

氏 名 西 卷 拓 也

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1256 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科、生理科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Developmental role of metabotropic receptors in  
MNTB-LSO inhibitory synapse

論文審査委員 主 査 教授 井本 敬二  
教授 鍋倉 淳一  
教授 川口 泰雄  
准教授 久場 博司（京都大学）

聴覚中継路核である外側上オリブ核(LSO)は同側耳からの音情報を、蝸牛核(VCN)を介してグルタミン酸作動性入力として、対側耳からの音情報を内側台形体核(MNTB)から GABA/グリシン作動性として受けている。生体内において MNTB から LSO への抑制性入力は選択的にその活動を制御することが可能であり、この回路をモデルとして抑制性シナプスの発達に関する多くの重要な報告がなされている。例えば MNTB-LSO シナプスの GABA/グリシン応答は他の脳部位で観察されるのと同様に脱分極性から過分極性へと発達スイッチすること、その変化は細胞内 Cl<sup>-</sup>イオンくみ出し分子 KCC2 発現の発達変化によりもたらされること、機能的なシナプスの除去、axonal arbors や dendritic arbors の refinement により同じ周波数に反応する細胞同士の結合が残り強化されること、MNTB-LSO シナプスは幼若期には GABA 作動性であり、成熟期にはグリシン作動性に伝達物質自体が単一シナプス内でスイッチすることなどが揚げられる。これらの変化は GABA/グリシンの自発的および聴覚活動依存的な神経活動により制御されており、入力活動が神経回路の再編成に重要であることが示唆されている。彼等は MNTB-LSO 入力活動を制御する 2つの機構の発達変化を検討した。

1) GABA およびグリシンは共に Cl<sup>-</sup>チャンネルを内蔵する受容体を持つにもかかわらず、なぜ MNTB-LSO シナプスでは未熟期には GABA を伝達物質とする生体戦略をとるのか、その生理学的意義については不明である。GABA とグリシンで駆動されるシグナル伝達の大きな違いとして、GABA には代謝型 GABA<sub>B</sub> 受容体が存在することが挙げられる。そこで MNTB から LSO へ入力する神経終末に存在する代謝型 GABA<sub>B</sub> 受容体に注目し、その発達変化とともに GABA<sub>B</sub> 受容体の MNTB-LSO 回路発達に対する役割について検討した。

幼若期に MNTB 神経終末に発現する GABA<sub>B</sub> 受容体が、MNTB 終末自身から放出される GABA によって活性化されるのかを調べるため、MNTB-LSO 入力を頻回刺激し、LSO から記録される MNTB-evoked IPSC の大きさの変化を観察した。MNTB-LSO 入力を連続刺激(0.5~33.3 Hz)すると刺激回数に応じて IPSC の大きさの漸減(synaptic depression)が観察された。GABA<sub>B</sub> 受容体のアンタゴニスト(CGP55845)によって低頻度刺激時の synaptic depression は有意に低下した。この CGP55845 による synaptic depression の減弱は生後 2~9 日目(P2~9)で観察されたが、P16~18 では消失した。これらの結果から幼若期では MNTB-LSO 終末から放出される内因性 GABA により終末 GABA<sub>B</sub> 受容体が活性化されることが示唆された。MNTB-LSO 刺激による MNTB 終末 GABA<sub>B</sub> 受容体活性化の発達減弱は 2つの可能性が考えられた。1つ目は GABA からグリシンへの伝達物質のスイッチングが完了し GABA 放出が消失している可能性、2つ目は GABA<sub>B</sub> 受容体自体の発現が発達で減弱する可能性である。そこで GABA<sub>B</sub> 受容体自体の発達変化を薬理学的手法を用いて検討した。GABA<sub>B</sub> 受容体のアゴニスト(baclofen)投与によって MNTB-evoked IPSC の大きさは、P5 までは顕著に抑制された。しかし、この baclofen による抑制は発達に従って漸減し、P16 以降ではほとんど消失した。in situ hybridization 法を用いて入力基始核 MNTB の GABA<sub>B</sub> 受容体 R1 サブユニットの mRNA の発現を調べた結果、GABA<sub>B</sub> 受容体 R1 サブユニットの発現は P2 で高く、その後発達減少することが判明した。これらの結果から MNTB-LSO 入力終末の GABA<sub>B</sub> 受容体自体の発現が発達に伴い消失することが判明した。

