

研究報告書

「小脳のシナプス刈り込みと機能的神経回路形成の機構解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 橋本浩一

1. 研究のねらい

子供は大人に比べて、言語の習得やある種の運動技能の習得を容易に行うことができることはよく知られている。最近の研究から、生後発達期に起こるある種の感覚機能の成熟や運動機能の獲得に、神経回路の柔軟性が重要な働きをしていることが明らかになってきた。脳が正しく機能するためには、神経細胞が「適切な標的」に「適切な強度・適切な数」のシナプス結合を形成することが必要不可欠であるが、生まれた時すでに精緻、かつ機能的な神経回路が出来上がっている訳ではない。誕生直後の動物の神経回路には、成熟動物に比べて過剰なシナプス結合が存在し、機能的にも未成熟な状態にある。生後発達の過程でこれらの過剰な結合の中から、機能的に必要なものが強化され、不必要なものが除去されていくことにより、次第に機能的な神経回路が形成されていく(生後発達期シナプスの刈り込み)。シナプスの刈り込みが正常に起こるためには、神経細胞が周りの環境などの刺激を受けて、電気的に活動することが必須であることが知られている。しかし、神経細胞の電気活動が、どのような分子メカニズムを介してシナプスの刈り込みを制御しているのか、という点はほとんど明らかになっていない。

本研究では、生後発達期の小脳登上線維—プルキンエ細胞シナプスで見られる“刈り込み”をモデル実験系として用い、中枢神経系のシナプス刈り込みの機序の解明を目的として解析を行った。成熟げっ歯類のプルキンエ細胞は 1 本の登上線維によってのみ支配されている(図 1、“成熟時”)が、誕生直後のプルキンエ細胞は、比較的同等のシナプス強度を持った複数の登上線維により多重支配されている(図 1、“生後 3 日”)。その後、過剰なシナプスが刈り込まれて、マウス・ラットでは生後 3 週目までに 1 本支配に移行する。本研究では特に生後 1 週目に起こる、多数の候補シナプスの中から特定の 1 本が選択強化されるプロセス(登上線維の機能分化、図 1)に着目し、この過程の神経活動依存性や、関与する分子メカニズムの解析を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

我々のこれまでの研究から、小脳登上線維—プルキンエ細胞シナプスの生後発達変化は以下のようなプロセスをたどることが分かっている。生後すぐのプルキンエ細胞の細胞体は、同じようなシナプス強度を持った複数の登上線維により多重支配されている。生後 7 日前後までに、その中から 1 本の登上線維が細胞体上で選択的に強化される(機能分化)。その後、強化された登上線維は、生後 9 日目前後からプルキンエ細胞の樹状突起に移行する(translocation)。それ以外の登上線維は細胞体に残存しており、メカニズムの異なる 2 つの

