

学位論文題名

NMDA 受容体  $\epsilon$  2 サブユニットは  
マウス体性感覚系バレル・バレレット構造の  
出現と臨界期終了を早める

学位論文内容の要旨

新生児期の吸啜運動は、口唇部への触覚刺激により惹起される感覚運動反射で、哺乳類の吸乳による栄養摂取とそれによる個体の生存と成長に不可欠な機能である。顔面や口唇からの体性感覚入力は、脳幹の三叉神経核を經由し、視床、大脳皮質体性感覚野へと伝達される。マウスなど齧歯類においては、顔面や口唇部の触覚毛(洞毛)の配列と相同な感覚脳地図の発達が著明で、大脳皮質体性感覚野ではバレル、視床ではバレロイド、脳幹三叉神経核ではバレレットとして形態学的に観察することができる。これらの構造は新生児期に出現し、出現後しばらくの間は末梢からの神経活動に依存して維持され(臨界期もしくは感受性期)、やがて神経活動に依存しない安定な構築となる。例えば、臨界期に相当する生後第1週に洞毛の除去や三叉神経切断などの処置を行うと、バレル構造は消失もしくは退縮するが、生後第2週以降に同様の処置を行ってもバレル構造は永続的に維持される。*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体は、体性感覚経路での主要なシナプス伝達に関わるグルタミン酸受容体のサブタイプのひとつである。高い  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性と電位依存性  $\text{Mg}^{2+}$ ブロックなど特異な機能特性を基盤として、NMDA 受容体は活動依存性のシナプス可塑性発現や発達段階における神経回路発達において重要な役割を果たしている。分子的には、NMDA 受容体は、 $\text{GluR}\zeta$ (NR1) サブユニットと  $\text{GluR}\epsilon$ (NR2) サブユニットから構成されるヘテロメリックチャンネルである。このうち、 $\text{GluR}\zeta$ 1 サブユニットは NMDA 受容体の機能発現に必須な基本サブユニットであり、4種の分子多形を有する  $\text{GluR}\epsilon$  サブユニット ( $\text{GluR}\epsilon$ 1~ $\text{GluR}\epsilon$ 4) は受容体機能特性を決定する調節サブユニットである。 $\text{GluR}\zeta$ 1 サブユニットは発達段階を通

して脳全体に広く発現するのに対して、4種の GluR $\epsilon$ サブユニットはそれぞれ異なる時間的・空間的発現調節を受けており、胎児期から新生児期の脳では GluR $\epsilon$ 2と GluR $\epsilon$ 4サブユニットが強く発現している。遺伝子操作により GluR $\epsilon$ 2サブユニットを欠損させたホモ欠損マウスは吸啜反射に障害があり、栄養摂取不全が原因となって生後数時間で死亡する。出生直後の脳幹三叉神経核の検索の結果、GluR $\epsilon$ 2欠損マウスではバレットが形成されていないことが判明した。これらの結果から、GluR $\epsilon$ 2サブユニットを含む NMDA 受容体は体性感覚系のシナプス構築の形成と新生児吸啜反射の発現に不可欠な役割を果たしていることが明らかとなった。しかし、GluR $\epsilon$ 2欠損マウスは生後まもなく死んでしまうことから、 $\epsilon$ 2サブユニットの生後発達における機能的役割は未だ不明である。本研究では、生存可能で生後の発達過程を追求可能な GluR $\epsilon$ 2ヘテロマウスと野生型マウスを比較することにより、大脳皮質バレルと三叉神経核バレットの形成におけるこのサブユニットの機能的役割を、特に出現時期と臨界期終了時期に着目して追求した。

C57BL/6 マウスに 10 代以上バッククロスを行った $\epsilon$ 2(+/-)ヘテロマウスと C57BL/6 マウスとの交配により得た同腹仔を実験動物として用い、1 晩の交配の翌日を胎生 0 日、出生日を生後 1 日とした。各個体の遺伝子型は尻尾 DNA を鋳型として PCR により確認した。生後 1 日から生後 10 日の右眼窩下神経を低温麻酔下で切断し、神経再生を防ぐため、切断端を電気メスで焼灼した。8 日間生存の後、灌流固定し、抜脳後に大脳皮質を取り外し後固定した後にマイクロスライサーで 40  $\mu$ m 厚の切片を作成した。三叉神経脊髄路核は、脳幹から取り出し 30% ショ糖溶液に浸漬した後、クライオスタットで冠状凍結切片 (30  $\mu$ m 厚) を作成した。バレル・バレット構造の酵素組織化学的検出を目的として、チトクロームオキシダーゼ酵素組織化学 (CO 染色) を行った。バレル・バレット出現時期と臨界期終了時期の判定は、障害側の大脳皮質第 4 層における 5 列部バレル、三叉神経脊髄路核における 5 列部バレットについて、それぞれの区画が明瞭に確認できた個体を臨界期が終わったものと判定し、その割合を神経切断処置を行った日齢ごとに比較した。

