

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～ 2008

課題番号：19700355

研究課題名（和文）

小脳生後発達初期の登上線維シナプス競合におけるシナプス伝達素過程の機能的変化

研究課題名（英文）

Functional changes of climbing fiber synaptic transmission components during cerebellum development

研究代表者

小池 真紀（谷 真紀）(Koike Maki [Tani Maki])

北海道大学・電子科学研究所・研究員

研究者番号：60396702

研究成果の概要：脳幹聴覚中継核 calyx of Held で見られるシナプス抑圧に対するシナプス前・後機構の各要素の寄与が生後発達に伴いどのように変化するかを明らかにした。その結果、生後発達に従って①シナプス前終末の伝達物質放出確率の減少、②シナプス後細胞の AMPA 受容体脱感作の減弱と回復時間の短縮、及び③グルタミン酸に対する感受性の減少の 3 要素が関わることで、シナプス抑圧に対する受容体脱感作の寄与の減少に至ることが明らかとなった。続いて小脳登上線維シナプスの発達やシナプス競合による小脳回路の調節に焦点を当て、発生開始後 14 日から 18 日のニワトリ胚由来の小脳スライス標本を用い、電気生理学および光学的な測定が可能となるような実験システムの確立を行い、中枢神経系の回路形成や恒常性維持に重要な神経栄養因子 Brain derived neurotrophic factor (BDNF) の作用を検討した。小脳スライス標本に蛍光標識 BDNF を投与し、BDNF とその受容体である TrkB の挙動を観察した。その結果、小脳の特徴的なグリア細胞であるバグマングリア細胞に対して極めて特異的に BDNF が結合し、細胞内に取り込まれ突起内を輸送されることを見出した。バグマングリアに対する BDNF の生理機能は不明である。そこで、小脳スライス標本でバグマングリア細胞からの whole-cell 記録と、蛍光標識した BDNF の高精度ライブイメージングの同時測定ができる実験系を構築し、稼働に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目

分科：神経科学

細目：神経・筋肉生理学

キーワード：バグマングリア、脳由来神経栄養因子、登上線維、シナプス抑圧、AMPA 受容体

1. 研究開始当初の背景

げっ歯類の場合、小脳は生後約 3 週間の間

に形態学的構造やシナプス入力が大きく変化し成熟脳へと発達する。登上線維－プルキ

ンエ細胞シナプスは脳の発達に伴い多重支配から単一入力へとシナプスの選択・除去が行われることが知られている。成熟した登上線維-プルキンエ細胞シナプスは①1対1の強力なグルタミン酸性の興奮性シナプス電流応答を示すこと、②強い短期シナプス可塑性を示すこと③生後3週間でシナプスが成熟することなどの性質から、本研究代表者がこれまで行ってきたラット脳幹 calyx of Held シナプスと共通する。今回新たに小脳登上線維-プルキンエ細胞間のシナプス伝達素過程を明らかにするにあたりその前段階として、calyx of Held におけるシナプス伝達のシナプス前および後機構のシナプス抑圧を取り上げ、これらシナプス素過程の生後発達変化を明らかにした。

このような発生・発達過程におけるシナプスの制御にはグリア細胞も積極的に関わっていることが近年報告されており、グリア細胞は単なる構造的支柱としての役割でなく神経細胞との双方向的な伝達物質のやり取りを行うことが明らかとなりつつある。しかしながら、中枢神経系の発生・発達変化に対するグリア細胞の機能的役割に焦点を当てた報告は少ない。

また、神経回路の発生・発達過程を制御する液性因子として神経栄養因子が知られている。脳由来神経栄養因子 (Brain Derived Neurotrophic Factor: 以下 BDNF と略す) は大脳皮質、海馬、小脳において特に豊富に存在し、シナプス形成や神経細胞の生存といった発生初期に関わっているだけでなく、シナプス伝達の増強や可塑性等の調節にも重要な役割を果たすことが報告されている。

上記のようにグリア細胞と神経栄養因子は、中枢神経系の発生・発達過程に不可欠な役割を果たしていることが明らかとなりつつあるが、神経栄養因子に対するグリア細胞の応答や、これに伴う神経系の発生・発達制御に関してはほとんど研究が行われてこなかった。本研究代表者はこのことを明らかにする目的で、シナプス形成から成熟までの発生段階における脳の発達変化を検討するのに適したニワトリ胚脳スライス標本を用い、中枢神経系の代表的なグリア細胞であるバグマングリアを取り上げ、電気生理学的手法と蛍光1分子観察が可能な高解像度ライブイメージング的手法を組み合わせることによって、BDNFによるシナプス伝達の調節やシナプス競合のメカニズムを明らかにしたいと考え、本研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

