

氏名 (本 (国) 籍)	MOHAMMAD RABIUL KARIM (バングラデシュ人民共和国)		
主指導教員名	岐阜大学 教授 阿 閉 泰 郎		
学位の種類	博士(獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第405号		
学位授与年月日	平成26年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	Vesicular Glutamate Transporter 2 and Glutamate Receptors as Cues to the Glutamatergic Circuits in the Brain of the Zebra Finch (<i>Taeniopygia guttata</i>) (ゼブラフィンチ脳におけるグルタミン酸作動性回路に関わる2型小胞性グルタミン酸トランスポーターとグルタミン酸受容体)		
審査委員	主査	岐阜大学 教授	志水泰武
	副査	帯広畜産大学 教授	北村延夫
	副査	岩手大学 教授	山本欣郎
	副査	東京農工大学 教授	柴田秀史
	副査	岐阜大学 教授	阿閉泰郎

学位論文の内容の要旨

鳥の歌学習は哺乳類の学習や記憶の神経回路を解明する良いモデルである。鳴禽類の脳内では歌作りと歌の維持にいくつかの神経核が関わり、歌システムを形成している。歌システムは前脳前経路と前脳後経路の2つの経路がある。前者は area X に始まり、視床背外側核内側部 (DLM) と巢外套前部外側大細胞核 (LMAN) を経由して再び area X に戻る経路である。後者は HVC (略語ではなく、正式な学名)、robust nucleus of the arcopallium (RA) および舌下神経気管鳴管運動核 (nXIIts) で構成される。両経路は area X と HVC および LMAN と RA でそれぞれ結びついている。外界の音情報は上行性聴覚路を通り歌システムへ伝えられ、歌システムで情報処理されたのち、下行性運動路を経て鳴管を支配する。歌システムを対象にした薬理学的および電気生理学的研究から、グルタミン酸が学習、記憶あるいは可塑性に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。しかし鳴禽類の脳におけるグルタミン酸作動性神経回路はまだ明らかでない。

グルタミン酸は哺乳動物の脳で主要な興奮性神経伝達物質である。小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3) は前シナプスにおいてグルタミン酸をシナプス小胞に運び入れる。シナプス小胞から分泌されたグルタミン酸は後シナプス膜に存在するグルタミン酸受容体 (GluR) に結合する。VGLUT1 と VGLUT2 の mRNA はグルタミン酸作動性神経細胞に発現し、VGLUT3 はグルタミン酸作動性以外の神経細胞群に局在している。VGLUT2 mRNA はグルタミン酸作動性神経細胞体に発現し、そのタン

パク質は主に非対称の前シナプスに局在している。したがって、VGLUT2 の mRNA とタンパク質の発現はグルタミン酸作動性神経回路の起始と投射先を知る指標となり得る。またグルタミン酸入力を受ける神経細胞体はグルタミン酸受容体 mRNA を発現しており、グルタミン酸作動性神経細胞の投射先と考えられる。それ故、VGLUT2 の mRNA とタンパク質および受容体 mRNA は脳内のグルタミン酸作動性神経回路を知る形態学的な手がかりになる。本研究の目的は、鳴禽類であるゼブラフィンチ脳のグルタミン酸作動性神経回路を明らかにするために、グルタミン酸作動性神経細胞の起始と投射先を聴覚系と歌システムに焦点を当てながら解明することである。

第1章では VGLUT2 mRNA の遺伝子配列と分布を調べた。初めにゼブラフィンチの VGLUT2 mRNA のクローニングを行ったところ、遺伝子は 1,746 bp のオープンリーディングフレームを含む 1,779 bp の長さであった。次に塩基配列を基にした DNA プロブを用いた遺伝子組織化学では、VGLUT2 mRNA はゼブラフィンチの脳でさまざまな部位に分布していた。終脳では外套に VGLUT2 mRNA の強い発現が見られたが、外套下では認められなかった。上行性聴覚路では、VGLUT2 mRNA の強い発現は角核 (NA), 大細胞核 (NM), 層板核 (NL), 外側毛帯核腹側部 (LLv), 外側中脳核背側部 (MLd), 卵形核 (Ov) に見られた。弱い VGLUT2 mRNA の発現は上オリーブ核 (OS) と外側毛帯核背側部 (LLd) に見られた。L野と巢外套後内側部 (NCM) は中等度の VGLUT2 mRNA 発現を示した。3つの歌核 (HVC, RA, LMAN) は強い発現を示した。また VGLUT2 mRNA の強い発現は視床背外側核前内側部 (aDLM) に見られた。下行性運動路では VGLUT2 mRNA 発現は背内側丘間核 (DM), 後疑核 (Ram) および nXIIIts に認められた。これらの所見はグルタミン酸作動性神経細胞が聴覚経路や歌システムを含むゼブラフィンチ脳に広く存在していることを示している。

第2章では VGLUT2 作動性神経細胞の投射先を調べるために抗 VGLUT2 抗体を用いた免疫組織化学法を行った。VGLUT2 免疫反応は終脳で強かった。聴覚系では、強陽性は NM, NA, NL, MLd に、中等度陽性は OS, LLv, LLd に、弱陽性は Ov に、弱陽性から中等度陽性は L野と NCM で見られた。歌核では VGLUT2 免疫反応は弱かった。VGLUT2 免疫反応は下行性運動路の核にも見られた。

