

論文内容要旨

※ 整理番号		(ふりがな) 氏名(自署)	出羽 健一	印
論文題目	組織学的、遺伝学的、電気生理学手法を用いた小脳シナプス形成におけるDSCAMの機能解析 (Functional analyses of DSCAM in cerebellar synapse formation through the histological, genetical and electrophysiological approaches.)			
論文内容要旨				
(研究の目的)				
<p>脳神経系は膨大な数のシナプスを正しく形成・成熟・維持することで高度な情報伝達を可能にしている。小脳の主要な神経細胞であるプルキンエ細胞の樹上突起上ではシナプスを形成する領域と時期が明瞭に別れており、発達依存的にダイナミックなシナプス形成と刈り込みが行われるが、その分子機構は不明な点が多い。Down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM)は一回膜貫通型のタンパク質であり、網膜でのシナプス結合や突起伸長を制御する。一方でこの分子は小脳(特にプルキンエ細胞)で強く発現しているが、その機能についてはほとんど未知である。そこで本研究では、小脳のシナプス発達機構の詳細を解明すると共に、シナプス形成におけるDSCAMの役割を同定することを目的とし、解析を行なった。</p>				
(方法)				
1, 組織染色法による <i>Dscam</i> 欠損マウスの小脳の組織学的解析				
<p>生後30日目の <i>Dscam</i> 欠損マウス (<i>Dscam</i>^{del17/del17}) および小脳の細胞種特異的な Cre 系統と <i>Dscam</i>^{lox} 系統を掛け合わせた <i>Dscam</i> コンディショナルノックアウト (cKO) マウスの小脳に対し Nissl 染色または組織免疫染色を行い、小脳の構造および興奮性/抑制性シナプスの変化を解析した。</p>				
2, <i>Dscam</i> ^{del17/del17} マウスの小脳興奮性シナプスの電気生理学的解析				
<p>生後22-29日目の <i>Dscam</i>^{del17/del17} マウス小脳を用いて急性スライスを作成し、プルキンエ細胞に対して Whole cell patch clamp を行い登上线維または平行線維を刺激することにより、小脳興奮性シナプスのシナプス後電流 (EPSC) を計測した。</p>				
3, <i>Dscam</i> ^{del17/del17} マウス小脳における微細構造の電子顕微鏡解析				
<p>生後30-60日目の <i>Dscam</i>^{del17/del17} マウス小脳の興奮性シナプスの微細構造を観察した。また、免疫電顕法を用い、シナプスを被覆するバグマングリアにおけるグルタミン酸トランスポーター (GLAST) とシナプス後肥厚 (PSD) 間の距離を計測した。</p>				
4, in vitro 実験系を用いた遺伝子導入および免疫沈降実験				
<p>HEK293T 細胞に DSCAM-Full length または DSCAM の細胞外ドメインを欠損したものと GLAST-FLAG を遺伝子導入し、FLAG 抗体を用いた免疫沈降法でこれらの分子の結合を調べた。</p>				

備考

- ※印の欄には記入しないこと。
- 論文題目が外国語の場合は、カッコを付し和訳を付記すること。
- 論文題目が日本語の場合は、カッコを付し英訳を付記すること。
- 論文内容要旨は、(研究の目的)、(方法)、(結果)、(考察)、(結論)の順に日本語(2,000字程度)もしくは英語(半角5,000字程度)でまとめ、タイプ等で印字すること。(文字数を記載してください。)

論文内容要旨 (続紙)

(ふりがな)
氏名(自署)

出羽 健一

印

(結果)

- 1, Nissl 染色の結果を野生型(WT)と *Dscam*^{del17/del17} で比較したが、小脳の大きさや構造にプルキンエ細胞の形態に顕著な違いは認められなかった。いくつかのシナプスマーカーを用いて組織免疫染色を行なったところ、*Dscam*^{del17/del17} においてプルキンエ細胞と興奮性のシナプスを形成している登上線維シナプスの数が著しく減少していた。また、4種類の小脳細胞特異的 *Dscam* cKO マウスを用いて生後30日目で同様の解析を行なった結果、プルキンエ細胞で *Dscam* が KO された場合のみ、顕著な登上線維シナプスの減少が認められた。
- 2, 登上線維 EPSC と平行線維 EPSC を計測した結果、どちらも通常時の入力は正常であることがわかった。一方で Cyclothiazide の投与により脱感作を阻害し、シナプス間隙におけるグルタミン酸の回収効率を調べたところ、*Dscam*^{del17/del17} の平行線維シナプスにおいて顕著にグリア細胞依存的なグルタミン酸回収率が低下していることがわかった。
- 3, 小脳シナプスの微細構造とバグマンリアのシナプス被覆部位における GLAST の局在を解析した結果、*Dscam*^{del17/del17} ではグルタミン酸受容体が密集する PSD の末端に対して GLAST の局在する位置が明らかに離れていた。
- 4, 免疫沈降を行なったサンプルを用いてウエスタンブロットを行い、DSCAM が検出されるかを調べた結果、DSCAM と GLAST-FLAG-tag を共発現させたサンプルでのみ、DSCAM のバンドが検出された。一方で細胞外ドメインを削った DSCAM は GLAST-Flag と共発現させてもバンドは検出されなかった。

(考察・結論)

本研究から①プルキンエ細胞における DSCAM が小脳の登上線維シナプス形成に関与すること、②DSCAM が平行線維における GLAST を介したグルタミン酸取り込みに関わっていること、③その分子メカニズムとして DSCAM が GLAST と相互作用して GLAST の局在を制御していることが示された。これまでバグマングリア側で GLAST の局在を制御する分子は知られていたものの、神経細胞がどのようにして GLAST をシナプスに繋ぎ止めているのかは不明であり、上記の結果からプルキンエ細胞における DSCAM がその役割を果たしている可能性が考えられる。また、先行研究では登上線維シナプスの形成・維持機構にグルタミン酸トランスポーターが重要な役割を果たすことが報告されている。

今後は同マウスを用いた登上線維における電気生理学的解析や、DSCAM のシナプスにおける局在解析を行うことで DSCAM の小脳シナプス形成に関与するメカニズムをより詳細に明らかにできると考えられる。

(2155文字)