バレルの出現時期とバレット出現時期を CO 染色を用いて比較したところ、バレルは、野生型マウスで生後 5 日目に初めて現れ (50%)、6 日目には 100% のマウスで出現した。これに対し GluR $\epsilon$ 2 サブユニットが半減している $\epsilon$ 2(+/-)マウスでは、生後 6 日目に初めて出現し (50%)、7 日目に 100% となり、野生型に比べ約 1 日遅れていた。三

又神経核におけるバレットの出現も、野生型で生後 1 日目に全てのマウスで出現したのに対して GluR $\epsilon$ 2(+/-)マウスでは約一日遅れ、生後 2 日目に出現した。

臨界期の終了時期を判定したところ、生後 4 日において臨界期を終了したマウスの比率は 0 %であった。野生型マウスでは、生後 5 日目の神経切断において 50%の個体が臨界期を終了し、生後 6 日目切断までに 100%に達した。これに対して、 $\epsilon$ 2(+/-)マウスでは生後 6 日目の切断で臨界期を終了した個体が初めて出現したが、その比率は 50%にとどまり、生後 7 日目の切断において 100%に達した。この発達曲線から、50%のマウスでバレルの臨界期が終了する時期は、野生型マウスで生後 5.0 日、 $\epsilon$ 2(+/-)マウスで生後 6.0 日と算出され、 $\epsilon$ 2(+/-)マウスで 1 日遅れていることが判明した。野生型の信頼区間は  $5.0 \pm 0.4$ 、 $\epsilon$ 2(+/-)の信頼区間は  $6.0 \pm 0.3$  となり、カイ二乗検定より有意差が確認された。

三叉神経核でも同様の解析を行ったところ、生後 5 日目の眼窩下神経切断では野生型および $\epsilon$ 2(+/-)マウスの両方で障害側のバレットは全て消失した。野生型マウスでは生後 6 日目の神経切断で 43%の個体が臨界期を終了し、生後 9 日目切断までに 100%に達した。これに対して、臨界期を終了した $\epsilon$ 2(+/-)マウスの比率は、生後 6 日目の切断では 0 %、生後 7 日目で 42%、生後 10 日目で 100%に達した。50%のマウスでバレットの臨界期が終了する時期は、野生型で生後 6.3 日、 $\epsilon$ 2(+/-)マウスで生後 7.3 日となり、やはり $\epsilon$ 2(+/-)マウスで 1 日遅れていた。

これらのことから NMDA 受容体を構成する GluR  $\epsilon$ 2 サブユニット遺伝子が半減している $\epsilon$ 2(+/-)マウスと野生型マウスを用いて、三叉神経核のバレットと大脳皮質体性感覚野バレルの出現時期と臨界期終了時期を比較検討したところ、どちらの領域においても $\epsilon$ 2(+/-)マウスの出現時期と臨界期終了時期が約一日遅れていた。この結果から、GluR  $\epsilon$ 2 サブユニットが、バレルとバレットにおける活動依存的なシナプスリファインメント（パターン形成）とその保持における活動依存性からの脱却（臨界期の終焉）に関与しており、この分子機能と体性感覚系の成熟時期との関連性が示唆された。

