

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500413

研究課題名(和文) プルキンエ細胞樹状突起シナプス構築形成過程における入力線維交替現象

研究課題名(英文) Territories of heterologous inputs onto Purkinje cell dendrites are segregated by mGluR1-dependent parallel fiber synapse elimination

研究代表者

市川 量一 (Ichikawa, Ryoichi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10223091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：生後早期のマウスのプルキンエ細胞では樹状突起の全域に渡って平行線維シナプスが形成されるが、生後15-20日の間にて樹状突起の近位部から平行線維シナプスが除去されることで成体でみられるようなシナプス分布が完成する。具体的には、近位部に局在する登上線維シナプステリトリーと遠位部に局在する平行線維シナプステリトリーとに、シナプス分布が分離することである。また、この平行線維シナプスの除去作用には、プルキンエ細胞に発現する代謝型グルタミン酸受容体mGluR1-PKCgamma系が重要な役割を果たしていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In the Purkinje cells (PCs) of the cerebellum, a single “winner” climbing fiber (CF) monopolizes proximal dendrites, while hundreds of thousands of parallel fibers (PFs) innervate distal dendrites, and both inputs innervate a narrow intermediate domain. Through reconstruction of dendritic innervation by serial electron microscopy, we show that from postnatal day 9 to 15 in mice, both territories vigorously expand because of an enlargement of the region of overlapping innervation. From postnatal day 15 onwards, segregation of these input territories occurs by robust shortening of the overlapping proximal region. Thus, innervation territories by heterologous inputs are refined during the early postnatal period. Intriguingly, this phase transition is arrested in mutant mice lacking the type 1 metabotropic glutamate receptor (mGluR1) or protein kinase Cγ(PKCγ), resulting in the persistence of an abnormally expanded overlapping region.

研究分野：神経解剖

キーワード：シナプス プルキンエ細胞 平行線維 登上線維 樹状突起 mGluR1 PKCγ

### 1. 研究開始当初の背景

脳が果たしている様々な神経機能は、その情報処理に特化した特異なシナプス回路を基盤として生み出す。その神経機能に特化した神経回路の構築は、まず胎児期において遺伝的プログラムに従ってその土台が作られるが、この段階のシナプス回路は過剰で重複が多く、接続性も不正確で、未熟な状態にある。その後、生後発達過程で受容する刺激や経験が神経活動となって脳に伝わり、それに応じた強化と除去を基盤とするシナプス回路の刈込みが起これ、それぞれの個体史を反映し生活環境に適應できる機能的なシナプス回路へと改築される。

本研究を含む一連の研究プロジェクトでは、精緻で円滑な運動機能や運動学習の中心的ニューロンである小脳プルキンエ細胞の神経回路を調査対象として取り上げた。小脳プルキンエ細胞は、樹状突起にて2種の興奮性入力(平行線維、登上線維)と抑制性入力(星状細胞、籠細胞)を受け、細胞体では籠細胞から抑制性入力のみを受ける。(Ramon Cajal, 1911)。加えて、一個のプルキンエ細胞には一本の登上線維のみが入力する(Palay and Chan-Palay, 1974)。また平行線維シナプスは樹状突起の細胞体から遠位部に、登上線維は近位部にと、興奮性シナプスは分節化して分布する、このような様式のシナプス構築(配置)は、適切な出力を産生するための必要な条件となっており、これが崩れると運動失調などが起きる。

特に、興奮性神経回路の特徴である、上記の登上線維の単一支配、登上線維と平行線維による分節化したテリトリー支配、の2点の形成過程を我々の研究グループでは調べてきた。

については、生後発達過程において複数の登上線維が支配する多重支配期を経て単一支配へと移行する、ことが判明した。具体的には、生後第一週において細胞体とシナプスを形成していた登上線維(下オリブ小脳路線維)が、生後第二週より樹状突起に伴行するように translocate し、細胞体シナプスを減少させつつ樹状突起シナプスを増加させ、樹状突起近位部に対して独占的なシナプス支配を形成する(Altman et al, 1985)。一方、細胞生物学的機構、及び細胞内カルシウムイオン濃度調節に関わるカルシウムイオンチャネル Cav2.1 や代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1、平行線維シナプスの接着に関わるグルタミン酸受容体 GluD2 が、その過程において不可欠な分子機構であることを明らかにしてきた。しかし、がどのようにして形成されるのかについては、その過程や分子機構も含め全く不明であった。

登上線維を欠落させても樹状突起の伸長に大きな変化はみられない(Sotelo et al, 1972)。このことは、登上線維シナプスはプルキンエ細胞の樹状突起の伸長にほとんど関与しな

いことを示している。一方、樹状突起近位部にほとんど存在しない平行線維シナプスの形成を阻害させると、プルキンエ細胞の樹状突起の発育が著しく障害され、平行線維シナプスの量の低下量と樹状突起の発育の低さは相関する。そのことは平行線維シナプスがプルキンエ細胞の樹状突起の発育とも深く関わっていることを示唆していた。

