

論文の内容の要旨

論文題目 **Specific impairment of the late phase of climbing fiber synapse elimination by global scaling-down of excitatory postsynaptic responses in cerebellar Purkinje cells**

(小脳プルキンエ細胞の興奮性シナプス応答の全般的減少による登上線維シナプス除去の後期過程特異的な障害)

氏名 川田 慎也

序文

生後発達期の神経回路形成は正常な脳機能発現のために重要な過程である。出生までにまず過剰なシナプスが形成され、その後に機能的に重要なシナプスが強化されて残り、不要なものが除去されることが知られている。この現象はシナプスの刈り込みと呼ばれ、様々な動物種の末梢・中枢神経系で観察されており、生後発達期の機能的神経回路形成に必須であると考えられている。この過程において、残るシナプスと刈り込まれるシナプスの選別は競合するシナプス間の相対的な強度の差に依存することが知られている。この相対的な強度の差は長期増強や長期抑圧といった、シナプス特異的で活動依存的なシナプス可塑性 (Hebbian plasticity) によって生ずると考えられている。特に、最近の研究では、Spike-timing dependent plasticity (STDP) の関与が強く示唆されている。一方、神経細胞全体のシナプス強度は Homeostatic plasticity によって調節されている。Homeostatic plasticity は異なるシナプス間の相対的な強度差は保ったまま、神経細胞全体のシナプスの絶対強度を調節し、神経活動の恒常性維持に寄与している。しかし、シナプスの絶対強度がシナプスの刈り込みに関与しているかどうかは未だ知られていない。本研究では、この問題について、生後発達期の小脳登上線維—プルキンエ細胞シナプスの刈り込みをモデル実験系として用いて調べた。

小脳登上線維—プルキンエ細胞シナプスでは生後 3 日目 (P3) の段階で複数の登上線維が 1 つのプルキンエ細胞の細胞体にシナプスを形成しており (multiple innervation)、それぞれの入力強度に大きな差はない。P7 までに一本の登上線維入力だけが他と比べて相対的に強くなる (functional differentiation)。P7 から P12 にかけて相対的に弱い登上線維は除去され (前期除去過程)、並行して P9 頃から強化された一本の登上線維だけがプルキンエ細胞の樹状突起に伸展する (CF translocation)。その後細胞体に残存した登上線維シナプスは P16 にかけて非選択的に刈り込まれる (後期除去過程)。このようにして、成獣の小脳では、1 本の登上線維が個々のプルキンエ細胞の樹状突起を支配するようになる。

小脳登上線維—プルキンエ細胞シナプスの生後発達においてシナプスの絶対的強度がどのような役割を果たしているかを調べるために、本研究においては、stargazin (TARP γ -2) に注目した。TARP γ -2 は AMPA 受容体の膜発現とシナプス後部への輸送を担っており、 γ -2 null mutant mouse では登上線維—プルキンエ細胞シナプスの強度が大幅に減少することが知られている。TARP γ -2 は小脳顆粒細胞をはじめ、プルキンエ細胞以外の神経細胞にも発現しているため、本研究においては Cre-loxP システムを用いてプルキンエ細胞特異的な γ -2 ノックアウトマウス (γ -2 PC-KO mouse) を作製し、電気生理学および形態学的解析を行った。

結果

γ -2 PC-KO mouse もしくは野生型 mouse の小脳虫部から作製した矢状断急性スライスにおいてプルキンエ細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い、登上線維が走行している顆粒細胞層を電気刺激して登上線維による興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録した。まず P3-P43 の間で登上線維応答の振幅を野生型と γ -2 PC-KO mouse で比較したところ、P6以降に γ -2 PC-KO mouse ではおよそ半分程度に減少していた。一方、異なる線維間の相対的な強度の差に変化はなかった。すなわち γ -2 PC-KO mouse では競合する異なる線維間の相対関係は保ったままシナプス強度が全般的に減少しているということが分かった。

次にこのシナプス強度の全般的減少が登上線維—プルキンエ細胞シナプスの発達過程にどのような影響を与えているかを調べた。まず登上線維終末に発現している2型グルタミン酸トランスポーター (vGluT2) の免疫染色を行い、登上線維のプルキンエ細胞樹状突起への伸展の度合いを小脳皮質分子層の厚さと比較した。その結果、 γ -2 PC-KO mouse では伸展が有意に低いことが分かった。次に P21-P43 においてプルキンエ細胞を支配している登上線維の本数を電気生理学的に調べたところ、 γ -2 PC-KO mouse では複数の登上線維に支配されているプルキンエ細胞が有意に多いことが分かった。これらの結果は、 γ -2 PC-KO mouse において登上線維の樹状突起への進展と過剰な登上線維シナプスの除去が障害されていることを示している。

