%酢酸ウラン5分、鉛浴液で2分間染色し、電子顕微鏡を用い4000倍で撮影した。最終倍率16000倍で焼き付けた電子顕微鏡写真を用いて平行線維シナプスを観察・計測した。なお分子層の計測対象は、細胞体、血管および径2  $\mu$ m以上のプルキンエ細胞樹状突起を除く部分とした。

## 結 果

生後35日齢のGluR $\delta$  2欠損マウスでは光顕上小脳虫部の分葉化・層構造は野生型と同様であり、プルキンエ細胞は一層に配列し、樹状突起も1次から3次まで野生型と同等の発達を示した。しかし、断面積を計測したところ、分子層、顆粒層ともに野生型の86%と減少していた。電顕上、野生型マウスの平行線維→プルキンエ細胞シナプスは球形のシナプス小胞をもつ平行線維終末とシナプス後肥厚を伴う卵円形のプルキンエ細胞棘突起間の非対称性シナプスであり、これがバグマングリア細胞突起に覆われていた。しかしGluR $\delta$  2欠損マウスでは野生型に比べシナプスの数は少なく、バグマングリア領域に全周を囲まれシナプス結合の見られない棘突起が多数観察された。この所見を定量するため連続電顕写真を作成すると、野生型では計数した253個全ての棘突起が平行線維とシナプスを形成していた。これに対し、変異型では271個中63%の棘突起がシナプスを形成していたが、残る37%はシナプス結合を持たなかった。小脳虫部矢状断1mmスライス当たりのプルキンエ細胞数、単位体積あたりの棘突起数、顆粒細胞数を形態計測法により計測するといずれも有意な差は認められなかった。以上の計測結果から1mmスライス当たりの平行線維シナプスの数を求めると、変異型では野生型の52%にまで減少していることが判明した。

この平行線維→プルキンエ細胞シナプス異常の出現過程を明らかにする目的で発達段階を追って解析した。生後7日ではいずれのマウスも分子層は薄く、その中に含まれる棘突起は少数ながらシナプスを形成し、その割合に差はなかった。この時期の平行線維シナプスは1) 小さな平行線維終末、2) 少数のシナプス小胞、3) 小さなシナプス結合、4) 乏しいシナプス後膜肥厚、5) 不完全なバグマングリアによる被覆など、未熟な形態を示した。生後14日になると分子層は急速に厚くなり、その中には生後35日の観察と同様の成熟した形態的特徴を備えたシナプスが多数出現し、野生型では、ほとんどすべての棘突起がシナプ스에組み込まれていた(98%)。一方、GluR $\delta$  2欠損マウスではシナプス結合をもたない棘突起も多数みられ、棘突起の60%がシナプスを形成するのみであり、この割合は生後21日、35日とほぼ変化がなかった。

野生型の成熟平行線維シナプスは通常1個の終末と1個の棘突起間の1対1結合であるが、時折1個の終末に2個の棘突起がシナプスを形成している像(1対2結合)が観察された。しかし、GluR $\delta$  2欠損マウスではこの様なシナプスがほとんど観察されないことに気づき、平行線維1個にシナプスを作る棘突起の数を連続電顕で計測した。生後7日ではいずれのマウスも計測したすべてのシナプスが1対1の結合であった。生後14日以降、野生型では1対2結合型の平行線維シナプスが出現し、この割合は生後14日で8%、21日で12%、35日で15%と発達とともにその割合が増加した。これに対してGluR $\delta$  2欠損マウスでは計測したすべての平行線維シナプスは1対1結合にとどまっていた。

## ま と め と 考 察

1) GluR $\delta$  2の分子欠損にも関わらず、プルキンエ細胞数は正常で、1列に配列し、棘突起密度にも変化は認められなかった。この事実は、この分子機能がプルキンエ細胞の産生や移動、棘突起形成とは無関係であることを示している。

2) 正常発生過程において、平行線維シナプスは生後2週に活発に形成されることが知られている。GluR $\delta$  2の分子機能はこの時期に一致して発現し、分化した棘突起のほとんどすべてがシナプスの形成へと導かれる。しかしその分子欠損は、約3分の1のプルキンエ細胞棘突起をシナプス結合をもたない”裸の棘突起”として分子層に出現させることとなる。この事実は、この分子機能が平行線維終末との間のシナプス結合の強化・安定化に関わっていることを示唆している。

3) 1型代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)も、プルキンエ細胞に高いレベルで発現している機能分子である。mGluR1に伝えられたシグナルは、Gq蛋白を介してホスホリパー

ゼC $\beta$  (PLC $\beta$ )を活性化し、セカンドメッセンジャーであるイノシトール3リン酸とジアシルグリセロールを産生する。後者はCキナーゼ(PKC)を活性化し、これによる細胞内蛋白リン酸化反応はシナプス後側の機能状態を長期にわたって亢進もしくは低下させる。遺伝子発現解析により、プルキンエ細胞ではmGluR1・G $\alpha$ q・PLC $\beta$ 4・PKC $\gamma$ が主要な情報伝達分子カスケードを構成しているものと考えられる。これらの遺伝子欠損マウスでは、いずれも平行線維・プルキンエ細胞間シナプスの形成は正常に起こる。この事実を考えあわせるとGluR $\delta$ 2とmGluR1シグナル伝達系とは、平行線維シナプス形成における機能的役割が本質的に異なっていることを示している。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 犬 山 征 夫  
副 査 教 授 井 上 芳 郎  
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