シナプス除去プロセス(前期除去過程・後期除去過程)を経て除去され、最終的に大人型の単一支配に移行する。

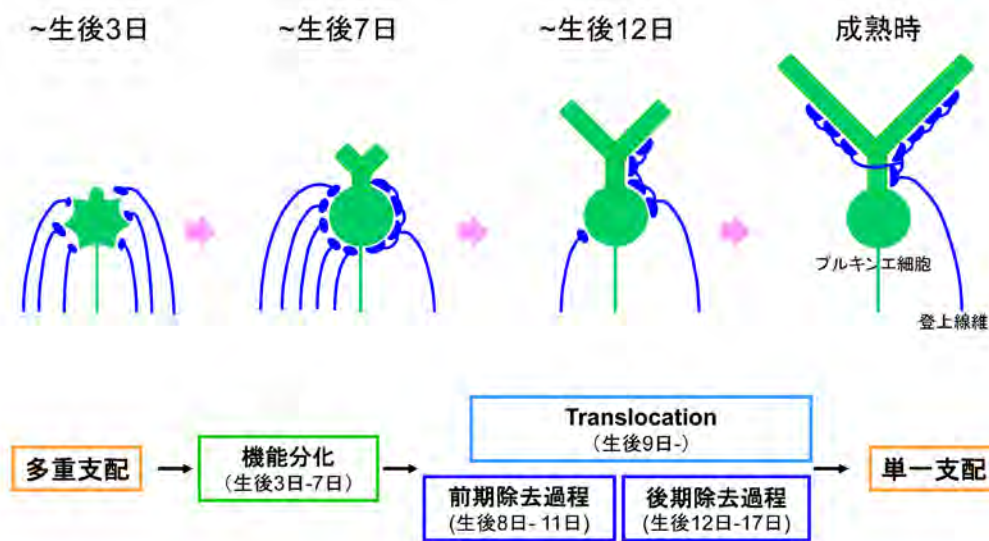


図 1、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達

本実験において私達は、シナプスの刈り込みの際に必要な神経回路の選別・除去のプロセスに働く因子として、P/Q 型電位依存性カルシウムチャネル(以下、P/Q チャネル)に注目し、解析を行った。電位依存性カルシウムチャネルは細胞膜で神経細胞の電気活動を検知して開口し、細胞の中にカルシウムイオンの流入を引き起こす働きを持っている。よって神経活動をモニターし、その履歴を細胞内のシグナル伝達系に変換するメカニズムとして働くことが期待される。P/Q チャネルのノックアウトマウスにおいて、上記のどのプロセスの、どのような側面が障害されるかを解析した結果、登上線維の機能分化と、前期シナプス除去過程に強い障害が見られることが分かった。また、プルキンエ細胞選択的に Cav2.1 を欠損させたマウスにおいても上記と同様の結果が得られた。これらの結果は、シナプス後部に存在する P/Q チャネルが、最終的に残存する一本の登上線維の選別と、前期シナプス除去過程に必須であることを示している。

(2) 詳細

(1) Cav2.1 ノックアウトマウスの解析

P/Q チャネルのシナプス刈り込みにおける機序を明らかにするため、その主要なサブユニットである、Cav2.1 が全身の細胞から欠損したノックアウトマウス(KO)を解析した。この KO マウスは生後 4 週目までは生存しており、P/Q チャネルの機能が完全に消失していることがすでに確認されている。野生型、及び Cav2.1KO の小脳から急性スライスを作成し、スライス上のプルキンエ細胞からホールセル記録を行った。入力する登上線維を電気刺激して登上線維由来の興奮性シナプス後電流(EPSC)を記録した。登上線維 EPSC は通常のシナプス応答に比べて振幅が大きい為、電気刺激することにより登上線維を 1 本 1 本区別して数えることができる。この性質を利用して、刺激強度を徐々に変化させることにより投射している登上線維の本数を解析する実験を行った。

生後すぐの野生型マウスのプルキンエ細胞は、比較的同等なシナプス強度を持った複数の弱い登上線維により多重支配を受けている(図 2 左)。この生後発達初期の登上線維シナプス形成には、野生型マウスと Cav2.1 KO マウスの間に差は見られなかった。その後、野生型マウスでは、生後 7 日齢までの間に将来プルキンエ細胞を支配することになる 1 本の登上線維 EPSC の選択的強化が起こる(図 2 右上)。引き続き生後 8 日から生後 12 日にかけて、前期除去過程が起こって投射している登上線維の本数が減少する。一方、Cav2.1 KO マウスでは、生後 7 日目までに起こる 1 本の登上線維の選択的強化が正常に起こらず、複数の登上線維 EPSC が非選択的に強化されていた(図 2 右下)。また、引き続いて起こるはずの、前期シナプス除去過程も障害されていた。このことは、Cav2.1 の欠損により、最終的に残存する登上線維の機能的な選択的強化と、生後発達の早い時期に起こる過剰なシナプス刈り込みが正常に起こらなくなることを示している(論文 1)。



図 2、Cav2.1 遺伝子組み換えマウスの解析

(2)プルキンエ細胞選択的 Cav2.1 KO マウスの解析

P/Q チャネルはシナプス後部のプルキンエ細胞に多く存在することが分かっているが、シナプス前終末である登上線維や平行線維にも存在しており、シナプス伝達などに重要な働きをしている。よって、全身の遺伝子が欠損したマウスの解析からは、どの脳部位の P/Q チャネルがシナプス刈り込みに重要な働きをしているのか、を明らかにすることはできない。そこで、小脳のプルキンエ細胞でのみ Cav2.1 が欠損するマウスを作成し、シナプス後部の神経細胞に存在する P/Q チャネルが登上線維の生後発達に果たす役割を解析した。

