

論文の内容の要旨

論文題目：Functional role of NMDA receptor down-regulation
at an auditory relay synapse in developing mice

和訳：聴覚中継シナプスにおける生後発達に伴う
NMDA 型グルタミン酸受容体発現調節の機能的役割

指導教官： 高橋 智幸教授

東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻

平成9年4月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名： 二井 健介

聴覚神経系において音源定位は重要な機能の1つであり、左右の蝸牛より得られる聴覚情報を比較することによってなされる。脳幹の台形体内側核(MNTB)ニューロンはこの機能に関与していることが知られている。MNTBは反対側の蝸牛前神経腹側核(AVCN)よりグルタミン酸作動性の興奮性入力を受けており、自身は主に同側の上オリーブ核(LSO)へグリシン作動性の抑制性投射をしている。またLSOニューロンは同側のAVCNニューロンよりグルタミン酸作動性の興奮性投射を受けている。したがってLSOニューロンは同側のAVCNから興奮性入力を受け、反対側のAVCNからはMNTBを介し抑制性入力を受ける。両入力の強度差から、LSOニューロンは両側聴覚刺激間の音圧差を検出することが出来る。この音源定位の神経回路において、MNTBは信号の極性を興奮性から抑制性に反転させるための中継核として機能しているため、MNTBにおける信号伝達はシグナルを歪めることなく高い信頼性を持って行なわれなければならない。

AVCNニューロンはMNTBニューロンの細胞体上にcalyx of Heldと呼ばれる巨大神経末端を形成している。幼若げっ歯類におけるcalyx-MNTB間シナプス伝達はMNTBニューロン上のnon-NMDA型グルタミン酸受容体(non-NMDAR)とNMDA型グルタミン酸受容体(NMDAR)の両者を介して行なわれることが既に知られている。non-NMDARは時間経過の非常に速い応答をし、速い興奮性伝達を担っているが、NMDARは時間経過の遅い応答をする

ため、この受容体応答が高い信頼性を必要とする calyx-MNTB シナプスにどのように関与しているか疑問である。NMDAR は生後発達に伴い発現が大きく変化することが知られていたため、私は本研究において主に NMDAR の生後発達に伴う発現変化に着目し、この変化が calyx-MNTB シナプスの高信頼性伝達能にどのような影響を及ぼすか検討した。生後日齢 5 日～27 日(P5～27)の C57BL マウスから、厚さ 200～250 μm の脳幹横断スライスを作成した。双極電極を用いて AVCN ニューロンより投射している軸索線維を 0.1Hz で細胞外刺激し、誘発される興奮性シナプス後電位(EPSP)をホールセル記録法を用いて MNTB ニューロンより記録した。測定は 26～27 $^{\circ}\text{C}$ で行ない、抑制性シナプス応答は picrotoxin(100 μM)と strychnine(0.5 μM)によって阻害した。P7 の MNTB ニューロンは入力線維の単発刺激に対して 1 つの活動電位を含む早い応答とそれに引き続いた時定数の遅い脱分極応答を示した。前者は non-NMDAR の 1 つである AMPA 受容体(AMPA)に選択的な拮抗剤の GYKI52466(100 μM)投与によって消失した。後者はさらに NMDAR 選択的な拮抗剤の D-APV(50 μM)を投与することによってほぼ完全に消失した。したがって EPSP は AMPA と NMDAR を介した脱分極応答からなることが確認された。次に P7,P13-15,P27 の 3 グループの MNTB ニューロンに対し 20～100Hz の高頻度刺激を行い、これらのニューロンが高頻度入力に対しどのような応答を示すか検討した。若齢期(P7, P13-15)のニューロンでは刺激に同期しない活動電位が観測され、P7 においては 100Hz の刺激を行なうと大きな脱分極を引き起こし、活動電位を誘発出来ないニューロンが存在した。しかし、P27 ニューロンにおいては活動電位は全て刺激に同期して生じ、高信頼性のシナプス伝達が確立されていた。刺激に同期して活動電位を生じる割合を求めたところ、生後発達に伴い信頼度は全ての刺激頻度において上昇した。したがって、calyx-MNTB シナプスにおいて高信頼性の伝達機構は生後発達に伴って形成されると結論された。

