

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300137

研究課題名（和文） プルキンエ細胞における抑制性シナプスの空間配置決定の分子基盤

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of subcellular synapse organization in cerebellar Purkinje neurons

研究代表者

田中 光一（TANAKA KOHICHI）

東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学研究所・教授

研究者番号：80171750

研究成果の概要（和文）：神経回路網が正常に作動するためには、特異的な結合が重要である。小脳プルキンエ細胞は、特徴的なグルタミン酸性入力・GABA性入力を受けている。本研究では、GABA性入力細胞である星状細胞・籠細胞の発生にRBP-Jが受容な役割を果たすことを明らかにした。さらに、グルタミン酸入力の一つである登状線維に放出確率の異なる2種類があり、ゼブリンを発現するプルキンエ細胞は、放出確率の高い登状線維から入力を受けていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A remarkable feature of neuronal wiring is its specificity. The subcellular organization of glutamatergic and GABAergic inputs along Purkinje neurons is essential for information processing in cerebellum. In this study, we demonstrated that RBP-J promotes the neurogenesis of stellate and basket cells: two sets of inhibitory neurons that innervate selectively dendrites and axonal initial segments of Purkinje neurons, respectively. In addition, I found that climbing fibers (CFs) that innervate proximal dendrites of Purkinje neurons in zebrin II immunoreactive (Z+) zones have a higher release probability than CFs in Z- zones.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：小脳・抑制性ニューロン・プルキンエ細胞・星状細胞・籠細胞・登状線維

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

脳は多くの領域から構成され、それぞれが機能分担することにより知覚、運動、思考などの知的活動を支えている。脳の複雑な情報処理の仕組みを解明するためには、まず、脳内局所回路網の構成原理を明らかにする必要がある。局所回路の形成には、回路網を作る標的神経細胞の選別と標的神経細胞のどの部位（樹状突起、細胞体、軸索など）にシナプス結合するかが重要である。前者に比べ、後者の研究は遅れている。申請者はこの課題を追求するために、神経回路の解剖学的構造と機能が詳細に研究されている小脳の局所回路を対象に研究を行う。小脳の出力細胞であるプルキンエ細胞 (Purk) は、平行線維 (PF)・登上線維 (CF) の 2 つの興奮性入力と星状細胞 (St)・籠細胞 (Bsk) の 2 つの抑制性入力を受けているが、それぞれの入力プルキンエ細胞上の特定の領域に配置されている。プルキンエ細胞の遠位樹状突起には平行線維 (PF) と星状細胞 (St) の軸索が、近位樹状突起には登上線維 (CF) が、細胞体・axon initial segment (AIS) には籠細胞 (Bsk) の軸索がシナプスを形成している。しかし、興奮性入力である平行線維・登上線維のプルキンエ細胞に対するシナプス形成機序および抑制性入力である星状細胞・籠細胞のプルキンエ細胞に対するシナプス形成機序は、不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) プルキンエ細胞に抑制性入力を送る星状細胞・籠細胞に関しては、その発生機序が不明である。本研究では、まず星状細胞・籠細胞の発生機序を解明する。
 (2) プルキンエ細胞の興奮性入力に関しては、登状線維に着目し、ゼプリンの発現の有無により分類されるプルキンエ細胞への登状線維の入力に機能的差異があるかどうか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アストロサイト特異的な分子である GFAP のプロモーター下流に Cre 酵素をつないだ遺伝子改変マウスを作成している際に、小脳においてアストロサイトの他に星状細胞・籠細胞にのみ Cre 酵素が発現している系を見つけた。このマウスを用い、小脳アストロサイト・星状細胞・籠細胞から Notch シグナルの下流分子である RBP-J を欠損したマウスを作成した (ミュータント A)。ミュータント A は、星状細胞・籠細胞の数が激減していた。星状細胞・籠細胞

の数の減少の原因を解析するため、星状細胞・籠細胞の前駆細胞の数の測定、増殖能やアポトーシスの変化を BrdU ラベル、TUNER 染色で解析した。

(2) 生後 13-20 日の EAAT4-eGFP マウス、EAAT4 欠損マウスから厚さ 250-300um のスライスを作製し、パッチ電極を用いてプルキンエ細胞のシナプス応答を記録した。

4. 研究成果

(1) 小脳分子層にある星状細胞・籠細胞の数をマーカーである parvalbumin の発現を指標に調べたところ、ミュータント A ではその数が、コントロールに比べ著明に減少していた (プルキンエ細胞の数には差がなかった) (図 1)。