幼若期 MNTB-LSO 入力終末で機能発現している GABA<sub>B</sub> 受容体のシナプスの成熟に対する影響を調べるために、GABA<sub>B</sub> 受容体 R1 サブユニットノックアウトマウス(KO マウス)を用いて 1)抑制性伝達物質放出特性の発達変化、2)伝達物質の GABA からグリシンへのスイッチング、3)MNTB-LSO 入力のシナプス除去について検討した結果、GABA<sub>B</sub> 受容体 KO マウスでは伝達物質の GABA からグリシンへのスイッチングが遅延している可能性が示唆された。しかし、この回路において報告されている抑制性余剰入力の除去に対する MNTB 終末の GABA<sub>B</sub> 受容体の関与は認められなかった。MNTB-LSO 頻回刺激に対するシナプス応答の発達変化を観

察した結果、幼若期(P0~2)では WT マウスと KO マウスのいずれにおいても記録 LSO 細胞間での synaptic depression にばらつきが観察された。しかし細胞間のばらつきは WT マウスでは発達に伴い減少したのに対し、KO マウスでは P14-18 においても LSO 細胞間で大きなばらつきが観察された。

P6~9 マウスを用いて随時放出可能な神経終末小胞プール (RRP)の大きさ、放出確率 (release probability) について解析した結果、KO マウスの RRP size は WT マウスに比べて有意に大きく、release probability は有意に小さいことがわかった。また、release probability のばらつきが WT マウスに比べて KO マウスで大きく、シナプス応答の細胞間のばらつきの原因である可能性が示唆された。

以上の結果より、幼若期に MNTB 終末に発現している GABA<sub>B</sub> 受容体は幼若期にのみ放出される内因性 GABA により活性化され、連続入力に対するシナプス応答の細胞間均一性の獲得に寄与していると考えられる。また GABA<sub>B</sub> 受容体は放出確率や RRP size など、伝達物質放出機構の発達変化にも関わっていることが示唆された。以上から、幼若期に発現する GABA<sub>B</sub> 受容体が、本来知られているシナプス伝達の短期的抑制以外にも、発達期における長期的な神経回路の再編成に関連していることが示唆された。

2) 抑制性 MNTB-LSO シナプスの活動がそれ自身や VCN(腹側蝸牛核)-LSO グルタミン酸作動性シナプスの形態・機能発達を制御していることが報告されている。今回、興奮性 VCN-LSO シナプスが抑制性 MNTB-LSO シナプス伝達に与える影響およびその発達変化を検討した。

VCN-LSO グルタミン酸作動性入力の高頻度刺激直後の MNTB-LSO evoked IPSC の大きさの変化を観察した結果、P4~8 ラットにおいて amplitude の有意な減少と paired-pulse ratio の有意な増加が観察された。この変化は mGluR2/3 のアンタゴニストである LY341495 投与によってブロックされた。このことから VCN 終末から放出されたグルタミン酸が MNTB-LSO 終末に発現する mGluR2/3 を活性化し、MNTB 終末からの伝達物質放出をヘテロシナプス的に抑制することが示唆された。MNTB 終末に存在する mGluR2/3 機能を、mGluR2/3 アゴニスト DCG IV を利用して検討した結果、MNTB-evoked IPSC の大きさは、P12 までは有意に抑制されたが、その抑制は発達減少し、P16 以降ではほとんど消失した。このことから VCN-LSO 回路活動による MNTB-LSO 入力のヘテロシナプス制御は多様な発達変化が起こる幼若期にのみ機能発現しており、MNTB-LSO 回路活動を制御することによりこの回路の成熟に寄与している可能性が考えられる。

