

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 三國 貴康

本研究は、発達期小脳における神経活動依存的な登上線維-プルキンエ細胞シナプスの刈り込みの細胞分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。まず、このメカニズム解明に有用な *in vitro* 延髄-小脳共培養系を確立し、この共培養系を用いて、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの刈り込みにおける神経活動に関連する分子の役割を解析した。さらに、この共培養系の実験で得られた結果が生体内でも認められるものかどうかを確認した。これらの解析により、下記の結果を得た。

1. 生後 10 日齢のマウスの小脳スライスと胎生 15 日目のラットの延髄ブロックを共培養したところ、培養 1 週間後には延髄ブロック由来の登上線維が小脳スライス内のプルキンエ細胞にシナプスを形成し、続く 1 週間の間に登上線維-プルキンエ細胞シナプスの刈り込みが起こっていることが示された。
2. 登上線維-プルキンエ細胞シナプスの刈り込みに関わると報告されている $\delta 2$ 型グルタミン酸受容体を、共培養中のプルキンエ細胞においてレンチウイルスベクターを用いてノックダウンしたところ、ノックダウンされたプルキンエ細胞ではシナプスの刈り込みが障害されていた。この結果により、延髄-小脳共培養系におけるシナプス刈り込みの分子メカニズムは生体内と同様であり、この共培養系はシナプス刈り込みのメカニズムを解明する上で有用な系であることが示された。
3. 延髄-小脳共培養中のプルキンエ細胞に青色光で開くチャネルロドプシン-2 を発現させ、2 日間にわたって青色光を照射してプルキンエ細胞の活動を上昇させたところ、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの刈り込みが促進された。一方、P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルをノックダウンしたうえでプルキンエ細胞を 2 日間にわたってチャネルロドプシン-2 刺激を行ったところ、シナプスの刈り込みは促進されなかった。これにより、P/Q 型カルシウムチャネルは神経活動依存的なシナプスの刈り込みの促進に必要であることが示された。
4. 神経活動依存的な発現を示す分子として *Arc* (*Arg3.1*) に着目し、発達期小脳における *Arc* の mRNA 量をリアルタイム PCR で解析したところ、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの刈り込みが起こる時期に *Arc* の発現は上昇していた。また、*Arc* プロモーター下で蛍光タンパク *Venus* を発現するレポータートランスジェニックマウスの小脳スライスを用いて延髄-小脳共培養を作成し、培養内の神経活動を亢進させたところ、

主にプルキンエ細胞で Arc の発現上昇を認めた。さらに、P/Q 型カルシウムチャネルの阻害薬投与やプルキンエ細胞特異的なノックダウンにより、プルキンエ細胞における神経活動依存的な Arc の発現上昇は阻害された。これらの結果から、Arc はプルキンエ細胞において神経活動依存的に発現し、この発現にはプルキンエ細胞の P/Q 型カルシウムチャネルが必要であることが示された。

5. 延髄 - 小脳共培養中のプルキンエ細胞において Arc をノックダウンすると、登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの刈り込みが障害された。これにより、Arc が登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの刈り込みに必要であることが示された。
6. プルキンエ細胞において Arc をノックダウンした上で、プルキンエ細胞を 2 日間にわたってチャンネルロドプシン-2 刺激を行ったところ、登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの刈り込みは促進されなかった。これにより、Arc は神経活動依存的なシナプスの刈り込みの促進に必要であることが示された。
7. 生後 2-3 日齢のマウス小脳にレンチウイルスベクターを注入して Arc をノックダウンし、生後 3 週以降で急性小脳スライスを解析したところ、Arc をノックダウンしたプルキンエ細胞において登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの刈り込みが障害されていた。これにより、Arc は *in vivo* においても登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの刈り込みに必要であることが示された。

以上、本論文では、まず、*in vitro* 延髄 - 小脳共培養系が *in vivo* 小脳の性質を十分に再現することを確認し、登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの刈り込みのメカニズムを解明する上で有用な系であることを示している。その上で、P/Q 型カルシウムチャネルを介する神経活動依存的な Arc の発現が登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの刈り込みの促進に必要であることを明らかにしている。さらに、*in vivo* においても Arc が登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの刈り込みに必要であることを示している。本研究は、プルキンエ細胞の神経活動が登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの刈り込みを制御するメカニズムに新規知見を与えるものであり、シナプスの刈り込みのメカニズム解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。