

論文の内容の要旨

Activity-dependent functional maintenance of parallel fiber-Purkinje cell synapses in the adult mouse cerebellum

成熟マウス小脳平行線維-プルキンエ細胞シナプスにおける活動依存的機能維持

指導教員 飯野 正光 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 古谷 和春

中枢神経系におけるシナプス機能の可塑的变化は、記憶学習の素過程と考えられ、盛んに研究が進められている。一方、シナプス機能の維持については、情報の正確な伝達や蓄積に重要であると考えられているにも関わらず、多くの点で不明である。中枢神経系の多くのシナプスは活動依存的に発達、成熟することが知られているが、成熟したシナプス機能を維持するために神経活動が必要であるのか十分調べられていない。本研究では、細胞構築やシグナル伝達経路が比較的明らかにされており、神経活動依存的な回路網発達がよく調べられている小脳皮質内の、平行線維-プルキンエ細胞シナプスをモデルとし、このシナプスにおける機能維持機構を明らかにすることを目的とした。

本研究ではプルキンエ細胞内でおこるシグナル伝達系のうち、Inositol 1,4,5 trisphosphate (IP₃) シグナリングに注目した。IP₃ は細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出を制御するセカンドメッセンジャーであり、細胞外からの刺激に応じて、様々な細胞機能を調節することが知られている。平行線維-プルキンエ細胞シナプスの活動により、プルキンエ細胞において代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) 依存的な IP₃ 産生がおこる。しかしながら、プルキンエ細胞において生理的におこる IP₃ 産生が果たしている役割に関しては、知見は非常に乏しい。

生体内におけるプルキンエ細胞選択的な IP₃ シグナリングの阻害は、ウイルスベクターを用い、IP₃ 分解酵素である IP₃ 5-phosphatase をマウス小脳のプルキンエ細胞に発現させることで達成した。この方法により非常に強力に IP₃ シグナリングを阻害できることは、同一条件で行なわれた以前の研究で示されている。IP₃ 5-phosphatase を発現させたことによるシナプス機能への影響を調べるため、自由に行動できるマウスの脳内で十分な

タンパク質の発現を待った後（ウイルス液を注入後 24 時間後）、急性小脳スライス標本を作製し、プルキンエ細胞にホールセル・パッチクランプ法を適用し、平行線維入力に応じた興奮性シナプス後電流（平行線維 EPSC）を記録した。その結果、IP₃ 5-phosphatase 発現プルキンエ細胞において平行線維入力に対する応答が有意に低下していることを見いだした（図 1）。一方、近傍のウイルス非感染プルキンエ細胞、もしくは酵素活性を欠損した変異体 IP₃ 5-phosphatase (R343A) 発現プルキンエ細胞からの記録ではこのような変化は認められなかった（図 1）。このことは、生体内で生理的に起こる、プルキンエ細胞内 IP₃ 産生がシナプス機能を維持するために必須であることを示している。

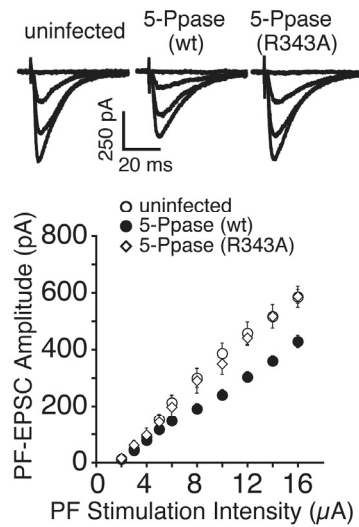


図 1 IP₃ 5-phosphatase (5-Ppase) 発現プルキンエ細胞では平行線維入力に対する応答が小さい

次に IP₃ 5-phosphatase 発現によるシナプス機能低下の機序を解析した。シナプスにおける伝達過程は伝達物質の放出過程と受容過程からなる。まず、IP₃ 5-phosphatase を発現させたプルキンエ細胞の機能変化について検討した。細胞外液の Ca²⁺イオンを Sr²⁺イオンに置換すると、電気刺激により誘発される EPSC を構成する個々の成分（量子 EPSC）がばらけて出現し、記録可能になる。この量子 EPSC の振幅には IP₃ 5-phosphatase 発現群と対照群の間に有意な変化は認められず、このことからシナプス後細胞の伝達物質への感受性には変化がないと考えられた。一方、シナプス前終末からの伝達物質放出確率における変化を解析するため paired-pulse ratio および coefficient of variation を比較したところ、IP₃ 5-phosphatase 発現群において有意な値の上昇が認められた（図 2）。このことは IP₃ 5-phosphatase 発現プルキンエ細胞に入力する平行線維からの伝達物質放出確率の低下を示唆する。