若齢期において、刺激に同期しない異常な活動電位を誘発する原因は NMDA 型受容体を介するゆっくりとした脱分極の蓄積によって起こると考えられる。そこで若齢ニューロンにおける高頻度刺激時の応答が NMDAR の拮抗剤 D-APV(50 μM)の影響を受けるか検討した。D-APV の存在下では、異常な発火もしくは活動電位の消失を示した若齢期のニューロンは全て刺激に同期した活動電位のみを誘発した。つまり幼若ニューロンにおいても NMDAR を阻害すると高信頼性のシナプス伝達が獲得されたことが示された。P27 ニューロンには D-APV の投与は影響を及ぼさなかった。これらの結果から若齢期の高信頼性伝達の抑制には NMDAR の存在が寄与しており、高信頼性シナプス伝達の獲得には生後発達に伴う NMDAR の発現減少が関与していると考えられる。

発達に伴う NMDAR の変化を直接的に検討するため、ホールセル電位固定法

により NMDAR と AMPAR を介するシナプス後電流(EPSC)を生後発達を追って記録した。NMDA-EPSC の振幅は若齢期(P5-7)に最大値を示し、生後 2 週間までに急速に減少し P27 では P5 の振幅値の 5%にまで減少した。一方 AMPA-EPSC の振幅値は生後発達とともに増大し P11 でほぼ一定値に達した。また、AMPA-EPSC の decay time constant と rise time は生後発達とともに急速に減少し、生後 2 週間で一定値に達した。よって高信頼性シナプス伝達の獲得は NMDA 受容体応答の生後発達に伴う減少が寄与していると結論された。AMPA 応答の生後発達に伴う kinetics 変化も高信頼性獲得に寄与している可能性が考えられる。

次に NMDAR-EPSC の減少が NMDAR 分子の発現変化を反映しているか NMDA 受容体の $\zeta 1$ サブユニットと $\epsilon 1/2$ サブユニットをコードする mRNA 量を RT-PCR 法により生後日齢を追って測定した。 $\zeta 1$ 、 $\epsilon 1/2$ 両サブユニットとも生後発達に伴い発現量の減少が見られた。またタンパク発現量も $\zeta 1$ 、 $\epsilon 1$ 、2サブユニット特異的な抗体を用いて解析したところ、全てのサブユニットタンパク発現量が P5 から P13 にかけて急速に減少した。両解析と MNTB 領域の組織片を用いて行なった。したがって NMDAR 応答の減少は mRNA とタンパク発現量の減少によると結論された。

以上の結果より NMDA-EPSC の性質は生後 2 週間で大きく変化することが明らかとなった。マウスにおける聴力開始は P10-12 の間に起こるので、シナプス成熟と聴力開始には因果関係がある、つまり聴覚刺激により NMDAR 減少が生じている可能性が考えられる。この可能性を内耳破壊をしたマウスを用いて検討した。P7 で両内耳を破壊し、P13 に Auditory Brainstem Response (ABR) を測定し耳が聞えないことを確認した後、P14-16 で解析を行った。シャム手術をしたマウスをコントロールとした。すると破壊マウスの 50Hz の高頻度刺激に対するシナプス伝達信頼度はコントロールマウスに対し低く有意な差であった。また、AMPA-, NMDA-EPSC を計測したところ、AMPA-EPSC の振幅値は有意な差が無かったが、NMDA-EPSC 振幅値はコントロールマウスに対し大きく、有意であった。NMDA 受容体の mRNA 発現量を比較したところ、 $\zeta 1$ サブユニットの発現量には有意な差がなかったが、 $\epsilon 1/2$ サブユニットの発現量はコントロールマウスに対し高く維持され、有意であった。つまり聴覚入力消失により、高信頼性シナプス伝達の獲得と NMDAR の生後発達に伴う発現減少は抑制された。したがって、NMDAR の生後発達に伴う減少は聴覚刺激依存的に起こる事が示唆された。

以上の結果より、calyx-MNTB シナプスは生後発達と共に高信頼性の信号伝達能を獲得し、それには NMDAR の発達に伴う発現減少が寄与していることが明らかとなった。さらに、NMDAR 減少は聴覚入力依存的に起こることが明らか

かとなった。