## 学 位 論 文 題 名

### Impaired Parallel Fiber → Purkinje Cell Synapse Stabilization during Cerebellar Development of Mutant Mice Lacking the Glutamate Receptor $\delta$ 2 Subunit

(グルタミン酸受容体  $\delta$  2 サブユニット欠損マウスにおける  
小脳平行線維→プルキンエ細胞シナプスの生後発達)

GluR  $\delta$  2はプルキンエ細胞に特異的に発現するグルタミン酸受容体サブユニットで、この分子を欠損するマウスは1) 平行線維シナプスの減少、2) 登上線維シナプスの成熟障害、3) 長期抑制現象の消失、4) 協調運動障害を示すことが知られている。本研究では、平行線維→プルキンエ細胞シナプス（平行線維シナプス）形成におけるGluR  $\delta$  2の機能的役割を明らかにする目的で、この分子を欠損するマウスを形態的に解析した。その結果、GluR  $\delta$  2欠損マウスはプルキンエ細胞の数、配列、形態は正常であった。しかし、連続電顕写真による検索の結果、野生型ではほぼ全てのプルキンエ細胞棘突起が平行線維終末とシナプスを形成していたが、欠損マウスではシナプス結合を持つ棘突起は63%にとどまっていた。発達段階を解析したところ、生後7日では野生型および欠損マウスともシナプスの形態は未熟でその結合率も低く、両者の間に有意な差は認められなかった。生後14日になると、野生型のほとんどすべての棘突起はシナプスを形成していたが、欠損マウスでは40%の棘突起はシナプスを形成していなかった。以上のことからGluR  $\delta$  2分子はプルキンエ細胞の産生・移動・棘突起形成とは無関係であるが、GluR  $\delta$  2の分子機能は生後第2週に発現し、その結果、全てのプルキンエ細胞棘突起が平行線維終末との間にシナプス結合を完成することが判明した。また、プルキンエ細胞に発現する代謝型グルタミン酸受容体1型 (mGluR1) を欠損するマウスでは、平行線維シナプス形成は正常に起こるにもかかわらず登上線維シナプスの成熟が障害されていた。このことから、プルキンエ細胞シナプス形成において、GluR  $\delta$  2は代謝型グルタミン酸受容体とは本質的に異なる機能的役割を果たしているものと結論した。

この発表内容に対し長嶋教授から1) GluR  $\delta$  2欠損型での顆粒細胞の減少の機序、2) シ

ナプスの形成におけるGluR $\delta$ 2の役割, 3) シナプスの定量におけるセルソーターなどの利用の可能性について, 井上教授から4) GluR $\delta$ 2欠損マウスでの登上線維の成熟障害の理由について, 犬山教授より5) GluR $\delta$ 2欠損マウスで生後14日に平行線維シナプス異常の出現する理由について質問があった. これらの質問に対して申請者は次のように応答した. 1) 欠損マウスでは平行線維シナプスが減少することにより二次的に顆粒細胞が減少すると考えられる. Tunnel法を行ったパラフィン切片上のタネル陽性細胞数は生後14日以降欠損型に有意に増加するという未発表データより, 顆粒細胞数の減少は細胞死によると考えられる. 2) GluR $\delta$ 2はグルタミン酸を神経伝達物質としており, 放出されたグルタミン酸がポスト側を刺激することが形成段階のシナプス安定化に重要な役割を果たしている可能性を指摘した. 3) 電顕写真は基本的に線画であり周囲との明暗コントラストに乏しく, また複数種のシナプスが混在する生体内では自動計測は困難である. 4) 放射線を照射し顆粒細胞を死滅させたラット・Weaverマウス・Staggererマウスは平行線維シナプスの形成不全と登上線維シナプスの成熟障害という共通した表現型を有することから, 登上線維の成熟には正常な平行線維シナプスの形成が必要であると考えられきた. GluR $\delta$ 2欠損マウスにおいても, 一個のプルキンエ細胞が形成する平行線維シナプス数が野生型の約3分の2にまで減少していることから, 登上線維の成熟が二次的に障害されているものと考えられる. この見解を支持する所見として, GluR $\delta$ 2蛋白分子は平行線維と結合する棘突起に局在し, 登上線維と結合する棘突起には存在しないということが知られている. 5) GluR $\delta$ 2蛋白分子は生後14日になって棘突起に局在してくることが知られており, この時期にこの分子を機能たらしめる細胞・分子機構が確立してくることが理由として考えられる.

本論文は, グルタミン酸受容体 $\delta$ 2サブユニットが平行線維シナプスの形成過程において重要な役割を果たしているという事実を形態的に解明した点で極めて興味深い研究である. 連続電顕に基づく信頼性の高いデータをもとに論理を構築しており, 日本解剖学会, 日本神経科学会, 北米神経科学会およびJournal of neuroscienceに高い評価を受けている. 今後GluR $\delta$ 2のシナプスの安定化における分子生物学的機序が解明されることが期待される.

審査員一同は, これらの成果を高く評価し, 大学院課程における研鑽や修得単位などもあわせ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した.