神経系の発生・発達においてグリア細胞の果たす役割はこれまでもいくつか知られているが、グリア細胞に対する神経栄養因子の作用や、この作用が間接的に神経系の発

生・発達やシナプス伝達の制御やシナプス競合に間接的に制御する可能性についてはほとんど知られていない

本研究の目的は小脳スライス標本を用いたライブイメージング技術と電気生理学的手法を組み合わせることによって、グリア細胞を介した神経栄養因子によるシナプス伝達の発達やシナプス競合変化メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) ラット脳幹聴覚中継核シナプス calyx of Held のシナプス伝達素過程の生後発達変化を明らかにするため、生後7日、14日、21日の異なる発達段階のラットから厚さ200マイクロメートルの急性脳幹スライス標本を作成した。Whole-cell patch clamp 法によりシナプス後細胞である MNTB からシナプス電流を記録した。AMPA 受容体の脱感作からの回復の時間経過を測定するためには outside-out patch 膜に急速外液還流法を適用し、1ms のグルタミン酸パルスの時間間隔を様々に変えた二発投与を行うことによって測定した。この後再び同じ細胞に whole-cell patch を適用し、細胞質を回収して single cell real time RT-PCR 法を行うことによって、GluR-GluR4 のサブユニットおよび flip/flop スプライス変異体の1細胞における mRNA の相対比率を求めた。

(2) 蛍光ライブイメージングの実験にはニワトリ胚由来の小脳スライス標本を用いた。バグマングリアの BDNF 受容をモニターするために、BDNF を蛍光色素 Cy3 で標識した蛍光 BDNF を用いた。生理活性を維持したままこれら蛍光色素を共有結合させる方法はすでに研究室内にいて確立されていた。急性スライス標本を観察対象とする蛍光1分子ライブイメージングシステムを新たに立ち上げ、ここに whole-cell patch clamp 法を適用し電気生理学的手法との同時記録が可能となるよう実験装置を設置した。蛍光観察には開口数 0.95 をもち、作動距離が 3mm 確保できる電気生理学用水浸対物レンズを用いた。励起光の導入法として、マルチモードの大口径光ファイバー端面から射出した光をクリティカル照明で資料に導入する方法、あるいはシングルモード光ファイバーをスライス標本内に射入し、ファイバーの光射出端面において、単一蛍光分子を可視化する方法を試みた。

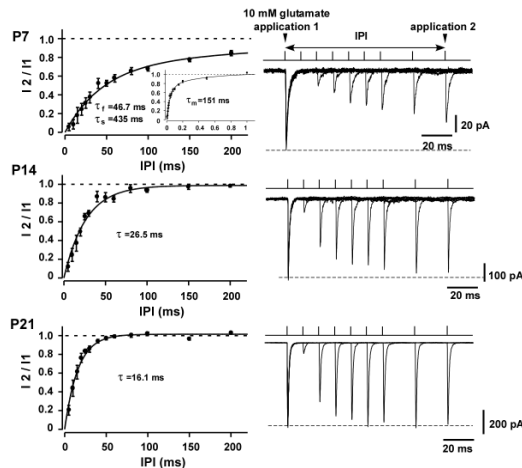
(3) 発生開始後14日から18日の間の異なる発生段階のニワトリ胚から小脳を取り出し厚さ250マイクロメートルの急性脳スライス標本を作成した。ニワトリ胚の小脳は低融点アガロースで包埋した状態でスライス作

成を行った。スライス標本は 95%酸素 5%二酸化炭素の溶液中において室温で約 1 時間インキュベート後、顕微鏡下へ移し電気生理の実験を行った。Whole-cell patch clamp 法により、登上線維の神経刺激を行うことでバグマングリア細胞またはブルキンエ細胞から速い興奮性シナプス伝達(AMPA-EPSC)または glial-EPSC の記録を行った。

4. 研究成果

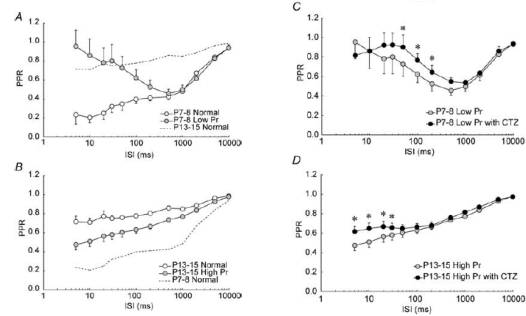
(1) calyx of Held のシナプス抑圧におけるシナプス素過程の機能的変化