### 2. 研究の目的

我々は、樹状突起の近位部のシナプスについても Switching 現象が起これ、既存のシナプスの前成分が平行線維から登上線維へと置き換わり、入力線維に応じた受容体の発現の変化が起きるとの、仮説をたてた。というのも、平行線維シナプスの形成がプルキンエ細胞の樹状突起の伸長に大きな影響を及ぼすことから、発生初期には平行線維シナプスが樹状突起遠位部だけでなく近位部にシナプスを形成していた可能性が示唆される。からである。本研究では、その仮説を証明するとともに、シナプス競合現象も視野に入れて、Switching 機構について細胞生物学的点から及び分子機構の点からもそれらの機構の詳細をも明らかにすることを目的とした。分子としては、活動が生後 15 - 17 日に阻害されると登上線維の単一支配が阻害される代謝性グルタミン酸受容体 1 型(mGluR1)とその下流の系に着目した。

### 3. 研究の方法

1) 小脳の登上線維を生後5日、7日、9日、12日、17日、27日に下オリブ核に標識物質 BDA を注入することで標識し、その後約 2 ~ 3 日後(生後7日、9日、12日、15日、20日、30日)の齢にて灌流、固定し、切片を作成する。免疫染色法を用い、抗 Calbindin 抗体によりプルキンエ細胞を、VGluT1 (小胞性グルタミン酸トランスポーター 1 型) により平行線維末端を発色させた。

2) BDA により登上線維を DAB で、小胞抑制性グルタミン酸トランスポーター 1 型(VGLT1) 抗体をもちいて平行線維を金コロイドで標識することで、登上線維と平行線維をそれぞれ異なった発色剤で標識した。

3) 一個のプルキンエ細胞の細胞体から樹状突起までの100nm厚の超薄切片を約1,200枚作成し超微形態像を観察し、そのシナプスの分布などを詳細に解析する。また、3次元再構築を行った。

4) テリトリー形成における mGluR1 の機能的役割を追求するために、この遺伝子を欠損する mGluR1 ノックアウトマウスを同様の方法で解析して形成障害の表現型を確認する実験や、ウイスルベクターを用いて mGluR1 ノックアウトマウスに mGluR1 を導入してその表現型が解消することを確認するレスキュー実験を行った。

#### 4. 研究成果

登上線維テリトリーと遠位部の平行線維テリトリーとが分離は、生後15日から20日の間の平行線維シナプス除去によりなされることがわかった。具体的には、生後7日から15日までの野生型マウスでは、平行線維シナプス（下図の青い線維と水色の膨らみ）は樹状突起の全域に渡って分布していた。その間、1本の優勢な登上線維が細胞体から樹状突起に向かって伸長し（赤い線維と黄色の膨らみ）劣勢な登上線維（ピンクの線維）は細胞体から除去され、登上線維による単一支配を確立した。その後、生後20日になると、平行線維シナプスが樹状突起の近位部から突然消失した。

次に、平行線維シナプス除去にも mGluR1 が関わっているのではないかと考えた。というのも、過去の研究から、生後15日から16日における mGluR1 の活性化は登上線維シナプスの除去を駆動することがわかってきたため、ほぼ同時期に起こる平行線維シナプス除去にも関与するのではないかと考えたからである。

mGluR1 欠損マウスを解析すると、平行線維シナプス除去が障害されており、生後30日になっても平行線維シナプスが樹状突起の全域に広がり、テリトリーの分離が起こらないままになっていた。同様の表現型は、mGluR1 の下流で活性化するタンパク質リジン酸化酵素 PKC $\gamma$  欠損マウスでも観察された。

ウイルスベクターを用いて生後20日の mGluR1 欠損マウスに mGluR1 を導入するレスキュー実験を行い、生後40日にシナプス回路を精査したところ、樹状突起近位部から平行線維シナプスが除去されテリトリーの分離が起こることがわかった。

以上の結果から、mGluR1 から PKC $\gamma$  に至るシグナル伝達系の活性化は、劣勢な登上線維の除去に加え、樹状突起近位部から平行線維シナプスの除去に関わることが明らかとなった。従って、プルキンエ細胞の2つの回路特性（登上線維の単一支配と分離分節化した支配テリトリー）は、このシグナル伝達系の活性化を通して発達し構築されることが明らかとなった。

