

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700346

研究課題名(和文) 発達期小脳登上線維-プルキンエ細胞間シナプス除去における  
GABA 作動性伝達の関与研究課題名(英文) GABAergic inhibition regulates developmental synapse elimination  
in the cerebellum

研究代表者

中山 寿子 (NAKAYAMA HISAKO)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：70397181

研究成果の概要(和文)：小脳プルキンエ細胞は発達初期には複数の登上線維に支配されているが、生後3週間の間に単一登上線維に支配されるようになる(シナプス刈り込み)。本課題では、この過程へのGABA性伝達の関与を調べた。その結果、生後10日から16日目の刈り込み過程に、プルキンエ細胞体へのGABA性抑制性シナプス入力に関与することが分かった。また、GABA性抑制性シナプス入力は、登上線維がプルキンエ細胞体に誘発するカルシウム上昇の大きさを修飾することによってシナプス刈り込みに関与することを示唆する結果も得た。

研究成果の概要(英文)：Functional neural circuit formation during development involves massive elimination of redundant synapses. In the cerebellum, one-to-one connection from excitatory climbing fiber (CF) to Purkinje cell (PC) is established by elimination of early-formed surplus CFs. This process depends on glutamatergic excitatory inputs, but contribution of GABAergic transmission remains unclear. Here we demonstrate impaired CF synapse elimination in mouse models with diminished GABAergic transmission by mutation of a single allele for the GABA synthesizing enzyme GAD67, conditional deletion of GAD67 from PCs and GABAergic interneurons or pharmacological inhibition of cerebellar GAD activity. The impaired CF synapse elimination was rescued by enhancing GABA<sub>A</sub> receptor sensitivity in the cerebellum by locally applied diazepam. Our electrophysiological and Ca<sup>2+</sup> imaging data suggest that GABA<sub>A</sub> receptor-mediated inhibition onto the PC soma from molecular layer interneurons influences CF-induced Ca<sup>2+</sup> transients in the soma and regulates CF synapse elimination from postnatal day 10 (P10) to around P16.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：シナプス、神経回路、発達、小脳、プルキンエ細胞、登上線維、シナプス刈り込み、GABA

## 1. 研究開始当初の背景

プルキンエ細胞は小脳唯一の出力細胞である。プルキンエ細胞は、登上線維と平行線維という2種類のグルタミン酸作動性シナプス入力を受け、バスケット細胞、星状細胞、また、幼弱期においては近傍のプルキンエ細胞から GABA 作動性シナプス入力を受けている。プルキンエ細胞は、生直後には複数の登上線維による支配を受けるが、発達に伴って余剰な登上線維が除去され、マウスでは生後3週間で1本の登上線維に支配されるようになる。このようなシナプス刈り込みは、発達期の脳で広く見られる現象で、中枢神経系では登上線維-プルキンエ細胞シナプスで特に研究が進んでいる。登上線維のシナプス刈り込みには、グルタミン酸作動性シナプス伝達の重要性が指摘されていたが、その過程における抑制性 GABA 作動性伝達の重要性に関する知見は全くなかった。

シナプス除去が進行する生後3週間の間に、GABA 作動性シナプスの機能もダイナミックに変化する。GABA は成熟脳では主要な抑制性伝達物質として神経細胞の興奮性を抑制する作用を持つが、ラットのプルキンエ細胞を含め、発達初期には興奮性に作用することが知られている。本課題の予備実験として、マウスのプルキンエ細胞の興奮性に対する GABA 作用の発達変化を調べたところ、GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化は、生後7日頃までは半数以上のプルキンエ細胞に対して興奮性に作用したが、生後10日目以降では、ほぼ全てのプルキンエ細胞の発火頻度を減少させた。すなわち、余剰な登上線維の刈り込みが起こる時期に、GABA 性応答が興奮性から抑制性にダイナミックに変化することが分かった。また、GABA 作動性介在ニューロン軸索終末から、活動電位に非依存的にシナプス小胞が同期して放出されるという興味深い現象も、登上線

維シナプスの刈り込みの時期に一致して報告されていた。さらに、本課題の予備実験から、GABA 合成酵素である GAD67 のヘテロ・ノックアウトマウスでは成熟動物においても、プルキンエ細胞が依然として複数の登上線維に支配されているという結果が得られていた。これらの知見は、小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスの除去に、GABA 作動性シナプス伝達が関与することを強く示唆するものであった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、遺伝子組換え動物を用いて GABA 性抑制性伝達を操作した場合にシナプス除去が影響されるかを調べた。さらに、「どのシナプス部の」、「どのような」GABA 作動性伝達によってプルキンエ細胞への興奮性入力が「どのように」影響されるかを明らかにすることを目的として実験を遂行した。

## 3. 研究の方法

本研究は主に、マウス小脳急性スライス標本を用いた電気生理学的手法と、カルシウム・イメージング法を用いて行った。電気生理学的手法としては、様々な日齢のマウス小脳虫部から作成した厚さ250 $\mu$ mの急性スライス上の、プルキンエ細胞を直視観察しながら細胞体からホールセル・パッチクランプ記録を行った。ガラス微小電極を用いて登上線維、平行線維、GABA 作動性介在ニューロン（バスケット細胞、星状細胞）などの入力線維を刺激したときに、プルキンエ細胞に誘発されるシナプス後電流および自発性シナプス後電流を記録し、電気生理学的、薬理的性質を解析した。カルシウム・イメージング実験においても、マウス小脳から作製した急性スライス標本を用いた。記録電極からカルシウム

蛍光指示薬 (Oregon Green 488-BAPTA1) をプルキンエ細胞に充填した後に、単一の登上線維を電気刺激したときにプルキンエ細胞に誘発される電位応答とカルシウム応答を、GABA 作動性伝達を遮断しない条件下で記録した。

