

発達期運動ニューロンに特徴的な
NMDA 受容体サブユニットの発達パターン：
マウス舌下神経核における解析

学位論文内容の要旨

酸性アミノ酸のひとつであるグルタミン酸は、中枢神経系において速い興奮性シナプス伝達をになう主要な神経伝達物質である。N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体は、このシナプス伝達機構に関わるグルタミン酸受容体の主要なサブタイプのひとつであり、高い Ca^{2+} 透過性と電位依存性 Mg^{2+} ブロックを特徴とし、シナプスの発達や活動依存性のシナプス可塑性発現に重要な役割を果たしている事が明らかにされている。NMDA 受容体は、GluR ζ (NR1) サブユニットと GluR ϵ (NR2) サブユニットからなるヘテロメリックチャネルである。GluR ζ 1 (NR1) は前者を構成する唯一のサブユニットで、NMDA 受容体の機能発現に必須なサブユニットである。一方、後者は4種の分子亜型を有する受容体機能特性を決定するサブユニット群で、GluR ϵ 1 (NR2A)、GluR ϵ 2 (NR2B)、GluR ϵ 3 (NR2C)、GluR ϵ 4 (NR2D) と命名されている。中枢神経系での遺伝子発現において、GluR ζ 1 は発生段階から成熟段階に至るまで全てのニューロンに発現するが、4種の GluR ϵ は時間的にも空間的にも異なる調節を受けている。舌下神経核は、舌筋を支配する運動ニューロンが集まる延髄の脳神経核である。舌の運動は、吸啜・摂食・構音・呼吸運動など、重要な生体機能に関与している。例えば、哺乳類の新生児期の吸啜運動は、口唇付近への触覚刺激により惹起される反射運動であり、吸乳による栄養摂取に不可欠である。新生児期を過ぎると吸啜運動は消失し、舌筋の運動パターンは咀嚼運動へと次第に変化し、ヒトにおいては発語機能の獲得などにも重要となる。今回は、発達期の運動性神経核における NMDA 受容体サブユニットの発現変化を調べる目的で、舌下神経核を中心に in situ hybridization 法と免疫組織化学法により検討した。

C57BL/6J マウスの胎生 13、15、18 日、生後 1、7、14、21 日の新鮮脳をドライアイスにて急速凍結し、三叉神経運動核、顔面神経核、舌下神経核を含む脳幹を $20\mu\text{m}$ の冠状断凍結切片にした。NMDA 受容体サブユニット mRNAs の検出は、各サブユニッ

トに特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを放射性同位元素 S^{35} で標識し、それをプローブとする in situ hybridization 法により行った。また、C57BL/6J マウスの生後 1 日の舌下神経核を含む脳幹冠状断パラフィン切片を作成し、GluR ϵ 1 抗体を 1 次抗体として免疫蛍光法を用いて GluR ϵ 1 蛋白の検出を行った。さらに、MAP2、シナプトフィジン、GluR ϵ 2、GluR ζ 1 に対する抗体を用いて二重染色も行った。

GluR ϵ 1 mRNA の強い発現シグナルは胎生 15 日の舌下神経核に観察され、生後 14 日をピークとして以後減少傾向を示した。GluR ϵ 2 及び弱いながらも GluR ϵ 4 mRNA も同様の発現傾向を示したが生後成熟過程において消失した。これに対して、GluR ζ 1 mRNA の強い発現は胎生期から生後 21 日に至るまで観察された。クレシル紫による対比染色を行うと、GluR ϵ 1、GluR ϵ 2、GluR ϵ 4、GluR ζ 1 mRNA はクレシル紫陽性の大型の細胞に発現していたことから舌下神経運動ニューロンに発現していると考えられた。他の運動性脳神経核（顔面神経核、三叉神経運動核）においても、胎生期に舌下神経核と同様の NMDA 受容体 mRNAs の発現パターンが認められた。脳幹の運動神経核では、他の脳幹領域と比べると、胎生期から新生児期における GluR ϵ 1 の著明な発現が運動神経核に特徴的であった。そこで、抗 GluR ϵ 1 抗体を用いて、舌下神経核における蛋白局在を調べた。生後 1 日において、舌下神経核内のニューロン細胞体とニューロピルにして免疫反応が検出され、ニューロピルでは微細点状反応の構造物として観察された。ニューロンのマーカーである MAP2 と二重染色を行うと、GluR ϵ 1 の点状反応は MAP2 陽性の樹状突起の表面に位置するように観察された。神経終末のマーカーであるシナプトフィジンと二重染色を行うと、GluR ϵ 1 の点状反応はシナプトフィジン陽性の神経終末と近接して存在していた。また、GluR ϵ 1 と GluR ϵ 2、GluR ϵ 2 と GluR ζ 1 の二重染色を行うと、これらのサブユニットは共存していた。これらの事実は、舌下神経核ニューロンには GluR ϵ 1 が顕著に発現し、新生児期には既に GluR ϵ 1 を含む機能的な NMDA 受容体がシナプスに存在していることを示唆している。

胎生期から新生児期において舌下神経核に発現している NMDA 受容体サブユニットの発現パターンは成熟段階の海馬や大脳皮質に発現している NMDA 受容体サブユニットの発現パターンとほぼ同じである。海馬や大脳においては、NMDA 受容体は豊富に発現しており、シナプスの発達や可塑性発現に重要な役割を果たしていると考えられている。また、胎生期から新生児期の運動ニューロンに発現している NMDA 受容体についていくつかの重要な研究がなされている。灌流液中への NMDA 投与により、舌下神経核に吸啜運動様のリズミカルな群発活動が誘発される、胎生期の運動神経細胞死に関与している、運動ニューロンの樹状突起の発達や運動ニューロンの成熟に関与している、胎生期の筋紡錘—運動ニューロンのシナプスは NMDA 受容体によって調節される、などの報告がある。現在のところ発達期運動ニューロンに発現する