プルキンエ細胞から Cav2.1 を選択的に欠損する為、Cre-lox システムを用いた。まず、Cav2.1 の 4 番目の exon が lox 配列ではさまれたマウスを作成した。その後、プルキンエ細胞で特異的な発現が見られるグルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットの遺伝子座に Cre が挿入されたマウスと掛け合わせて、プルキンエ細胞特異的な KO マウスを作成した。作成されたプルキンエ細胞選択的 Cav2.1 KO マウスは、成体まで成長し妊娠も可能であったが、強い運動失調を示した。このマウスにおいて、In situ hybridization および電気生理学的解析を行い、登上線維の機能分化が開始する前の生後 2 日目の段階ですでにプルキンエ細胞から Cav2.1 が欠損していることを確認した。一方、登上線維のシナプス伝達に関わる P/Q チャネルは正常であった。

プルキンエ細胞選択的 Cav2.1 KO マウスにおいて、Cav2.1 KO マウスで行われたものと同様の実験を行い、登上線維の発達過程の異常の有無を解析した。その結果、プルキンエ細胞選択的 Cav2.1 KO マウスにおいても、生後 1 週目までに起こる登上線維の選択的強化

と、前期シナプス除去過程に障害が見られることが分かった(図 2 右下)。この結果は、Cav2.1 KO マウスで見られた登上線維の生後発達の異常は、ほぼシナプス後部のプルキンエ細胞にある Cav2.1 の欠損によって引き起こされていることを示している(論文 1)。

(3) 考察

これら結果は、シナプス後部の神経細胞(プルキンエ細胞)に存在する P/Q チャネルが、生後発達初期の神経回路で起こる、機能的に必要なシナプスを選別して強化するプロセス、および不必要なシナプスを除去するプロセスに必須であることを示唆している。また本研究は、“シナプスを強化する機構”と、“その強化をあるシナプスに集中する機構”を司るメカニズムは異なっていることを示唆している。Cav2.1 の遺伝子組み換えマウスでは、登上線維 EPSC の発達が完全に止まっている訳ではなく、シナプス応答の強さは野生型並みに強化されていた。ただ、野生型マウスではその強化が 1 本の登上線維に集中していたのに対し、Cav2.1 組み換えマウスでは複数の登上線維が非選択的に強化されていた。このことは、P/Q チャネルの活動が、シナプスを強化する何らかのメカニズム(栄養因子?)を特定のシナプスに集中的に配分する機能を持っていることを示唆している。

3. 今後の展開

生後発達期に起こる神経回路の再編成は、神経活動に強く依存することはよく知られているが、神経活動がどのような機序により必要なシナプスとそうでないシナプスを選別しているのか、という点についてはほとんど明らかになっていない。

登上線維—プルキンエ細胞シナプスの再編成においてもこの点は不明であったが、本研究により、シナプス後部に存在する P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルがその過程に重要な働きをすることが明らかになった。電位依存性カルシウムチャネルは神経活動により活性化して細胞内にカルシウム濃度の上昇を引き起こすため、“神経活動の履歴を細胞内のシグナル伝達系に変換する機構”として働いている可能性が考えられる。よって今後の展開としては、P/Q チャネル以降に、細胞内で活性化される因子の解明を進める必要がある。候補としては、細胞内カルシウム上昇によって活性化される細胞内因子の関与が予想されるが、現在の所詳細は不明である。また、P/Q チャネルなどの活動を指標に、最終的に形態学的に除去されるシナプスと残存するシナプスを標識する機構や、標識を基に強化や除去を進めるメカニズムの存在も予想される。これらの機構についても解明を進める必要があると思われる。

本研究から直ちにシナプス再編成の原理が明らかになったとはいえないが、今回の解析は、神経活動が回路の再編成に影響を与える機構について、重要な手がかりを提供してくれると考えている。今後は、さらに生後発達初期に働く因子の解明を推し進め、生後発達期神経回路の再編成に働く因子の全貌を明らかにしていきたいと考えている。

4. 自己評価

本研究領域では、脳を構成する神経回路の形成やその動作原理ならびにその制御機構の解明を進めることが主たる研究目的となっている。本研究成果は、これらのうち神経回路の形