図2：mGluR1 伝達系によるシナプス回路発達

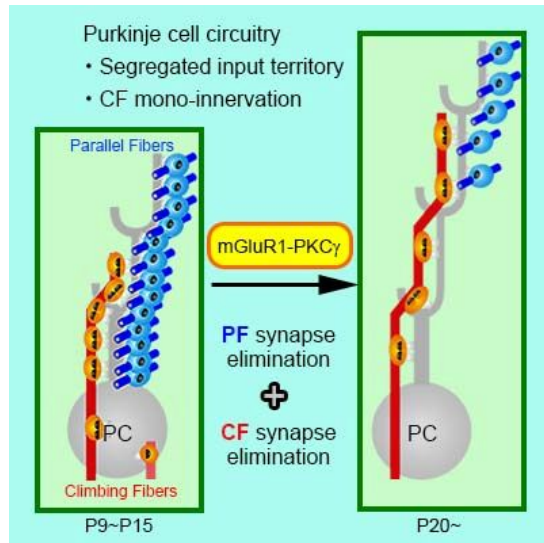
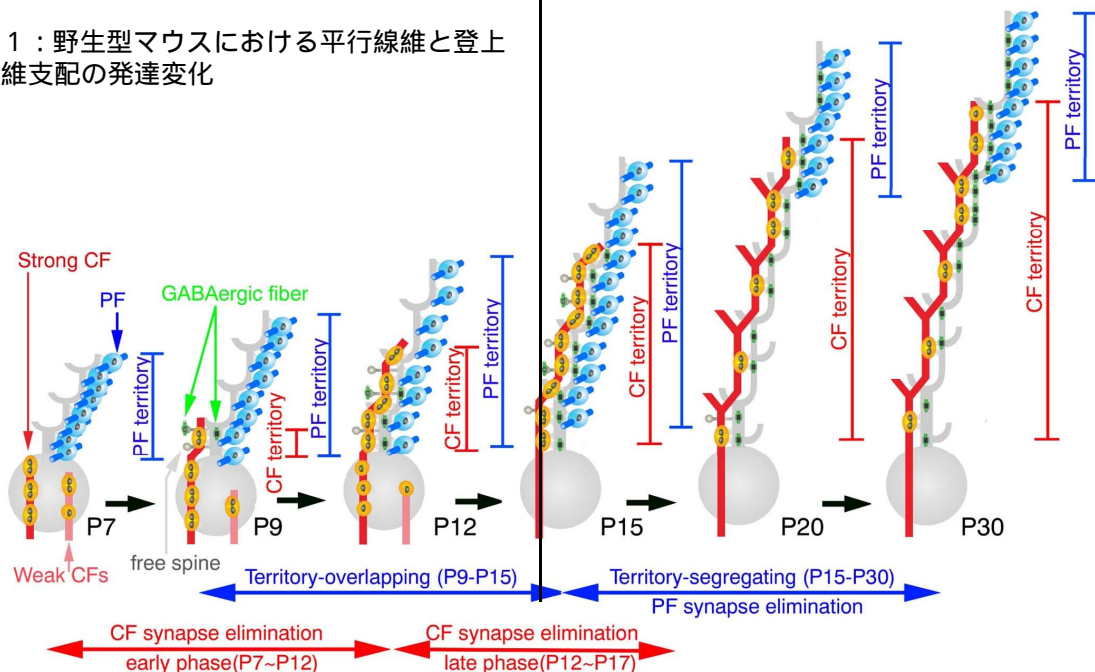


図1：野生型マウスにおける平行線維と登上線維支配の発達変化



発達過程における異種入力線維による支配テリトリーの分離は、プルキンエ細胞における神経情報の処理や統合機能を向上させ、登上線維と平行線維の異種シナプス活動に基づくシナプス可塑性の誘発特性にも影響を与え、運動機能制御の基盤となる小脳神経回路の構造・機能の成熟に貢献すると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Ichikawa R, Hashimoto K, Miyazaki T, Uchigashima M, Yamasaki M, Aiba A, Kano M, Watanabe M. Territories of heterologous inputs onto Purkinje cell dendrites are segregated by mGluR1-dependent parallel fiber synapse elimination. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読あり 113: 2282-2287, 2016 doi: 10.1073/pnas.1511513113.
- (2) Ichikawa R, Sakimura K, Watanabe M. GluD2 endows parallel fiber-Purkinje cell synapses with a high regenerative capacity. 査読あり J Neurosci, 36:4846-4858, 2016 doi: 10.1523/JNEUROSCI.0161-16

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 市川量一、小脳プルキンエ細胞の樹状突起上のシナプス形成 35 回日本神経科学大会 2012 年 09 月 18 日 名古屋国際会議場 (名古屋市)
- (2) 市川量一、障害後の平行線維シナプス再生に関わるグルタミン酸受容体 2 分子の役割 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2013 年 03 月 28 日 かがわ国際会議場 (高松市)
- (3) 市川量一 The process in the regeneration of parallel fiber synapses after transection 第 36 回日本神経科学大会 2013 年 06 月 20 日 京都国際会館 (京都市)
- (4) 市川量一 登上線維入力を欠落させた小脳プルキンエ細胞のシナプス構築の変化 第 119 回日本解剖学会総会 2015 年 3 月 30 日 自治医科大学付属病院 (下野市)
- (5) 市川量一 The process in the regeneration of synaptic wiring on cell dendrite after the damage of climbing fiber or with parallel fiber 第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜 (横浜市)
- (6) 市川量一 The formation of climbing fiber synapses with cerebellar purkinje cell in hypogaranular mice 第 120 回日本解剖学会総会 2015 年 3 月 21 日 神戸国際会議場 (神戸市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
市川 量一 (ICHIKAWA RYOICHI)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10223091
- (2) 研究分担者  
無し
- (3) 連携研究者  
無し