以上の結果より、MNTB-LSO シナプス終末にはさまざまな回路の再編成が起こる幼若期にのみ GABA<sub>B</sub> 受容体とグループ II 代謝型グルタミン酸受容体が機能発現しており、前者は MNTB の活動によって放出される GABA によって、後者は VCN の活動によって放出されるグルタミン酸によって制御されることが観察された。LSO は両耳間の音圧差を利用した音源定位に寄与する細胞核であり、これらの代謝型受容体は幼若期には回路の成熟に必要であり、成熟期にはこれら受容体消失により短期可塑性の少ない安定した聴覚情報処理が行われる回路が形成されることが示唆される。

## 論文の審査結果の要旨

発達期の脳では、神経回路の再編成により成熟回路が形成されていく。この過程で神経伝達物質受容体は活動依存的な役割を持つと考えられているが、これらの分子は通常成熟後も発現・機能しているため、発達期に限定した機能を検討することは難しい。聴覚中継路核である外側上オリブ核(LSO)は、同側耳からの音情報をグルタミン酸作動性の興奮性入力として、また対側耳からの音情報を内側台形体核(MNTB)を介するGABA/グリシン作動性の抑制性入力として受ける。後者は、GABA作動性からグリシン作動性に発達スイッチすることから、発達期における代謝型GABA-B受容体の機能的意義を解析できると予想される。

そこで先ずLSO入力の神経終末にある代謝型GABA-B受容体の発達変化について検討した。MNTBの頻回刺激によりLSOの抑制性後シナプス電流(IPSC)は減弱し、この減弱はGABA-B受容体アンタゴニストCGP55845により有意に低下した。これは、幼若期では内因性GABAにより神経終末GABA-B受容体が活性化されることを示す。GABA-B受容体アゴニストbaclofen投与により、IPSCの大きさはP5までは顕著に抑制されたが、その効果はP16以降では消失した。一方、*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いた実験で、MNTBのGABA-B受容体R1サブユニットの発現はP2で高く、その後発達減少することが示された。

以上の基礎的データを踏まえて、GABA-B受容体R1サブユニットノックアウトマウス(KOマウス)のMNTB-LSOシナプスの機能解析を行った。その結果、WTマウスではP2-3に観察されるMNTBの頻回刺激によるIPSC減弱のばらつきが、KOマウスではP14-18においても残存していることが示された。シナプスでの放出のキネティックを詳細に解析したところ、KOマウスではWTマウスと比較して、随時放出可能な神経終末小胞プール(Readily releasable pool: RRP)が大きく、放出確率(release probability: PP)は有意に小さく、またPPのばらつきが大きかった。

また別のシリーズの実験として、LSOへの興奮性シナプスから放出される内因性グルタミン酸がMNTB-LSO終末に発現する代謝型グルタミン酸受容体mGluR2/3を活性化し、MNTB終末からの伝達物質放出をヘテロシナプス的に抑制することが示された。mGluR2/3を介する抑制は、P16以降ではほとんど消失した。

以上の結果より、MNTB-LSOシナプス終末には幼若期にのみGABA-B受容体とグループII代謝型グルタミン酸受容体が発現し、神経回路の精緻化に貢献していることが示された。

本研究は、神経回路発達における代謝型受容体の役割を、神経伝達物質のスイッチという性質を持つ聴覚系神経回路の特性を利用し、シナプス伝達の詳細な解析により検討したものである。本研究の一部は既に神経科学領域での代表的な学術誌に掲載されており、神経回路の機能発達の理解に貢献している。従って本論文は、学位論文として十分な内容を有しているものとして審査委員会において全会一致で判定された。