

学位論文題名

マウス脳における Cbln ファミリーの発現と局在、
および小脳回路形成における生理機能の解明

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

Cbln は C1q/TNF (腫瘍壊死因子) スーパーファミリーに属する分子ファミリーで、現在までに Cbln1~Cbln4 の4種のサブタイプが同定されている。これらはホモメリックもしくはヘテロメリックな六量体として機能していると考えられており、小脳では Cbln1 のホモメリック複合体もしくは Cbln3 とのヘテロメリック複合体を形成し顆粒細胞から分泌される。Cbln1 遺伝子ノックアウトマウスでは、運動失調、平行線維-プルキンエ細胞シナプスにおける形成障害と長期抑圧の消失、登上線維のプルキンエ細胞に対する樹状突起支配の遠位化および多重支配の残存などの表現型が認められており、これらの表現型は、平行線維-プルキンエ細胞シナプスのシナプス後部に局在しているグルタミン酸受容体 GluR82 の遺伝子ノックアウトマウスのそれとほぼ一致している。この点から、平行線維-プルキンエ細胞シナプスの形成と可塑性において、Cbln1 は GluR82 と機能的な関連性や相互作用があると、現在想定されている。しかし Cbln ファミリーの遺伝子発現や分子局在、GluR82 との分子配置関係などはほとんど不明であった。そこで私は、Cbln ファミリーの分子解剖学的基盤を固め、さらに Cbln1 ノックアウトマウスを用いて小脳シナプス回路形成における分子機能を解明するための神経解剖学的研究を行うことにした。

【材料と方法】

野生型マウスおよび Cbln1 遺伝子ノックアウトマウスを用いて、以下の形態学的解析を行った。

- ・ *in situ* hybridization 法による遺伝子発現解析
- ・ ウサギおよびモルモットのポリクローナル抗体の作成
- ・ ペプシン処理法を含む蛍光免疫多重染色 (共焦点レーザー顕微鏡で検鏡)、および包埋前もしくは包埋後免疫電顕法による分子局在解析
- ・ 電顕法による超微構造の形態解析

【結果と考察】

in situ hybridization 法により Cbln ファミリーの遺伝子発現解析を行った。成熟脳では、Cbln1 の各サブタイプによってそれぞれ異なる空間的発現パターンを示した。興味深いことに、シナプス前ニューロンの小脳顆粒細胞で Cbln1 と Cbln3 が豊富に発現している一方で、シナプス後ニューロンのプルキンエ細胞ではいずれのサブタイプも発現していなかった。このような発現特性は、海馬、線条体、下丘への投射系など他の脳領域でも認められた。これらの事実は、投射元から分泌される Cbln 分子がこれを発現しないシナプス後ニューロンのシナプス回路の発達や可塑性を制御している可能性を示唆する。発達期の脳では、Cbln1、Cbln2、および Cbln4 の各 mRNA は胎生 13 日頃には既に発現が開始されており、シナプス形成が活発になる胎生後期から新生児期にかけて一過性に発現量が増加する傾向が認め

られた。さらに、Cbln2 mRNA は発達期の脳皮質の皮質板において、吻側から尾側へ、また内側から外側への勾配を伴った発現を示していた。一方、Cbln3 の発現開始時期は他から遅れて、生後 7-10 日目であった。これらの所見は、胎児期の段階から Cbln ファミリーがそれぞれの領域に応じた発現を維持すると同時に、特定の脳領域では放出される Cbln 複合体の構成や量がシナプス形成時期に変化することも示唆する。

分子局在解析では、Cbln1 と Cbln3 に対して特異的に結合するポリクローナル抗体を作成し、小脳において免疫組織化学的解析を行った。通常の免疫組織化学的解析では、Cbln1 の免疫反応は小脳分子層において平行線維の軸索膜上に豊富に分布していたが、Cbln3 の免疫反応は分子層では弱く、Cbln1 の分布ともほとんど重ならなかった。一方、ペプシン処理や包埋後免疫電顕などの抗原露出法を用いた免疫組織化学的解析では、分子層における Cbln1 の免疫反応は増強されただけでなく、Cbln1 が平行線維-プルキンエ細胞シナプスのシナプス間隙に密に集積していることが判明した。同様に、Cbln3 の分子層における免疫反応も飛躍的に増大し、平行線維-プルキンエ細胞シナプスで Cbln1 と共局在していることが明らかになった。さらに、Cbln1 と Cbln3 は共に、平行線維-プルキンエ細胞シナプスにおいて GluR82 の免疫反応ともほぼ完全に重なり、このシナプスの垂直分布解析でも 3 者が非常に近い位置関係にあることが明らかになった。この観察結果は、Cbln 複合体と GluR82 とが平行線維-プルキンエ細胞シナプスに集積しここで相互作用することにより、このシナプス形成促進作用を発揮する重要な解剖学的基盤になるものと思われる。

Cbln1 遺伝子ノックアウトマウスの小脳分子層を電顕で観察したところ、このノックアウトマウスでは、プルキンエ細胞の全スパインの 78% が平行線維とシナプス結合していないフリースパインとなり、14% はシナプスの前部と後部の接着がずれる mismatch シナプスになっていた。これらのシナプス形成異常は、GluR82 ノックアウトマウスのそれと基本的に同一であった。このノックアウトマウスの小脳に組換え Cbln1 を投与すると、正常な平行線維-プルキンエ細胞シナプス形成が投与後数時間から 2~3 日という短時間で回復した。しかし、その後徐々にシナプスは外れるようになり、投与後 1 ヶ月で投与前の状態に戻った。この実験結果は、Cbln1 が発達期小脳におけるシナプス形成を強力に促進するとともに、成体期におけるシナプス結合の維持に不可欠な役割を果たしていることを物語っている。

