

体性感覚野バレル領域における カルシニューリンの分子局在

学位論文内容の要旨

【緒言】 カルシニューリン (calcineurin; CN) は、カルシウム/カルモジュリン依存性セリン・スレオニンプロテインホスファターゼであり、脳では高レベルに発現している。CN は、58~64kDa でカルモジュリン結合を有する触媒サブユニット Calcineurin A (CNA) と、19kDa で Ca^{2+} 結合部位を有する調節サブユニット CalcineurinB (CNB) からなるヘテロ二量体である。脳の CN は $\text{CNA}\alpha$ 、 $\text{CNA}\beta$ 、CNB1 のサブユニットが発現している。活動依存的な脳機能発現とシナプス回路発達の基盤となる細胞メカニズムが、シナプス可塑性であると現在考えられている。シナプス可塑性には、神経の活動頻度や活動パターンに応じてシナプスの伝達効率が増強する長期増強と減弱する長期抑圧があり、NMDA 型グルタミン酸受容体を介するカルシウムイオン流入がその引き金となる。CN は、このような細胞内カルシウムイオン濃度上昇に際して活性し、1 型タンパク脱リン酸化酵素 (PP1) を活性化して CaMK II の脱リン酸化を促進することにより、シナプス上の AMPA 型グルタミン酸受容体の数が減少して長期抑圧がおこると考えられている。発達過程においても、NMDA 受容体は、顔面の洞毛に対応する中枢バレルの構築に必須の役割を果たしている。洞毛 1 本 1 本に由来する体性感覚神経は、その情報処理のためシナプスの集合形態としてのモジュール構造をつくり、大脳皮質体性感覚野の第 4 層に形成される構造はバレルとよばれる。NMDA 受容体欠損マウスではこのバレル構造が形成されないことから、その形成過程に CN などシナプス可塑性を制御する分子が関与していることが想定されている。しかし、バレルにおける CN の発現や局在についてはほとんど不明である。今回の研究では、マウス大脳皮質バレル領域における CN サブユニットを免疫組織化学的に検討した。

【材料と方法】 C57BL/6J 野生型成マウスを使用し、抗体は $\text{CNA}\alpha$ 、 $\text{CNA}\beta$ 抗体、CNB1 抗体、VGLUT1 抗体、VGLUT2 抗体、VGAT 抗体、GLT1 抗体、微小管関連タンパク MAP2 抗体、GAD 抗体を用いた。免疫組織化学は以下の手順で行った。マウスは十分な麻酔下において灌流固定し、冠状断切片を作成した。蛍光抗体法においては、一次抗体及び二次抗体で染色し共焦点レーザー顕微鏡にて画像の撮影を行った。金コロイド銀増感免疫電顕法においては、一次抗体及び金コロイド標識二次抗体と反応させた後、超薄切片を作成した。画像は H-7100 にて撮影した。

【結果】

共焦点レーザー顕微鏡を用いた光顕免疫組織化学： 大脳皮質第 4 層バレル領域における CN の分布を共焦点レーザー顕微鏡法を用いて検討した。CN の発現は、ほぼ同様の所見を示した。強い免疫反応は、細胞体と樹状突起の内部およびシナプスが集積するニューロピルにおいて観察された。ニューロンの細

胞体と樹状突起に選択的な中間径フィラメント MAP2 との 2 重染色では、MAP2 陽性の樹状突起の表面や内部において CN の点状反応が観察され、MAP2 との共存を示す黄色の融合色を呈した。皮質由来の興奮性シナプス前終末のマーカである VGLUT1 との 2 重染色では、CN 陽性の強い点状反応は VGLUT1 陽性の終末の内部ではなく、むしろその近傍や境界領域に観察された。一方、視床からの興奮性シナプス前終末のマーカである VGLUT2 との 2 重染色では、CN 陽性の点状反応と VGLUT2 陽性の点状反応とは重ならなかった。抑制性ニューロンのマーカである GAD との 2 重染色では、GAD 陽性の樹状突起の表面において、微弱な CN 陽性の反応が観察された。抑制性神経終末のマーカである VGAT との 2 重染色では、VGAT 陽性の軸索終末には CN の反応はほとんど検出されなかった。アストログリアのマーカである GLT1 との 2 重染色では、CN 陽性の点状反応は、GLT1 陽性のアストログリアには観察されなかった。

免疫電子顕微鏡法： CN の局在を示す金コロイドはシナプス後部となる樹状突起に多かった。樹状突起は、スパインを有する樹状突起を興奮性ニューロンの樹状突起、スパインに乏しく樹状突起幹に非対称性のシナプスを形成するものを抑制性ニューロンの樹状突起と判断した。いずれの分子も興奮性ニューロンの樹状突起とスパインに豊富であった。抑制性ニューロンの樹状突起では、興奮性ニューロンのそれに比べ、半数程度のレベルであった。弱いながら、終末にも分布していた。いずれの分子も、軸索やグリアにはほとんど発現がみられなかった。これらの所見は、バレル領域に発現する CN が種々の神経要素に分布することを示すと同時に、興奮性ニューロンのシナプス後部要素に特に豊富であることを示している。

