

学位論文題名

P/Q-type Ca^{2+} channel $\alpha 1A$ regulates synaptic competition on developing cerebellar Purkinje cells

(小脳プルキンエ細胞の競合的シナプス回路形成における
電位依存性カルシウムチャネル $\alpha 1A$ サブユニットの機能的役割に関する研究)

学位論文内容の要旨

小脳プルキンエ細胞には平行線維および登上線維の2種類の興奮性入力が入射し、このシナプス回路による情報処理機構は運動学習や協調運動の基盤となっている。個々のプルキンエ細胞において、約10万本の平行線維が遠位樹状突起にシナプスを形成し、その近位樹状突起を1本の登上線維が支配している。1本ではあっても登上線維の活動はプルキンエ細胞に対して強い脱分極刺激を与え、電位依存性カルシウムチャネルを介して大量のカルシウム流入を引き起こす。P/Q型カルシウムチャネルはプルキンエ細胞に豊富なサブタイプで、このニューロンの90%以上のカルシウム流入を担っており、そのチャネル本体をコードする $\alpha 1A$ サブユニットは脊髄小脳変性症の原因遺伝子であることが知られている。本研究では、 $\alpha 1A$ サブユニット遺伝子を欠損するマウスの神経解剖学および電気生理学的解析を通して、プルキンエ細胞のシナプス回路形成における機能的役割を追求した。

その結果、以下の所見を得ることができた。

1. 平行線維支配の近位拡大

プルキンエ細胞のマーカーである抗カルビンジン抗体を用いた免疫染色法および電子顕微鏡法により、プルキンエ細胞の細胞体および近位樹状突起において異所性のスパイン形成が認められた。さらにこの異所性スパインは1型小胞性グルタミン酸トランスポーターVGluT1陽性の平行線維終末とシナプスを形成していた。従って、本来遠位樹状突起に限局すべき平行線維支配が、近位樹状突起から細胞体に達するまで近位拡大していることが明らかになった。

2. 登上線維支配の退縮

順行性トレーサーを用いた登上線維標識法により、小脳分子層における登上線維の分布範囲が縮小していた。抗カルビンジン抗体との2重染色により、本来

近位樹状突起全体をカバーする形で支配すべき登上線維に近位退縮化が生じ、その結果、プルキンエ細胞の樹状突起基部や細胞体のみを支配していた。

3. 登上線維の多重支配の残存

順行性標識、抗カルビンジン抗体および登上線維終末のマーカである2型小胞性グルタミン酸トランスポーターVGLuT2との蛍光3重染色を行ったところ、複数の登上線維によるプルキンエ細胞支配が認められた。同様の結果は、電気生理学的解析からも得られた。さらに、VGLuT2抗体および登上線維標識法を用いた2重免疫電顕法により、プルキンエ細胞樹状突起の同一部位に対して複数の登上線維による多重支配が起きていることが確認された。

4. 軽微なグルタミン酸放出機能の変化

P/Q型カルシウムチャネルは、神経伝達物質の放出において主要な役割を果たしていることが知られている。しかし、 $\alpha 1A$ サブユニットに欠失にも関わらず、平行線維および登上線維のグルタミン酸放出機能において軽微な変化しか認められず、他のカルシウムチャネルサブタイプの補償的变化が生じていると考えられた。

以上の結果から、 $\alpha 1A$ サブユニットは近位樹状突起において登上線維支配を強化する重要な分子機構であり、同時に平行線維支配の過度な近位化を抑制する分子機構であると結論した。さらに、この分子は、主要な1本の登上線維支配を強化し、それ以外の余剰な登上線維を排除する分子機構であることも示している。すなわち、 $\alpha 1A$ サブユニットは、プルキンエ細胞における登上線維と平行線維との間の異種シナプス競合と、登上線維間の同種シナプス競合を制御する分子であり、この機能により小脳機能発現の舞台となるシナプス回路網が形成されるものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 岩 永 敏 彦
副 査 教 授 佐 々 木 秀 直
副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

学 位 論 文 題 名

P/Q-type Ca^{2+} channel $\alpha 1A$ regulates synaptic competition on developing cerebellar Purkinje cells

(小脳プルキンエ細胞の競合的シナプス回路形成における
電位依存性カルシウムチャンネル $\alpha 1A$ サブユニットの機能的役割に関する研究)

小脳プルキンエ細胞には平行線維および登上線維の2種類の興奮性入力が投射し、このシナプス回路による情報処理機構は運動学習や協調運動の基盤となっている。個々のプルキンエ細胞において、約10万本の平行線維が遠位樹状突起にシナプスを形成し、その近位樹状突起を1本の登上線維が支配している。1本ではあるが、登上線維の活動はプルキンエ細胞に対して強い脱分極刺激を与え、電位依存性カルシウムチャンネルを介して大量のカルシウム流入を引き起こす。P/Q型カルシウムチャンネルはプルキンエ細胞に豊富なサブタイプで、このニューロンの90%以上のカルシウム流入を担っており、そのチャンネル本体をコードする $\alpha 1A$ サブユニットは脊髄小脳変性症の原因遺伝子であることが知られている。本研究では、 $\alpha 1A$ サブユニット遺伝子を欠損するマウスの神経解剖学的および電気生理学的解析を通して、プルキンエ細胞のシナプス回路形成における機能的役割を追求し、以下の所見を得た。

プルキンエ細胞のマーカーである抗カルビンジン抗体を用いた免疫染色法および電子顕微鏡法により、プルキンエ細胞の細胞体および近位樹状突起において異所性のスパイン形成が認められた。この異所性スパインは1型小胞性グルタミン酸トランスポーターVGluT1陽性の平行線維終末とシナプスを形成していた。従って、本来遠位樹状突起に限局すべき平行線維支配が、近位樹状突起から細胞体に達するまで近位拡大していることが明らかになった。順行性トレーサーを用いた登上線維標識法により、小脳分子層における登上線維の分布範囲が縮小し、プルキンエ細胞体付近に異所性の登上線維シナプスが観察された。

抗カルビンジン抗体との2重染色により、本来近位樹状突起全体を支配すべき登上線維の投射領域が近位に退縮していることが判明した。さらに、電気生理学的解析により、重篤な登上線維の多重支配が認められた。順行性標識、抗カルビンジン抗体および登上線維終末のマーカである2型小胞性グルタミン酸トランスポーターVGluT2を用いた多重標識により、複数の登上線維と平行線維とが細胞体や近位樹状突起を混在する形で支配していることが明らかとなった。

以上の結果から、 $\alpha 1A$ サブユニットは近位樹状突起において登上線維支配を強化する分子機構であり、同時に平行線維支配の過度な近位化を抑制する分子機構であると結論した。さらに、この分子は、主要な1本の登上線維支配を強化し、それ以外の余剰な登上線維を排除する分子機構であることも示している。すなわち、 $\alpha 1A$ サブユニットは、プルキンエ細胞における登上線維と平行線維間の異種シナプス競合と、登上線維間の同種シナプス競合を制御する分子であり、この機能により小脳機能発現の舞台となるシナプス回路網が形成されるものと思われる。

本研究は、プルキンエ細胞の興奮性シナプス回路網形成に関して、平行線維と登上線維の異種入力間競合と登上線維間の同種入力間競合という独創的な観点から行われ、ここにおける $\alpha 1A$ サブユニットの生理機能を明らかにした点で高く評価され、今後さらに小脳機能発現についての知見が得られるものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。