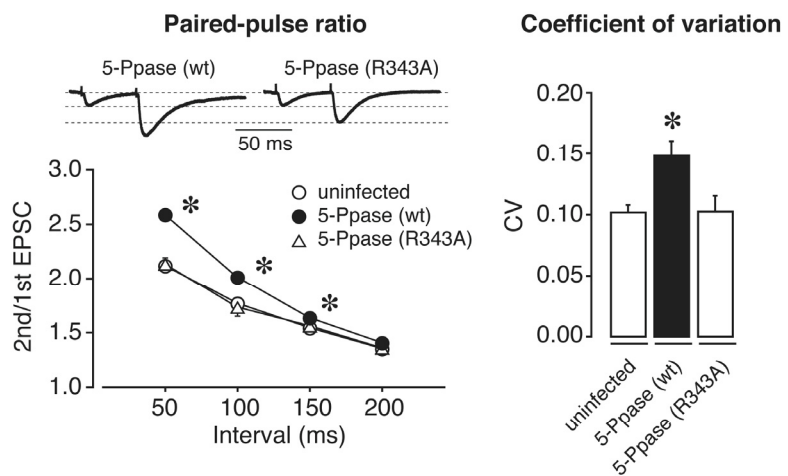


図 2 IP₃ 5-phosphatase 発現プルキンエ細胞では平行線維シナプス応答における Paired-pulse ratio 及び Coefficient of variation (CV) が有意に大きい

次に、平行線維シナプス機能を維持する為に必要なプルキンエ細胞 IP_3 シグナリングが、どのような神経活動により引き起こされるのか調べた。仮説として、平行線維の活動による $mGluR$ の活性化が関与していると考えられた。そこでこれを検証した。

グルタミン酸受容体拮抗薬を含んだ有機樹脂ポリマーの小片をマウス小脳皮質表面上に埋め込むことによって、*in vivo* における神経伝達阻害を達成した。小脳回路網が完成した生後3週目以降、 $mGluR$ 拮抗薬を小脳局所へ慢性投与し、その後、急性小脳スライスを作成し、薬物を洗い流した後、シナプス機能への影響を調べた。 $mGluR$ 拮抗薬投与部位付近のプルキンエ細胞からホールセル記録を行なったところ、 IP_3 5-phosphatase を発現した際と同様の平行線維機能低下が認められた。一方、同一スライス内でも薬物投与部位から離れた位置のプルキンエ細胞からの記録ではシナプス機能に変化は認められなかった。このことは、平行線維シナプス機能が局所的な $mGluR$ の活動に依存して維持されていることを示している。さらに、同様の方法により $NMDA$ 型グルタミン酸受容体拮抗薬を投与し、平行線維の細胞体である顆粒細胞の発火に必要な $NMDA$ 型グルタミン酸入力を抑制することによっても、平行線維機能が低下することが明らかとなった。つまり仮説は支持され、平行線維の活動によるシナプス後膜 $mGluR$ の活性化とそれに続く IP_3 産生が平行線維シナプス前終末機能を維持するため必要であると考えられた (図3)。