【考察】 今回、バレル領域の体性感覚ニューロンにおける CN の発現を解析する目的で、マウス大脳皮質 1 次体性感覚野第 4 層を免疫組織化学法により検討した。その結果 CN は広範囲な細胞発現と細胞内分布を示すとともに、興奮性ニューロンのシナプス後部要素に豊富であることが明らかとなった。シナプス後部の役割は、シナプス前部から放出される神経伝達物質と結合しそのシグナルをポスト側に伝えることである。シナプス後部の細胞膜上には神経伝達物質をリガンドとする受容体を発現している。これまで、CN は受容体、特にグルタミン酸受容体である NMDA 受容体や AMPA 受容体の機能制御に重要な役割を果たしていることが報告されている。CN は、NMDA 受容体チャネルの開口時間を短くしたり、NMDA 受容体の脱感作を高めることが知られている。NMDA 受容体はシナプス伝達効率の長期増強や長期抑圧として知られるシナプス可塑性においても重要な役割を果たしており、CN の存在は長期抑圧の発現を促進する。さらに NMDA 受容体の活性化には AMPA 受容体の開口による強い脱分極が必要であり、NMDA 受容体を介する Ca イオン流入は CN の酵素活性制御に関わっている。以上の事実を考え合わせると、興奮性ニューロンのシナプス後部に豊富な CN は、NMDA 受容体や AMPA 受容体などのグルタミン酸受容体と相互作用することにより、シナプス伝達やシナプス可塑性に重要な役割を果たしているものと解釈することができる。今回の観察結果は、上述のように、シナプス後部の CN が NMDA 受容体や AMPA 受容体などのグルタミン酸受容体の反応性制御に、シナプス前部の CN が伝達物質の放出機能制御に関わるとするこれまでの報告に対して分子解剖学的基盤を与えるものである。また、バレル形成における神経活動依存的なシナプス回路発達においてもシナプス後部の NMDA 受容体が必須の役割を果たしていることを考え合わせると、興奮性ニューロンの樹状突起やスパインに豊富な CN がその発達の役割も演じている可能性を示唆する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 八 若 保 孝

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 船 橋 誠

副 査 教 授 渡 邊 雅 彦 (医学研究科)

学 位 論 文 題 名

体性感覚野バレル領域における

カルシニューリンの分子局在

審査は2回に分けて行われた。まず八若、鈴木、船橋審査担当委員の3名同席により実施し、その後渡辺審査委員による審査が行われた。どちらも、学位申請者に対して提出論文の内容及び関連する学科目について口頭試問により行われた。

以下に提出論文の要旨と審査の内容を記す。

学位申請者は、体性感覚野ニューロンにおけるカルシニューリン (CN) の発現を明らかにする目的で、マウス大脳皮質バレル領域を免疫組織化学的に検討した。まず、大脳皮質第4層における CN の分布を蛍光抗体法および共焦点レーザー顕微鏡法を用いて検討した。CNAa、CNAb、CNB1 の発現はほぼ同様の所見を示し、その免疫反応は細胞体や樹状突起の内部とシナプスが集積するニューロピルで観察された。ニューロンの細胞体と樹状突起に特異的な中間径フィラメント MAP2 との2重染色では、MAP2 陽性の樹状突起の表面において CNAa、CNAb、CNB1 の点状反応が観察された。皮質由来の興奮性シナプス前終末のマーカである VGLUT1 との2重染色では、CNAa、CNAb、CNB1 陽性の反応は、VGLUT1 陽性の反応と近接して隣り合い、その境界領域が黄色の融合色を示した。これらの所見は、バレル領域に発現する CN が、主に樹状突起などのシナプス後部で、しかも神経終末に近接した部位に発現していることを示唆した。次に、包埋前免疫電子顕微鏡法を行った。CNAa、CNAb、CNB1 のいずれも、その局在を示す金コロイドはシナプス後部となる樹状突起に多かった。特に、興奮性ニューロンの樹状突起に最も豊富に観察され、スパイン内部にも豊富であった。一方、抑制性ニューロンの樹状突起では、興奮性のそれに比べ少なかった。また、神経終末にもわずかに観察された

が軸索やグリアにはほとんど発現がみられなかった。今回の解析から、CN が主にシナプス後部に豊富であることが明らかとなった。シナプス可塑性の多くが、シナプス後部のグルタミン酸受容体の活性化を引き金として起こることを考慮すれば、CN がその下流の細胞内過程に参与していることを強く示唆する。また、記憶や学習などの素過程としてのシナプス可塑性や、バレル形成などの活動依存的なシナプス回路改築において、主に興奮性ニューロンに起こる現象であることを考慮すれば、興奮性ニューロンの樹状突起やスパインに豊富な CN がその重要な役割を果たしていることが示唆された。

学位申請者に対しての口頭試問では、本論文の内容とそれに関連した学問分野について質疑応答がなされた。主な質問内容を以下に記す。

1. シナプス可塑性における NMDA 受容体の役割について
2. 長期抑圧における NMDA 受容体と AMPA 受容体の役割について
3. 2 量体であるカルシニューリンの CNA と CNB の関係と役割について
4. バレル構造の特徴と形成および各バレル間の interaction について
5. バレル形成へのカルシニューリンの関与について
6. Lateral inhibition について
7. ヒゲの感受性の発達（1 対 1 対応）における変化の過程について
8. 免疫電顕における金コロイド粒子の分布と量的計測の可能性について
9. カルシニューリンが興奮性ニューロンに多く存在したことの意義について
10. 全身におけるカルシニューリンの分布と役割について（今後の展望として）

など多岐にわたる内容であった。これらの質問に対し、申請者からいずれの質問に対してもそれぞれ適切な回答が得られた。回答の過程で、実験手技を含めた詳細な内容についても熟知していることが示され、申請者が関連する分野について幅広い知識を有しており、研究の立案と進行、結果の解析について十分な能力を有していることが明らかになった。さらに本研究の発展を見据えた今後の展望についての具体的な提示が申請者から示された。

本研究は、体性感覚野バレル領域におけるカルシニューリンの分子局在を明らかにした点が評価された。

以上のことから、審査担当者全員が、本研究が学位論文に十分に値し、申請者は博士（歯学）の学位授与に十分な学識・資質を有しているものと認めた。