シナプス抑圧における AMPA 受容体の脱感作の寄与の生後発達変化を検討した。二発連続刺激による神経誘発性 AMPA-EPSC と、グルタミン酸パルスの二発連続投与による outside-out patch 膜のグルタミン酸誘発性電流をそれぞれ記録し比較した結果、シナプス後細胞の脱感作からの回復に要する時間は生後 7 日では約 1 秒であるのに対し、生後 14 日、21 日では 100 ms、50 ms 以内と急速に早くなることが明らかとなった(図 1)。



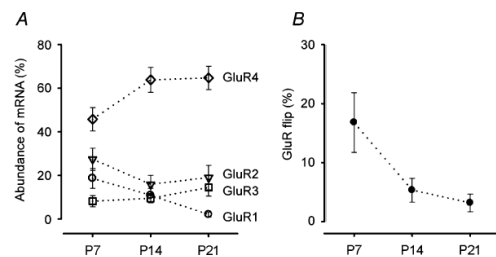
(図 1) 生後 7 日、14 日、21 日の異なる発達段階の MNTB 細胞の outside-out patch 膜に、10mM のグルタミン酸パルス (1ms) をさまざまな時間間隔で二発与えた時の AMPA 受容体電流のトレース (右)。IPI(Inter pulse interval)は二発パルスの間隔を表し、一発目および二発目の AMPA 受容体電流の相対値をプロットした (左)。

この結果と神経誘発性のシナプス抑圧に対する CTZ を用いた実験から、生後 7 日のシナプス抑圧には AMPA 受容体脱感作が寄与するが生後 14 日以降ではその寄与がなくなることを明らかにした。生後発達に伴いシナプス前終末の放出確率が減少し、その結果 AMPA 受容体が脱感作しにくくなる可能性を検討するため、生後 7 日と 14 日とで放出確率が同じになる条件を細胞外二価イオンの調整を行うことでコントロールし、シナプス抑圧を検討したところ、放出確率の要因も寄与することが明らかとなった (図 2)。



(図 2) 生後 7 日 (A) および 14 日 (B) の calyx-MNTB シナプスにおいて、細胞外液の 2 価イオン濃度を変化させることで前終末の伝達物質放出確率を調整し、神経誘発性シナプス抑圧に対する放出確率の寄与を調べた。同じ条件でシナプス後細胞の AMPA 受容体脱感作の寄与を調べた (C,D)。

加えて AMPA 受容体サブユニット及びスプライス変異体組成が生後発達に伴い変化することが single cell RT-PCR 法および免疫組織化学的手法により明らかとなった (図 3)。



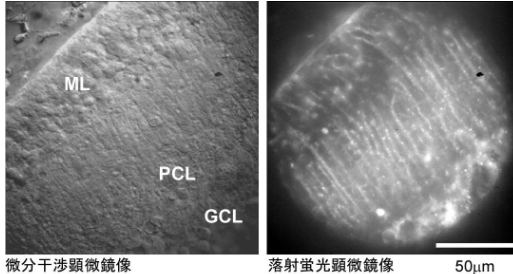
(図 3) single-cell real time RT-PCR による GluR1-GluR4 (A) および flip/flop (B) mRNA の相対含有率の生後発達変化。

このような発達に伴う AMPA 受容体サブユニットおよびスプライス変異体組成の変化は、グルタミン酸に対する受容体感受性を低下させその結果、脱感作寄与の程度にも影響するに至ることが明らかとなった。

(2) 光標識 BDNF による小脳スライス標本内在の BDNF 受容体 TrkB の可視化

蛍光 BDNF を用いて、ニワトリ胚由来の小脳スライス標本内における TrkB 受容体の分布とその動態を可視化した。ニワトリ 14 日-18 日胚から取り出した小脳スライス標本に 5nM の BDNF を含む DMEM/F12 培養液中で 1 時間培養したのち落射型蛍光顕微鏡で蛍光観察を行った結果、小脳表層から内部に向かう筋状の構造に Cy3-BDNF が特異的に結合することが明らかとなった (図 4)。検討の結果、この筋状構造はバグマングリア細胞の突起であることが示唆された。BDNF が結合する状態としては、その特異的受容体である TrkB のほかに、神経栄養因子一般を受容する p75 受容体の存在が知られている。こ

の受容体の関与を検討する目的で、p75 と結合する神経栄養因子 NGF の蛍光標識アナログ 5nM を小脳スライス標本に投与し、その蛍光観察を行った結果、蛍光 BDNF で観察された筋状の蛍光染色は見られなかった。蛍光 BDNF によって観察される筋状のパターンは、小脳内に発現する TrkB 受容体の分布を反映していると考えられる。