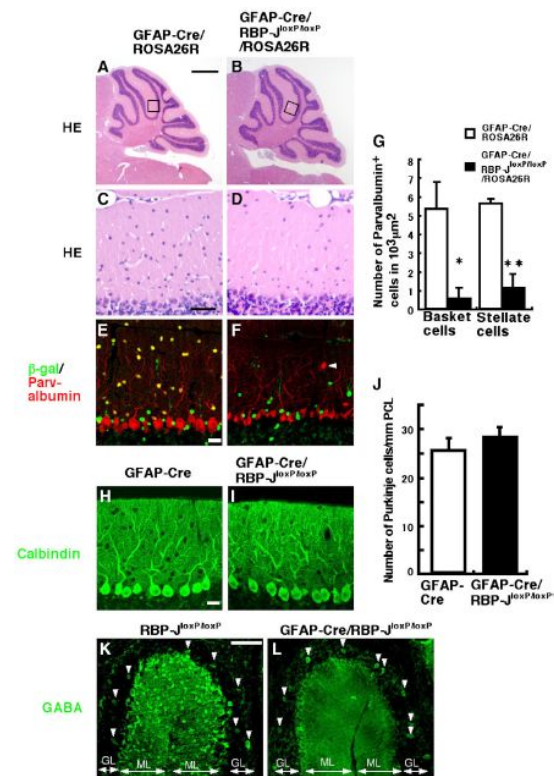


図 1 星状細胞・籠細胞特異的 RBP-J 欠損マウスおよびコントロールマウスの小脳における星状細胞・籠細胞・プルキンエ細胞の数

星状細胞・籠細胞数の減少の機序を調べるため、星状細胞・籠細胞の前駆細胞である白質に存在する pax2 陽性の数を調べた。Pax2 陽性細胞の数は、胎生 18.5 日 (E18.5) まではコントロールと差はないが、生後 2 日 (P2) になると減少していた (図 2)

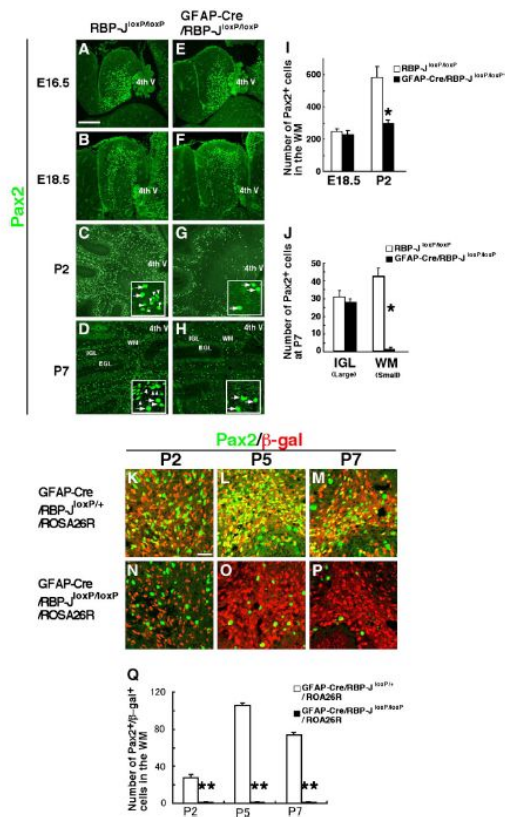


図2 星状細胞・籠細胞特異的 RBP-J 欠損マウスおよびコントロールマウスの小脳における Pax2 陽性細胞の数

前駆細胞数の減少の原因を調べるため、pax2 陽性細胞の増殖能を解析した。BrdU 陽性・pax2 陽性細胞の数は E18.5 までは変化なかったが P2 になると減少していた。また、ミュータントではアポトーシスを起こしている白質の細胞 (TUNEL 陽性細胞) が P1 から増加していた(図 3)このことは RBP-J の欠損により、星状細胞・籠細胞前駆細胞の増殖能減少及びアポトーシスの亢進が起き、星状細胞・籠細胞の数が減少することを示している。

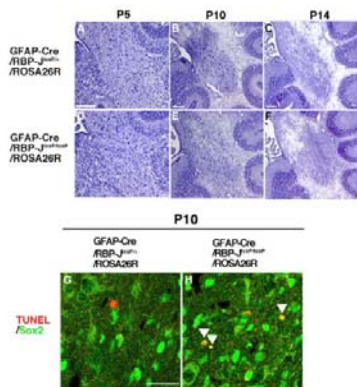


図3 星状細胞・籠細胞特異的 RBP-J 欠損マウスおよびコントロールマウスの小脳白質の細胞数および TUNEL 陽性細胞数

この結果は、RBP-J が Sox2 陽性/Pax2 陰性神経前駆細胞を Sox2 陰性/Pax2 陽性神経前駆細胞に分化させることにより、星状細胞・籠細胞の生成を促進していることを示している (図 4)。