前述したように登上線維シナプスの除去過程は前期過程と後期過程に分けられる。 γ -2 PC-KO mouse においてどちらの過程が障害されているかを調べるために、それぞれの境界前後の日齢で、プルキンエ細胞を支配する登上線維の本数を調べたところ、P11—P13では異常がみられないのに対して、P15—P17では、複数の登上線維に支配されているプルキンエ細胞が γ -2 PC-KO mouse では有意に多いことが分かった。すなわち、 γ -2 PC-KO mouse では登上線維シナプスの後期除去過程が特異的に障害されていることが明らかになった。

これまでの研究から登上線維—プルキンエ細胞シナプスの後期除去過程には代謝型グルタミン酸

受容体1型 (mGluR1) を介する細胞内シグナル伝達経路及びプルキンエ細胞への抑制性入力が発達に寄与していることが知られていた。そこで γ -2 PC-KO mouseにおける後期除去過程の障害がこれらの経路の異常によるものかを調べたが両経路ともに正常に機能していることがわかった。

最近の研究から登上線維シナプスの後期除去過程にはP/Q型電位依存性カルシウムチャンネルを介した最初期遺伝子Arcの活性化が必要であることが明らかとなった。 γ -2 PC-KO mouseでは登上線維シナプス強度の減少により電位依存性カルシウムチャンネルを介したこの経路が障害されている可能性が考えられる。そこで、まず登上線維入力に伴うプルキンエ細胞におけるカルシウム上昇を観察したところ、 γ -2 PC-KO mouseではカルシウム上昇幅が有意に減少していた。この結果は γ -2 PC-KO mouseにおいてカルシウムを介したArcの発現が十分でないために、登上線維シナプス除去が障害された可能性を示唆する。それならば、Arcを過剰発現させることでシナプス除去障害を回復できると考え、レンチウイルスベクターを用いたプルキンエ細胞特異的遺伝子導入法により γ -2 PC-KO mouseのプルキンエ細胞にArcを過剰発現させた。その結果、Arcを過剰発現したプルキンエ細胞では対照に比べて、支配する登上線維の本数が少なく、シナプス刈り込みの障害がレスキューされていた。次に γ -2 PC-KO mouseでArcノックダウンを行ったところ登上線維の本数分布には全く影響は見られなかったことから、 γ -2 PC-KO mouseではArcによるシナプス除去過程は機能していないと考えられた。これらの結果から γ -2 PC-KO mouseではArcを介したシナプス除去過程が障害されていることが明らかになった。

考察

本研究において γ -2 PC-KO mouse では登上線維—プルキンエ細胞シナプス強度が全般的に減少することで、プルキンエ細胞における登上線維入力由来のカルシウムシグナルが減弱しており、Arcを介するシナプス除去後期過程が障害されたと結論した。本研究より、シナプスの刈り込みにおいて異なる入力間の相対的な強度の差だけでなく、シナプスの絶対的な強度も重要な因子として寄与していると考えられる。

γ -2 PC-KO mouse ではシナプス除去過程以外に登上線維の樹状突起進展にも障害がみられた。これまでの研究からプルキンエ細胞におけるカルシウムシグナルと登上線維の樹状突起進展の関連性が示されており、これらから登上線維シナプスの絶対的強度はカルシウムシグナル経路の活性化によりシナプス除去だけでなく樹状突起進展にも寄与していると考えられる。

これまでの研究から登上線維シナプス除去の前期過程には P/Q 型電位依存性カルシウムチャンネルが関与していることが知られているが、 γ -2 PC-KO mouse では登上線維シナプスの絶対的強度の減少は P6 からみられるため、カルシウムシグナル経路活性化の障害は前期除去過程の時期においても生じていると考えられる。実際に登上線維入力によるプルキンエ細胞におけるカルシウム上昇幅を調べたところ、後期過程の時期と同様に減少していることが分かった。しかし前期過程は正

常に進行していたことから、複数の登上線維がプルキンエ細胞の細胞体上で近接した状態で競合しているシナプス除去前期過程においては、異なる入力間の相対的な強度の差がより重要であると考えられる。

γ -2 PC-KO mouse においては、Arc の過剰発現によって後期登上線維シナプス除去の障害がレスキューされ、Arc ノックダウンではシナプス除去に影響を及ぼさなかった。これらは登上線維シナプスの絶対的強度はカルシウムシグナル経路を介した Arc の発現に寄与していることを示唆している。シナプス除去後期過程においては強い登上線維は既にプルキンエ細胞の樹状突起へと伸展しており、細胞体に存在するシナプスは強い登上線維由来のものも弱い登上線維由来のものも同様に刈り込まれると考えられている。 γ -2 PC-KO mouse においては、登上線維シナプス入力の全般的な減少が細胞体における Arc 発現の低下を招き、細胞上の登上線維シナプスが除去されずに残存したと考えられる。

以上より小脳登上線維—プルキンエ細胞シナプスの発達過程においては Hebbian plasticity 及び STDP だけでなく Homeostatic plasticity も寄与しており、これらのシナプス可塑性がそれぞれ異なるプロセスを制御することで、成熟した機構的神経回路が形成されると考えられる。