【結論】

これらの研究を通して、Cbln1 と Cbln3 は顆粒細胞に発現して平行線維-プルキンエ細胞シナプスのシナプス間隙に選択的に集積し、そこでこのシナプスの形成と維持を制御していることが明らかとなった。恐らく、このシナプスにおける Cbln 複合体と GluR82 の直接的もしくは間接的な相互作用を基盤として、この分子機能発揮しているものと推定される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 雅 彦
副 査 教 授 神 谷 温 之
副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

マウス脳における Cbln ファミリーの発現と局在、 および小脳回路形成における生理機能の解明

Cbln ファミリーは現在までに Cbln1~Cbln4 の 4 種のサブタイプが同定されている。これらはホモメリックもしくはヘテロメリックな六量体として機能していると考えられており、小脳では Cbln1 のホモメリック複合体もしくは Cbln3 とのヘテロメリック複合体を形成し顆粒細胞から分泌される。しかし Cbln ファミリーの遺伝子発現や分子局在などはほとんど不明であった。本研究では、Cbln ファミリーの分子解剖学的基盤を固め、さらに Cbln1 ノックアウトマウスを用いて小脳シナプス回路形成における分子機能を解明するために神経解剖学的研究を行った。

in situ hybridization 法により Cbln ファミリーの遺伝子発現解析を行ったところ、成熟脳では、Cbln1 の各サブタイプによってそれぞれ異なる空間的発現パターンを示した。興味深いことに、シナプス前ニューロンの小脳顆粒細胞で Cbln1 と Cbln3 が豊富に発現している一方で、シナプス後ニューロンのプルキンエ細胞ではいずれのサブタイプも発現していなかった。次に、Cbln1 遺伝子ノックアウトマウスの小脳分子層を電顕で観察したところ、このノックアウトマウスでは、プルキンエ細胞の全スパインの 78%が平行線維とシナプス結合していないフリースパインとなり、それともなって正常シナプスが大幅に減少していた。このノックアウトマウスの小脳に組換え Cbln1 を投与すると、正常な平行線維-プルキンエ細胞シナプス形成が投与後数時間から 2~3 日という短時間で回復した。しかし、その後徐々にシナプスは外れるようになり、投与後 1 ヶ月で投与前の状態に戻った。これらの実験結果は、Cbln1 が発達期小脳におけるシナプス形成を強力に促進するとともに、成体期におけるシナプス結合の維持に不可欠な役割を果たしていることを物語っている。分子局在解析では、Cbln1 と Cbln3 に対して特異的に結合するポリクローナル抗体を作成し、小脳において免疫組織化学的解析を行った。通常の免疫組織化学的解析では、Cbln1 の免疫反応は小脳分子層において平行線維の軸索膜上に豊富に分布していたが、Cbln3 の免疫反応は分子層では弱く、Cbln1 の分布ともほとんど重ならなかった。一方、ペプシン処理や包埋後免疫電顕などの抗原露出法を用いた免疫組織化学的解析では、分子層における Cbln1 の免疫反応は増強されただけでなく、Cbln1 が平行線維-プルキンエ細胞シナプスのシナプス間隙に密に集

積していることが判明した。同様に、Cbln3 の分子層における免疫反応も飛躍的に増大し、平行線維-プルキンエ細胞シナプスで Cbln1 と共局在していることが明らかになった。この Cbln1 の発現・局在は、平行線維-プルキンエ細胞シナプスのシナプス後部に局在しているグルタミン酸受容体 GluR82 非常に良く似ており、蛍光多重染色において Cbln1 と Cbln3 とが平行線維-プルキンエ細胞シナプスにおいて GluR82 と共存し、金コロイド標識免疫電顕におけるシナプスの垂直分布でも 3 者が非常に近接した位置関係にあることが明らかになった。Cbln1 ノックアウトマウスと GluR82 ノックアウトマウスの表現型が非常に良く似ていることも考慮にいと、これらの観察結果は、Cbln 複合体と GluR82 とが平行線維-プルキンエ細胞シナプスに集積しここで相互作用することにより、このシナプス形成促進作用を発揮していると思われた。

公開発表にあたり、副査の吉岡充弘教授より、Cbln1 が顆粒細胞外へ分泌される理由およびその過程や様式、またポストシナプスにおける Cbln1 受容体などの有無についての質問があった。副査の神谷温之教授より、Cbln1 ノックアウトマウスにおける平行線維終末の分布・形態の異常の有無、Cbln1 の平行線維軸索膜上における局在の意味（機能）、また他の脳領域における Cbln 分子の機能について質問があった。最後に主査である渡辺雅彦教授より、Cbln1 ノックアウトマウスと GluR82 ノックアウトマウスにおけるフリースパインの割合の差から予想される両者の関係性や機能についての申請者の考えを求められた。いずれの質問に対しても、申請者は学位論文の背景および本研究の経過と結果について詳細な説明を交え、最新の知見を引用し、妥当な回答をした。

この論文は Cbln ファミリーの遺伝子発現、細胞内局在、および生理機能の一端を免疫組織化学的に明らかにした点で高く評価され、今後 Cbln ファミリーの更なる生理機能解明につながることを期待される。

審査員一同は、これらの成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。