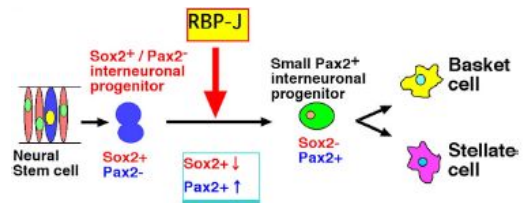


図4 RBP-J の星状細胞・籠細胞形成における役割

(2) 小脳のプルキンエ細胞は、ゼブリンおよび EAAT4 の発現の有無により 2 種類に分類できる (図 5)。

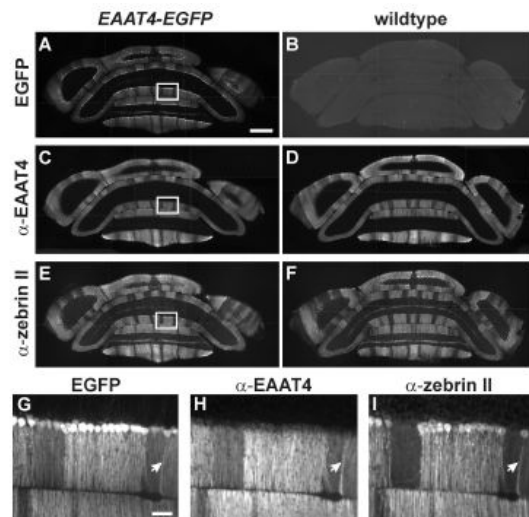


図5 EAAT4-eGFP マウスにおける GFP, EAAT4, ゼブリンの発現

EAAT4-eGFP マウスを用いることにより、GFP の蛍光を指標にゼブリン発現プルキンエ細胞と非発現プルキンエ細胞を小脳スライス上で同定できる。ゼブリン発現および非発現プルキンエ細胞にパッチ電極を置き、登状線維を電気刺激し、シナプス応答を記録すると、ゼブリン陽性プルキンエ細胞のシナプス後電流 (EPSC) の時間経過が、非発現プルキンエ細胞に比べ長いことがわかった (図 6)。

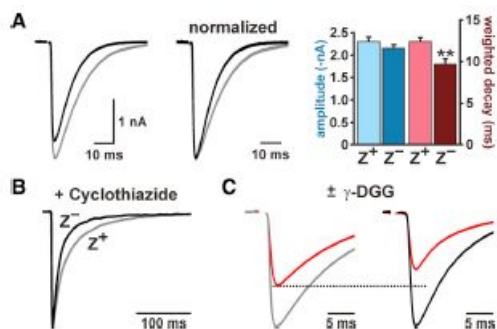


図 6 ゼブリン陽性および陰性プルキンエ細胞から記録される登状線維のシナプス応答

また、ゼブリン陽性細胞に入力を送っている登状線維終末の小胞型グルタミン酸トランスポーターvGluT2 の発現は、非発現細胞に入力を送っている神経終末より多いことがわかった (図 7)。

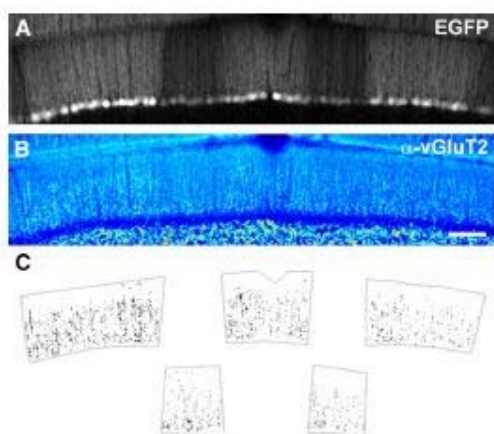


図 7EAT4-eGFP マウス小脳における GFP, vGluT2 の発現

これらのデータは、ゼブリンを発現するプルキンエ細胞は、放出確率の高い登状線維から入力を受けていることを示している。

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 13 件)

- ①Tsai, M-C., Tanaka, K., Overstreet-Wadiche, L., Wadiche, JI. Neuronal glutamate transporters regulate glial excitatory transmission. *J Neurosci* 32. 1528-1535, 2012.

②Komine, O., Nagaoka, M., Hiraoka, Y., Hoshino, M., Kawaguchi, Y., Pear, E.S., Tanaka, K. RBP-J promotes the maturation of neuronal progenitors. *Dev Biol* 354. 44-54, 2011.

③Paukert, M., Huang, Y.H., Tanaka, K., Rothstein, J.D., Bergles, D.E. Zones of enhanced glutamate release from climbing fibers in the mammalian cerebellum. *J Neurosci* 30. 7290-7299, 2010.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 4 件)

- ①田中光一：精神神経疾患におけるグルタミン酸トランスポーターの役割、細胞工学、31: 580-586, 2012
- ②田中光一：アストロサイトと精神神経疾患、Clinical Neuroscience、29: 1286-1288, 2011
- ③相田知海、田中光一：グルタミン酸トランスポーター、生体の科学、61: 398-399, 2010
- ④相田知海、田中光一：自閉症、Clinical Neuroscience、28: 912-915, 2010

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/aud/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 光一 (TANAKA KOICHI)
東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学
研究部・教授
研究者番号：80171750