

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 二 井 健 介

本研究は聴覚神経系において高信頼性のシナプス伝達が必要と考えられる聴覚中継シナプス(Calyx-MNTB シナプス)において NMDA 型グルタミン酸受容体の生後発達に伴う発現調節の機能的役割を、マウス脳幹スライス(生後日齢 5~27 日(P5~27))を用い電気生理学的、分子生物学的に解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 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。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ことが示された。

2. 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 μ M)の影響を受けるか検討したところ、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。したがって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ことが示された。

3. 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た。

4. 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ところ、 $\zeta 1$ 、 $\epsilon 1/2$ 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。両解析とも 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。

5. 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、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、 $\epsilon 1/2$ 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た。つまり聴覚入力の消失により、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の少なくとも一部は聴覚刺激依存的に起こる事が示唆された。

以上、本論文はマウス聴覚中継シナプスにおいて NMDA 型グルタミン酸受容体の生後発達に伴う発現減少が高信頼性シナプス伝達獲得に寄与していることを明らかとした。そして NMDA 型受容体の発現減少の一部は聴覚刺激依存的に起こることが明らかとなった。本研究はこれまで余り明らかとなっていなかった NMDA 受容体の生後発達に伴う発現変化の機能的役割を明らかにしたものであり、学位の授与に値するものと考えられる。