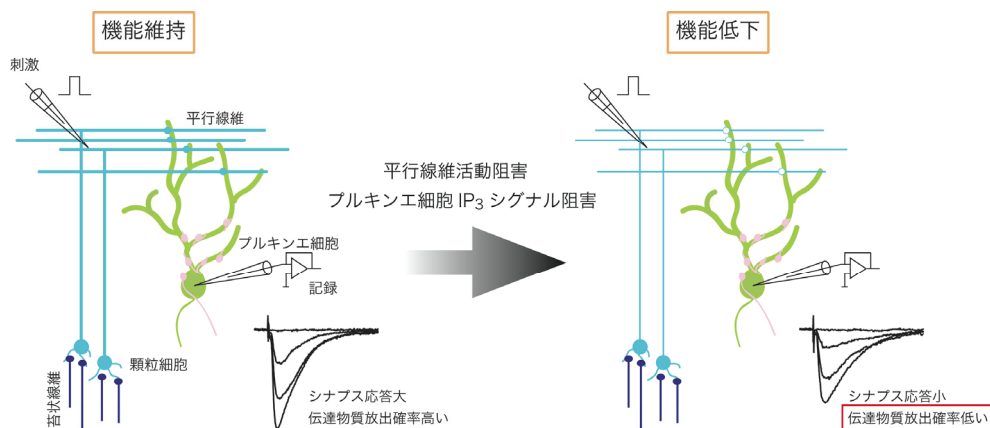


図3 プルキンエ細胞における IP_3 シグナルを慢性的に阻害することで起こる平行線維入力への減弱

引き続き、シナプス後細胞 (プルキンエ細胞) における IP_3 シグナリングがシナプス前終末 (平行線維) からの伝達物質放出確率を維持する機構を解析した。このような機構として、シナプスを逆行する制御因子の関与が推測される。成熟小脳において脳由来神経栄養因子 (BDNF) はプルキンエ細胞に多く発現し、平行線維終末に $BDNF$ 受容体 $TrkB$ の発現が示唆されている。さらに $BDNF$ 遺伝子欠損マウスにおいて平行線維-プルキンエ細胞シナプスのシナプス前終末機能の変化が報告されている。 $BDNF$ は神経活

動依存的に産生、遊離されることが報告されているが、成熟小脳における役割は十分調べられていない。本研究において、Trk 受容体阻害薬である K252a や BDNF の中和抗体を、発達期を終えた小脳皮質への慢性投与することにより、平行線維からの伝達物質放出確率が有意に低下することを見いだした。このことから、BDNF のシナプス機能維持機構への関与が推測された。

そこで BDNF が IP₃ シグナリングの下流でシナプス維持機構に関与しているのか解析した。ウイルスベクターを用いた遺伝学的手法と有機樹脂ポリマーを用いた薬理学的手法を同時に適用することにより、(1) IP₃ 5-phosphatase 発現によるシナプス前終末機能低下は外因的な BDNF の投与により完全に救助されること、(2) IP₃ 5-phosphatase 発現細胞において、BDNF の中和抗体の投与は更なる作用を示さないことが明らかとなった (図 4)。このことは、BDNF 中和抗体が IP₃ 5-phosphatase と同一の機序により、しかも IP₃ シグナリングの下流においてシナプス前終末機能を低下させていることを意味する。

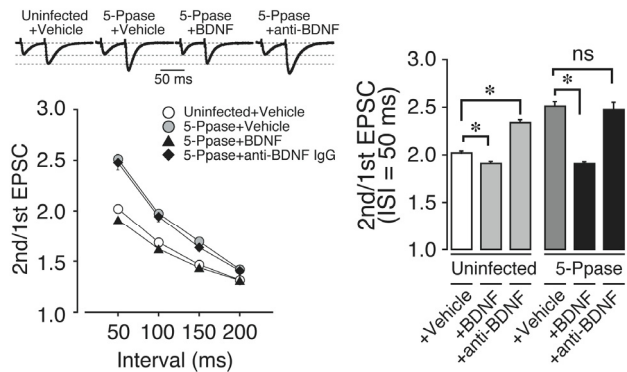


図 4 IP₃ 依存的なシナプス維持機能への BDNF の関与

このような一連の実験により、成熟小脳平行線維—プルキンエ細胞において、活動依存的なシナプス機能維持機構の存在とその分子機構が明らかとなった (図 5)。平行線維終末から放出されたグルタミン酸はシナプス後膜の mGluR を活性化し、IP₃-BDNF を介したシグナル伝達系により平行線維終末に再び伝えられる。このようなフィードバック経路によりシナプス機能は維持されている。本研究によって明らかにされたこれらの知見は、成熟脳におけるシナプス維持機構の解明という未解決な問題に光を当て、また mGluR を介したシグナル伝達系の生理的意義の理解を進めるものであると考えられる。

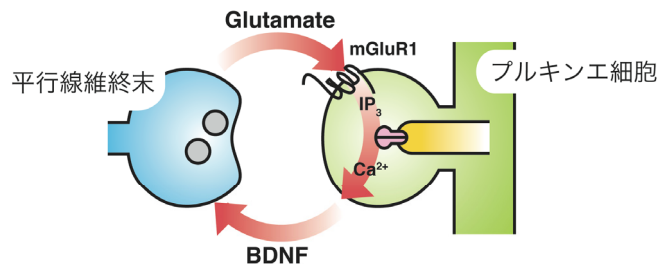


図 5 本研究で示唆された平行線維—プルキンエ細胞シナプスの機能維持に関するポジティブフィードバック機構の模式図