第3章ではグルタミン酸受容体サブタイプである AMPA 型 (GluA1, GluA4), カイニン酸型 (GluK1), NMDA 型 (GluN1, GluN2A) の mRNA の分布を調べた。これらの遺伝子は終脳, 視床, 中脳の聴覚系や歌核のさまざまな部位に発現していた。L野と NCM は GluN2 mRNA を発現していた。Ov は GluK1 mRNA が中等度に発現した。MLd は GluA1, GluA4, GluN1, GluN2A の mRNA が発現していた。DM は GluN1 mRNA を発現していた。GluA4 mRNA は NL で強陽性, NM で中等度陽性, NA で弱陽性の発現であった。また LLv と LLd は弱陽性から中程度陽性の GluN2A mRNA の発現を示した。歌核では GluN2A mRNA が HVC, RA, LMAN, area X に認められた。GluN2A mRNA は Ram と nXIIIts で見られた。

今回の研究では、鳴禽類のゼブラフィンチ脳で VGLUT2 mRNA 発現神経細胞が上行性聴覚路, 歌システム, 下行性運動路に分布することを明らかにした。これらの結果とすでに知られている線維連絡を考慮すると、多数のグルタミン酸作動性神経回路が聴覚系と歌システムを含む脳内に広く存在することを示している。形態学的に示した今回の所見は、グルタミン酸作動性神経回路が歌学習のメカニズム解明に有用な知見であると考えられた。

審査結果の要旨

鳴禽類の歌学習は哺乳類の学習や記憶の神経メカニズムを解明する良いモデルである。薬理学的および電気生理学的研究から、グルタミン酸が学習、記憶あるいは可塑性に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。しかし鳴禽類の脳におけるグルタミン酸作動性神経回路はまだ解明されていない点が多い。申請者はこの未解明な鳴禽類のグルタミン酸作動性神経回路を形態学的な立場から明らかにすることを旨とした。

第1章では2型小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGLUT2) の mRNA の遺伝子配列をクローニングした。その結果、遺伝子は 1,779 bp の長さであることを明らかにした。次にこの塩基配列を基づいた DNA プローブを用いた *in situ hybridization* 法で、VGLUT2 mRNA を発現する神経細胞の分布をゼブラフィンチ脳で詳細に調べた。その結果、VGLUT2 mRNA 発現神経細胞は、上行性聴覚路では、角核 (NA), 大細胞核 (NM), 層板核 (NL), 外側毛帯核腹側部 (LLv), 外側中脳核背側部 (MLd), 卵形核 (Ov) に見られた。弱い VGLUT2 mRNA の発現は上オリーブ核 (OS) と外側毛帯核背側部 (LLd) に見られた。終脳では3つの歌核 (HVC, robust nucleus of the arcopallium, 巢外套前部外側大細胞核) を含む外套に強い発現が見られたが、外套下では認められなかった。下行性運動路では、VGLUT2 mRNA 発現は背内側丘間核、後疑核および舌下神経気管鳴管運動核に認められた。これらの所見はグルタミン酸作動性神経細胞が聴覚経路や歌システムを含むゼブラフィンチ脳に広く存在していた。

第2章では VGLUT2 作動性神経細胞の投射先を調べるために抗 VGLUT2 抗体を用いた免疫組織化学法を行っている。VGLUT2 免疫反応は終脳で強かった。聴覚系では、強陽性は NM, NA, NL, MLd に、中等度陽性は OS, LLv, LLd に、弱陽性は Ov に、弱陽性から中等度陽性は L 野と巢外套後内側部で見られた。歌核では VGLUT2 免疫反応は弱かった。VGLUT2 免疫反応は下行性運動路の核にも見られた。

第3章では2章と同様にグルタミン酸作動性神経細胞の投射部位を検索しているが、今回はグルタミン酸入力を受ける受容体を有する神経細胞の局在からその分布を解析したものである。グルタミン酸受容体サブタイプである AMPA 型 (GluA1, GluA4), カイニン酸型 (GluK1), NMDA 型 (GluN1, GluN2A) の mRNA の分布を *in situ hybridization* 法により調べた。これらの遺伝子は終脳、視床、中脳の聴覚系や歌核のさまざまな部位に発現していた。

以上、本研究では、鳴禽類のゼブラフィンチ脳でグルタミン酸作動性神経細胞の起始と投射先を明らかにした。今回の形態学的所見は、グルタミン酸作動性神経回路が歌学習のメカニズム解明に大変有用な知見であると考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

1) 題 目 : Distribution of vesicular glutamate transporter 2 in auditory and song control brain regions in the adult zebra finch (*Taeniopygia guttata*)

著 者 名 : Karim, M. R., Saito, S., and Atoji, Y.

学術雑誌名 : Journal of Comparative Neurology

巻・号・頁・発行年 : In Press

既発表学術論文

1) 題 目 : Expression of the neocortical marker, ROR β , in the entopallium and field L2 of adult chicken

著 者 名 : Atoji, Y. and Karim, M. R.

学術雑誌名 : Neuroscience Letters

卷・号・頁・発行年 : 521 (2) : 119-124, 2012