## 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 吉 田 重 光  
副 査 教 授 渡 邊 雅 彦

学 位 論 文 題 名

### NMDA 受容体 $\varepsilon 2$ サブユニットは マウス体性感覚系バレル・バレレット構造の 出現と臨界期終了を早める

審査は赤池、吉田、渡邊および小口審査委員それぞれ個別に実施し、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、C57BL/6 マウスに 10 代以上バッククロスを行った  $\varepsilon 2 (+/-)$  ヘテロマウスと C57BL/6 マウスとの交配により得た同腹仔を実験動物として用いた。各個体の遺伝子型は尻尾 DNA を鋳型として PCR により確認した。生後 1 日から生後 10 日の右眼窩下神経を低温麻酔下で切断し、神経再生を防ぐため、切断端を電気メスで焼灼した。8 日間生存させた後、灌流固定し、抜脳後に大脳皮質を取り外し、後固定した後にマイクロスライサーで 40 $\mu\text{m}$  厚の切片を作成した。三叉神経脊髄路核は、脳幹から取り出し、30% ショ糖溶液に浸漬した後、クライオスタットで冠状断凍結切片 (30 $\mu\text{m}$  厚) を作成した。バレル・バレレット構造の酵素組織化学的検出を目的として、チトクロームオキシダーゼ酵素組織化学 (CO 染色) を行った。バレル・バレレット出現時期と臨界期終了時期の判定は、障害側の大脳皮質第 4 層における 5 列部バレル、三叉神経脊髄路核における 5 列部バレレットについて、それぞれの区画が明瞭に確認できた個体を臨界期が終わったものと判定し、その割合を神経切断処置を行った日齢ごとに比較した。

以上の方法によって得られた結果は次のとおりである。バレルは、野生型マウスで生後 5 日目に初めて現れ (50%)、6 日目には 100% のマウスで出現した。これに対し GluR $\varepsilon 2$  サブユニットが半減している  $\varepsilon 2 (+/-)$  マウスでは、生後 6 日目に初めて出現

し(50%)、7日目に100%となり、野生型に比べ約1日遅れていた。三叉神経核におけるバレットの出現も、野生型で生後1日目に全てのマウスで出現したのに対してGluR $\epsilon$ 2(+/-)マウスでは約一日遅れ、生後2日目に出現した。臨界期の終了時期を判定したところ、生後4日において臨界期を終了したマウスの比率は0%であった。野生型マウスでは、生後5日目の神経切断において50%の個体が臨界期を終了し、生後6日目の切断までに100%に達した。これに対して、 $\epsilon$ 2(+/-)マウスでは生後6日目の切断で臨界期を終了した個体が初めて出現したが、その比率は50%にとどまり、生後7日目の切断において100%に達した。この発達曲線から、50%のマウスでバレルの臨界期が終了する時期は、野生型マウスで生後5.0日、 $\epsilon$ 2(+/-)マウスで生後6.0日と算出され、 $\epsilon$ 2(+/-)マウスで1日遅れていることが判明した。野生型の信頼区間は $5.0 \pm 0.4$ 、 $\epsilon$ 2(+/-)の信頼区間は $6.0 \pm 0.3$ となり、カイ二乗検定より有意差が確認された。三叉神経核でも同様の解析を行ったところ、生後5日目の眼窩下神経切断では野生型および $\epsilon$ 2(+/-)マウスの両方で障害側のバレットは全て消失した。野生型マウスでは生後6日目の神経切断で43%の個体が臨界期を終了し、生後9日目切断までに100%に達した。これに対して、臨界期を終了した $\epsilon$ 2(+/-)マウスの比率は、生後6日目の切断では0%、生後7日目で42%、生後10日目で100%に達した。50%のマウスでバレットの臨界期が終了する時期は、野生型で生後6.3日、 $\epsilon$ 2(+/-)マウスで生後7.3日となり、やはり $\epsilon$ 2(+/-)マウスで1日遅れていた。これらのことから三叉神経核のバレットと大脳皮質体性感覚野バレルの出現時期と臨界期終了時期を比較検討したところ、どちらの領域においても $\epsilon$ 2(+/-)マウスの出現時期と臨界期終了時期が約一日遅れていた。この結果から、GluR $\epsilon$ 2サブユニットが、バレルとバレットにおける活動依存的なシナプスリファインメント(パターン形成)とその保持における活動依存性からの脱却(臨界期の終焉)に関与しており、この分子機能と体性感覚系の成熟時期との関連性が示唆された。としている。

学位申請者に対してNMDA受容体 $\epsilon$ 2の役割や、他の受容体との関係、中枢神経系におけるNMDA受容体の各機能特性などに関する質問が行われたが、これらの質問に対しそれぞれの受容体特性についての適切な回答が得られ、また、本研究はNMDA受容体のサブユニットが口腔領域体性感覚系の生後発達と成熟に関与していることを初めて明瞭にした点について評価された。さらに、学位申請者は視床や三叉神経主知覚核体性感覚野でのバレル構造の出現と臨界期終了の時間特性にNMDA受容体の各サブユニットがどのように関わっているのかについてもそれぞれのノックアウトマウスを用いて追求し、さらに発達期においてバレル構造の成熟に関わる因子の機能的な解析など、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。