GluRε1 を含む NMDA 受容体がどのような生理的機能に関与しているかは不明であるが、本研究とこれらの実験的事実から、運動ニューロンの生存やシナプス回路発達、機能的な感覚運動反射弓の形成などに関わっている可能性が想定される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	小口	春久
副査	教授	赤池	忠
副査	教授	鈴木	邦明
副査	教授	渡辺	雅彦

学位論文題名

発達期運動ニューロンに特徴的な NMDA 受容体サブユニットの発達パターン： マウス舌下神経核における解析

審査は赤池、鈴木、渡辺および小口審査委員それぞれ個別に、学位申請者に対して提出論文の内容とそれに関連する学科目について口頭試問の形式によって行われた。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

学位申請者は、胎生 15、18 日、生後 1、14、21 日の C57BL/6J マウスを実験動物として使用し、NMDA 受容体サブユニットの発現を三叉神経運動核、顔面神経核、舌下神経核を含む脳幹部について調べた。mRNA の検出には各サブユニットに特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを放射性同位元素 S^{35} で標識し、それらをプローブとする *in situ hybridization* 法により行った。NMDA 受容体サブユニット蛋白の検出としては C57BL/6J マウスの生後 1 日の舌下神経核について、GluR ϵ 1 抗体を 1 次抗体として免疫蛍光法によって GluR ϵ 1 の検出を行った。さらに、MAP2、シナプトフィジンに対する抗体を用いて二重染色も行った。

以上の方法によって得られた結果は次のようである。GluR ϵ 1 mRNA の強い発現シグナルは胎生 15 日の舌下神経核に観察され、生後 14 日をピークとして以後減少傾向を示した。GluR ϵ 2 及び弱いながらも GluR ϵ 4 mRNA も同様の発現傾向を示したが生後成熟過程において消失した。これに対して、GluR ζ 1 mRNA の強い発現は胎生期から生後 21 日に至るまで観察された。クレシル紫による対比染色を行うと、GluR ϵ 1、GluR ϵ 2、GluR ϵ 4、GluR ζ 1 mRNA はクレシル紫陽性の大型の細胞に発現していたことから舌下神経運動ニューロンに発現していると考えられた。他の運動性脳神経核（顔面神経核、三叉神経運動核）においても、胎生期に舌下神経核と同様の NMDA 受容体 mRNAs の

発現パターンが認められた。脳幹の運動神経核では、他の脳幹領域と比べると、胎生期から新生児期における GluR ϵ 1 の著明な発現が運動神経核に特徴的であった。そこで、抗 GluR ϵ 1 抗体を用いて、舌下神経核における蛋白局在を調べた。生後1日において、舌下神経核内のニューロン細胞体とニューロピルにして免疫反応が検出され、ニューロピルでは微細点状反応の構造物として観察された。ニューロンのマーカーである MAP2 と二重染色を行うと、GluR ϵ 1 の点状反応は MAP2 陽性の樹状突起の表面に位置するように観察された。神経終末のマーカーであるシナプトフィジンと二重染色を行うと、GluR ϵ 1 の点状反応はシナプトフィジン陽性の神経終末と近接して存在していた。これらの事実は、舌下神経核ニューロンには GluR ϵ 1 が顕著に発現し、新生児期には既に GluR ϵ 1 を含む機能的な NMDA 受容体がシナプスに存在していることを示唆している。NMDA 受容体は、シナプス伝達機構に関わるグルタミン酸受容体の主要なサブタイプのひとつであり、高い Ca²⁺透過性と電位依存性 Mg²⁺ブロックを特徴としている。胎生期から新生児期において舌下神経核に発現している NMDA 受容体サブユニットの発現パターンは成熟段階の海馬や大脳皮質に発現している NMDA 受容体サブユニットの発現パターンとほぼ同じである。海馬や大脳においては、NMDA 受容体は豊富に発現しており、シナプスの発達や可塑性発現に重要な役割を果たしていると考えられている。また、胎生期から新生児期の運動ニューロンに発現している NMDA 受容体についていくつかの重要な研究がなされている。灌流液中への NMDA 投与により、舌下神経核に吸啜運動様のリズムカルな群発活動が誘発される、胎生期の運動神経細胞死に関与している、運動ニューロンの樹状突起の発達や運動ニューロンの成熟に関与している、胎生期の筋紡錘-運動ニューロンのシナプスは NMDA 受容体によって調節される、などの報告がある。現在のところ発達期運動ニューロンに発現する GluR ϵ 1 を含む NMDA 受容体がどのような生理的機能に関与しているかは不明であるが、本研究とこれらの実験的事実から、運動ニューロンの生存やシナプス回路発達、機能的な感覚運動反射弓の形成などに関わっている可能性が想定される、としている。

学位申請者に対して論文内容に関連する質問が行われたが、これらの質問に対しそれぞれ適切な回答が得られ、また、本研究は脳幹の運動ニューロンの発達に関与すると考えられる分子の局在について示したことが評価された。さらに、学位申請者は電子顕微鏡を使った解析など、さらに詳細な解析の準備を進めており、将来の展望についても評価された。

したがって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与に相応しい者と認められた。