成のメカニズムを明らかにするという点で貢献できたと考えている。

5. 研究総括の見解

中枢神経系の回路形成においてはターゲット細胞に対して一旦過剰なシナプスが形成され、成熟にしたがって特定の入力を選択強化されること(刈り込み)が知られているが、その分子機構についてはよく分かっていない。本研究では、マウス小脳の登上線維-プルキンエ細胞間のシナプスで電位依存性カルシウムチャンネルに着目し、電気生理学的方法によって入力の数数を数え上げて、カルシウムチャンネルサブユニット欠損系統と野生型を比較しながら生後発達を解析することにより、このチャンネルが入力の選択的強化とシナプス除去に必須であることを見出した。さらに、プルキンエ細胞特異的にこのカルシウムチャンネルを欠損させたマウス系統を作出して同様の症状を観察し、シナプス後部に発現するチャンネルがこの刈り込みに重要であることを証明した。発達に伴う神経回路再編成の分子機構の一端を精度の高い実験によって明らかにした優れた研究である。今後細胞内カルシウム上昇の下流の分子機構の解析も進展し、また他の細胞が関わる刈り込みのメカニズムにも解析が展開することが期待される。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Hashimoto, K., Tsujita, M., Miyazaki, T., Kitamura, K., Yamazaki, M., Shin, H.S., Watanabe, M., Sakimura, K. & *Kano, M Postsynaptic P/Q-type Ca^{2+} channels in cerebellar Purkinje cells mediate synaptic competition among multiple climbing fiber inputs during postnatal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108, 9987-9992 (2011)
2. Nakayama, H., Miyazaki, T., Kitamura, K., Hashimoto, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Sakimura, K., Watanabe, M. & Kano, M. GABAergic inhibition regulates developmental synapse elimination in the cerebellum. *Neuron* 74, 384-396 (2012)
3. Ichikawa, R., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Konno, K., Hashimoto, K., Tatsumi, H., Inoue, Y., Kano, M. & Watanabe, M. Developmental switching of perisomatic innervation from climbing fibers to Basket cell fibers in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 31, 16916-16927 (2011)
4. Miyazaki, T., Yamasaki, M., Hashimoto, K., Yamazaki, M., Abe, M., Usui, H., Kano, M., Sakimura, K. & Watanabe, M. Cav2.1 in cerebellar Purkinje cells regulates competitive excitatory synaptic wiring, cell survival, and cerebellar biochemical compartmentalization. *J. Neurosci.* 32, 1311-1328 (2012)
5. Uesaka, N., Mikuni, T., Hashimoto, K., Hirai, H., Sakimura, K. & Kano, M. Organotypic coculture preparation for the study of developmental synapse

elimination in mammalian brain. *J. Neurosci.* 32, 11657-11670 (2012)

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. 橋本 浩一、辻田 実加、宮崎 太輔、山崎 真弥、喜多村 和郎、Hee-Sup Shin、渡辺 雅彦、崎村 建司、狩野 方伸：「小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達における P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの役割」、第 87 回 日本生理学会大会、2010 年 5 月 21 日、盛岡
2. 橋本 浩一、辻田 実加、喜多村 和郎、宮崎 太輔、山崎 真弥、Hee-Sup Shin、渡辺 雅彦、崎村 建司、狩野 方伸：「登上線維の発達過程における P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの役割」、第 33 回 日本神経科学学会、2010 年 9 月 2 日～9 月 4 日、神戸
3. 橋本浩一：「生後発達期小脳における神経回路の再編成」、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ、2011 年 8 月 21 日(日)～24 日、神戸
4. 橋本浩一：「プルキンエ細胞選択的 Cav2.1(P/Q 型電位依存性カルシウムチャネル)ノックアウトマウスにおける登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達過程の異常」、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ、2011 年 8 月 21 日(日)～24 日、神戸
5. K. Hashimoto：「Postnatal refinement of the cerebellar climbing fiber to Purkinje cell synapse」、第 90 回 日本生理学会、2013 年 3 月 27 日～29 日、東京

プレスリリースに伴うメディア掲載

日本経済新聞 2011 年 5 月 31 日 「運動担う神経細胞に不可欠なたんぱく質を特定」