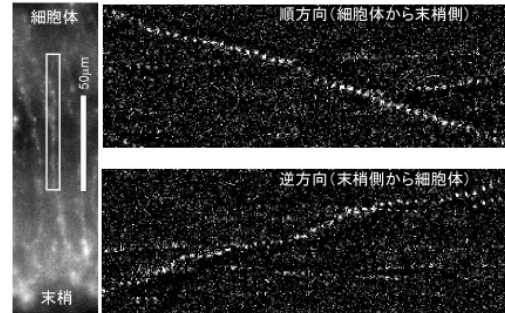
(図4) 微分干渉顕微鏡(左)および蛍光顕微鏡(右)で観察したニワトリ小脳スライス標本における蛍光 BDNF の分布。ML: Molecular layer, PCL: Purkinje cell layer, GCL: Granule cell layer

(3) 小脳バグマンングリア細胞内で観察された BDNF の分子動態観察

このように、小脳バグマンングリア細胞に結合する蛍光 BDNF の挙動をタイムラプス記録によって 1 時間程度観察した。蛍光 BDNF 投与後の時間経過にともない、小脳スライス中に見られる線状の蛍光シグナルは増大するが、この増大とともに、明るい蛍光輝点が形成された。この明るい蛍光輝点の大部分は、小脳の molecular layer 側から granule cell layer 側に向かって輸送されていることが観察された(図5)。この蛍光輝点は、その明るさから多分子の蛍光 BDNF のクラスター、おそらくはバグマンングリア細胞内に取り込まれた蛍光 BDNF クラスターと推定された。

バグマンングリア細胞は小脳神経系に極めて重要な細胞であり、小脳表層から内部に向かう顆粒細胞の移動や、顆粒細胞由来の平行線維とプルキンエ細胞のシナプス伝達の恒常性を維持している。現時点でバグマンングリア細胞に対する BDNF の生理機能は明らかでない。ドイツの Konnerth らのグループは、バグマンングリア細胞は truncated 型の BDNF 受容体を発現しており、BDNF の受容に伴って細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることを報告している。また、バグマンングリア細胞は、プルキンエ細胞のシナプス結合部位を包み込む構造を有しており、シナプス伝達効率やその恒常性を制御していると考えられている。このような知見を基に、小脳スライス標本でバグマンングリア細胞の電気的活動と、BDNF の作用を同時に計測する顕微鏡の構築を行った。バグマンングリア細胞膜に結合した蛍光 BDNF の挙動を

観察するためには、スライス標本内で蛍光 1 分子観察を可能にする必要がある。このために、シングルモード光ファイバーを内蔵したガラス微小ピペットをスライス内に挿入した。光ファイバーに励起レーザー光を導入すると、光ファイバー端面近傍で、100nM の濃度で投与した Cy3-BDNF を 1 分子観察することが出来た。この光ファイバー先端をスライス内のバグマンングリア細胞膜の近傍に密接させ、同時にパッチ電極でバグマンングリア細胞の電気記録を行うことが可能となった。



蛍光 BDNF の輸送(5秒毎の写真を左から右に並べた)

(図5) 蛍光 BDNF の軸索輸送。左図の蛍光像内に区切られた領域のキモグラフを左の上下に示す。上: granule layer から molecular layer 方向に向かう輸送、下: molecular layer 側から granule layer 側に向かう輸送

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Maki Koike-Tani, Takeshi Kanda, Naoto Saitoh, Takayuki Yamashita, Tomoyuki Takahashi; *Journal of Physiology (London)*, 586, 2263-2275 (2008) 査読有

[その他]

アウトリーチ活動

(1) 北海道大学女性研究者支援室主催 理系応援キャラバン隊 出前実験イベントブースへの出展「生きているタマゴの中をのぞいてみよう」

胚発生中のニワトリの卵に窓をあけ、生きているニワトリ胚の観察を一般の方々や高校生、中学生、小学生に観察してもらうことで、我々ヒトをふくめた生物の体作りの不思議を体感してもらう。

2007.8.4 北広島エルフィンパーク交流広場 北広島市

2007.9.7 函館市立函館高校 函館市

2007.9.8 函館工業高等専門学校 函館市

2007.9.9 函館中部高校 函館市

6. 研究組織

(1)研究代表者

小池 真紀 (谷 真紀)

(Koike Maki·Tani Maki)

北海道大学・電子科学研究所・研究員

研究者番号：60396702

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし