



Title	Abnormalities of Synapses and Neurons in the Hippocampus of Neuropsin-Deficient Mice
Author(s)	平田, 昭夫
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42648">https://hdl.handle.net/11094/42648</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ひら 平 た 田 あき 昭 お 夫
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 8 6 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 2 月 13 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Abnormalities of Synapses and Neurons in the Hippocampus of Neuropsin-Deficient Mice (ニューロブシン遺伝子欠損マウスの海馬神経細胞とシナプスの異常)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 遠 山 正 彌  (副査) 教 授 米 田 悦 啓    教 授 三 木 直 正

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目的〕

神経細胞近傍の外部環境における細胞外マトリックス分解制御は、神経発生におけるシナプスの形成や無秩序な神経支配の削除、記憶・学習、神経修復などの神経可塑的变化におけるシナプスの編成、再構成、成熟過程において重要であることが予想される。記憶・学習の実験的モデルとされる長期増強現象においては貫入型シナプスの数が増加するなどシナプスの形態変化が指摘されている。このような生理的条件に近い状況においてもシナプス構造の変化と細胞外マトリックスの分解過程は密接に関連しており、神経可塑性のメカニズムの一端を担うと考えられる。

ニューロブシンは海馬錐体細胞に局在するトリプシン型のセリンプロテアーゼである。これまでの研究から、ニューロブシンについて1、胎生後期より海馬での mRNA の発現が認められ、以降成熟動物においても発現を維持すること、2、神経細胞の活動依存性にその mRNA の発現量が変化すること、3、細胞外に分泌して細胞外マトリックス蛋白質を分解すること、4、海馬の長期増強現象を調節し、その中和抗体がキンドリングマウスの発作を抑制すること、などが明らかとされてきた。そこで、本研究ではニューロブシン遺伝子欠損マウスを作製し、特にシナプス構造とその数に異常が生ずるかどうかを明らかにすることを目的とした。

#### 〔方法ならびに成績〕

ターゲティングベクターの構築：ニューロブシンの酵素活性の中心を構成すると考えられる3つのアミノ酸の内、ヒスチジン57とアスパラギン酸102を含む領域を欠失するように構築した。

ニューロブシン遺伝子欠損マウスの作製：ターゲティングベクターをE14-1胚性幹細胞に導入し、ポジティブネガティブ選別により組換え胚性幹細胞を単離した。その後、常法に従いキメラマウスを作出した。そのキメラマウスをC57BL/6J系統の雌マウスと交配させて、ヘテロ接合体を作出し、ヘテロ接合体の雌雄を交配させて、ニューロブシン遺伝子を欠損したホモ接合体を作出した。ヘテロ接合体の交配では、野生型：ヘテロ接合体：ホモ接合体＝24.2：53.2：22.6(%) (n=442)の割合で仔が産まれた。ニューロブシン遺伝子欠損マウスは、分娩、生育に特に異常は認められず、ホモ接合体は成長後、生殖能力を有した。

ニッスル染色による海馬の細胞の観察：海馬錐体細胞層の細胞体が、ニューロブシン遺伝子欠損マウスでは、野生型に比し、錐体細胞数は不変であったが、その形態は約半数について変化し、大型で紡錘型を示すものが増加した。

この形態変化は、ゴルジ鉍染による海馬の細胞の観察によっても確かめられたが、樹状突起の数、長さ、および樹状突起のスパイン密度に差はみられなかった。

電子顕微鏡による海馬 CA1領域に分布するシナプスの定量的な解析を行ったところ、ニューロブシン遺伝子欠損マウスと野生型の間に顕著な差が認められた。まず、単位体積あたりの非対称型シナプスの数が、ニューロブシン遺伝子欠損マウスの CA1 stratum radiatum および oriens では約20%減少した。一方、シナプス小胞を含有しながら明確な非対称型シナプスを形成しない終末ボタン（フリーボタン）を同一切片で計測したところニューロブシン遺伝子欠損マウスでは顕著に増加し、非対称型シナプスとフリーボタンの総数には変化がなかった。

これらの形態学的観察をさらに検証するため、海馬 CA1領域におけるシナプスの生化学的マーカーとして N-cadherin とシナプス小胞のマーカーとして synaptophysin のウェスタンブロット解析を行った所、ニューロブシン遺伝子欠損マウスでは N-cadherin の有意な減少が認められた。また、海馬 CA1 領域において GAD67 と Parvalbumin の免疫染色像を観察すると、GAD67 陽性細胞は変化がなかったが、parvalbumin 陽性細胞は stratum oriens において増加していた。

〔総括〕ニューロブシン遺伝子欠損マウスを作成し、海馬の組織学的観察を行った。シャーファー側枝の終末部位である海馬 CA1領域の非対称型のシナプスが減少し、フリーボタンが増加していることから、ニューロブシンは同部位でのシナプスの形成あるいは離反に関係するものと考えられた。一方、parvalbumin 陽性細胞が増加することから海馬の情報伝達システムに異常が生じていることが考えられる。ニューロブシン欠損マウスにおけるこれらの異常と海馬における一部の非対称型シナプスの接着に関わると考えられている N-cadherin の有意な量的変化とも考え合わせると、ニューロブシンの欠損によって海馬の神経ネットワークが大きく変化していることが推察された。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文は、脳における神経可塑性現象の一つであるシナプスの構造変化の機構解明を目的に、セリンプロテアーゼとして同定されたニューロブシンの遺伝子欠損マウスを作製し、その海馬の組織学的検討を行ったものである。その結果、ニューロブシン遺伝子欠損マウスの成熟個体海馬 CA1領域において、錐体細胞層を構成する細胞の形態が変化していること、特に終末ボタンの数が減少し、シナプスとしては機能的に不十分であると考えられるフリーボタンが増加していたことを示し、さらに抑制性神経細胞の総数は変化しないのにも関わらず、パルブアルブミン陽性細胞の数が増加していたことも明らかにした。これらのことから、ニューロブシン遺伝子欠損マウスの海馬システムが異常なことを示唆した。本研究は、シナプスの構造決定を担う極めて重要な因子の一つとしてニューロブシンの役割が示唆されているだけでなく、海馬システムの解明につながる重要な知見を提供している。従って、本論文は学位の授与に値すると考えられる。