#### 4. 研究成果

(1) プルキンエ細胞の自発性抑制性微小電流 (mIPSC) の発達変化を野生型マウスおよび GAD67 ヘテロマウスにおいて解析した。野生型マウスでは生後 3 週間の間で mIPSC の振幅がダイナミックに変化したが、GAD67 ヘテロマウスでは発達による変化がほとんど見られなかった。特に、シナプス前終末から複数のシナプス小胞が同期的に放出されて生じると考えられている大振幅の mIPSC (100pA 以上) が、野生型マウスでは生後 2 週目に頻繁に見られたが生後 15 日以降では稀であった。GAD67 ヘテロマウスでは、生後 2 週目において、大振幅の mIPSC の振幅が発生するものの、振幅は野生型に比べて有意に減弱していた。

(2) 登上線維シナプスの刈り込み過程を発達日齢を追って解析した。その結果、GAD67 ヘテロマウスでは、生後 10 日以降のシナプス刈り込みが著しく障害されていることが明らかになった。

(3) 上記 (1) および (2) の結果を受けて、プルキンエ細胞への抑制性入力の減弱とシナプス刈り込みの障害と関連を調べるために、GABA 伝達を促進/減弱させる薬剤を生後 10 日目から ELVAX を用いて、小脳皮質へ持続投与した時のシナプス刈り込みを解析した。

① GABA 伝達を促進するジアゼパムを GAD67 ヘテロマウス小脳に持続投与したところ、シナプス刈り込みが正常化した。

② 逆に、GAD インヒビターを野生型マウス小脳皮質に持続投与すると、シナプス刈り込みが障害され、成熟後も複数の登上線維によって支配されるプルキンエ細胞が有意に増加した。

③ ジアゼパムおよび GAD インヒビターを生後 17 日目から持続投与した場合には、シナ

プス刈り込みに対する有意な効果は得られなかった。

(1)~(3)の結果から、生後 10 日目から 16 日目のプルキンエ細胞への抑制性入力の適切な発達が同時期の登上線維のシナプス刈り込みに必要であることが示唆された。

(4) プルキンエ細胞は、細胞体にはバスケット細胞と近傍のプルキンエ細胞から、樹状突起には星状細胞から GABA 作動性入力を受けている。細胞体と樹状突起、どちらへの GABA 作動性シナプス入力が登上線維のシナプス刈り込みに大きく関与するかを調べた。

① プルキンエ細胞で記録される大振幅の mIPSC の波形解析、介在ニューロンとプルキンエ細胞の同時記録などを行い、大振幅の mIPSC は、バスケット細胞-プルキンエ細胞間 GABA 性シナプスで発生していること、および、バスケット細胞-プルキンエ細胞間のシナプス伝達が GAD67 ヘテロマウスにおいて減弱していることを明らかにした。

② 群馬大学柳川教授、新潟大学崎村教授の協力の下、GAD67 をプルキンエ細胞、バスケット細胞、星状細胞で特異的にノックアウトしたコンディショナルマウスを新たに作製し、シナプス刈り込みを解析した。このコンディショナル・ノックアウトマウスにおいても、プルキンエ細胞の mIPSC の振幅が減弱しており、シナプス刈り込みも障害されているという、GAD67 ヘテロマウスと同様の結果が得られた。

(5) GABA 性抑制性伝達がどのような機構で興奮性シナプスのシナプス除去に関与するのかを明らかにするための実験も開始した。1 本の登上線維によってプルキンエ細胞の細胞体に誘発される細胞内カルシウム濃度の変化をカルシウム・イメージング法で測定した。GABA 作動性伝達の阻害剤を含まない細胞外液中で実験を行った。その結果、プルキンエ細胞への GABA 性伝達が減弱している GAD67 ヘテロマウスにおいては、将来除去されるべき振幅の小さな登上線維が野生型マウスよりも有意に大きなカルシウム上昇を引き起こすという結果を得た。

以上の結果から、細胞内カルシウム濃度

依存的な機構が発達期の登上線維のシナプス除去に関与しており、GABA 性シナプス伝達はカルシウム上昇の大きさを修飾することによってシナプス除去に関与する可能性が示唆された。

これまでの小脳登上線維-プルキンエ細胞間シナプスの成熟過程の研究の殆どが、グルタミン酸作動性興奮性シナプス伝達とそれに駆動される細胞内シグナル伝達分子に着目したものであり、GABA 作動性シナプス伝達の関与の可能性については全く検討されていない。本研究は、小脳皮質の GABA 作動性シナプス伝達に着目した点で非常に独創的であるといえる。生体における情報伝達は、興奮と抑制の絶妙なバランスと相互作用で成り立っているはずであるから、回路形成期の GABA 作動性シナプス伝達の発達変化とグルタミン酸作動性シナプスの除去過程の関連と機構の解明を目指す本研究は、生体における小脳回路形成の理解を格段に深めることが期待される。

#### 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)

[学会発表] (計 2 件)

1. 中山寿子、宮崎太輔、橋本浩一、柳川右千夫、小幡邦彦、渡辺雅彦、狩野方伸、GABAergic inhibition onto Purkinje cell soma is crucial for climbing fiber synapse elimination in developing cerebellum、第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 17 日、名古屋国際会議場 (愛知県)

2. 河村吉信、中山寿子、喜多村和郎、狩野方伸、Analysis of climbing fiber inputs to Purkinje cells in the developing rat cerebellum *in vivo*、第 36 回国際生理学会大会、2009 年 7 月 28 日、京都国際会館 (京都府)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中山 寿子 (NAKAYAMA HISAKO)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：70397181

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし