HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウス小脳パンソー構造の分子解剖学的研究 ： パンソーはプルキンエ細胞の軸索初節に対してGABA作動性の化学的抑制を行うための分子解剖学的基盤を欠く［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	岩倉, 淳
Description	配架番号：2075
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11203号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55713
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Atsushi_Iwakura_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　岩　倉　　淳

学 位 論 文 題 名

マウス小脳パンソー構造の分子解剖学的研究：パンソーはプルキンエ細胞の軸索初節に対して GABA 作動性の化学的抑制を行うための分子解剖学的基盤を欠く
（Lack of Molecular-Anatomical Evidence for GABAergic Influence on Axon Initial Segment of Cerebellar Purkinje Cells by the Pinceau Formation）

【背景と目的】　軸索初節には電位依存型ナトリウムイオンチャネルが密に分布し、ここで活動電位が最初に発生する。一般的に、軸索初節における活動電位の発生は、GABA を介した化学的シナプス伝達により制御されると考えられている。海馬や大脳皮質などでは、興奮性ニューロンである錐体細胞の軸索初節に GABA 作動性シャンデリア細胞による抑制性シナプスが形成され、活動電位の発生を抑制していると考えられている。一方、小脳プルキンエ細胞の軸索初節周囲には、GABA 作動性バスケット細胞の軸索が取り囲む逆さ円錐状のパンソーが形成されている。パンソーに関するこれまでの知見は､GABA 作動性シナプスを形成しているという報告がある一方、パンソーとプルキンエ細胞軸索初節間ではアストロサイト様のグリア突起が介在しシナプス様構造は少ないという報告もある。また、パンソーは、隔壁様接着構造が発達し細胞間隙を介したイオンの拡散も制限されていることや電位依存性カリウムイオンチャネルが豊富に発現していることなどから、小脳プルキンエ細胞軸索初節に対して過分極性の電場を形成することで電気的抑制をかけているという見解もあり、パンソーに対する GABA による化学的伝達抑制に関する統一された理解は未だ得られていない。そこで私は、プルキンエ細胞の軸索初節において、GABA 作動性シナプス伝達を成立させるために必要な分子形態基盤が揃っているかを分子形態学的手法により検討した。

【材料と方法】　実験動物は成体期および 13 日齢の C57BL／6N マウスを用い、「北海道大学における動物実験に関する指針」に準拠しておこなった。固定脳は、ペントバルビタール（100mg／kg 体重）を腹腔内投与し、十分な麻酔の下、10 分間の経心的灌流により作成した。その後、マイクロスライサーで脳切片を作成し、蛍光抗体法、電子顕微鏡法、包埋前銀増感免疫電子顕微鏡法および包埋後免疫電子顕微鏡法にて解析を行なった。

【結果】　プルキンエ細胞の細胞体および軸索小丘には対称性シナプス構造がみられたが、細胞膜の裏打ち構造を有する軸索初節にはシナプス構造はみられなく、その表面のほとんどがグリア様の構造で囲まれシナプス様構造は観察されなかった。このグリア様の構造は、グルタミン酸トランスポーターGLT1 を発現するアストロサイト突起であることを確認した。

次に、GABA 作動性シナプス伝達に必要な分子である、GABA 合成酵素（GAD）、小胞膜抑制性アミノ酸トランスポーター（VIAAT）、アクティブゾーン分子バスーン、シナプス接着分子ニューロリジン 2、$GABA_A$ 受容体α1 サブユニット（$GABA_AR\alpha1$）の分子発現を検討した。プルキン

エ細胞の細胞体や軸索小丘に形成される対称性シナプスには、これらの分子の顕著な発現を認めた。しかし、軸索初節とこれを取り囲むパンソーでは、GAD と VIAAT の発現はその５分の１程度と弱く、バスーン、ニューロリジン 2、$GABA_AR\alpha1$ の発現は検出されなかった。従って、プルキンエ細胞の軸索初節では、細胞体シナプスのようなシナプス構築への特殊化に乏しく、GABA 作動性シナプス分子の発現や集積も欠いていることが判明した。同様の解析を、海馬や大脳皮質の錐体細胞軸索初節で行ったところ、軸索初節には、GAD、VIAAT、バスーンの陽性反応が認められ、これらのプレシナプス分子はニューロリジン 2 や $GABA_AR\alpha1$ のポストシナプス分子と向かい合って配置していた。従って、海馬や大脳皮質の錐体細胞の軸索初節には、GABA 作動性シナプス伝達に必要な分子が揃っていた。

一方、パンソーを形成するバスケット細胞軸索には、細胞膜の過分極に関わるシェイカー型電位依存性カリウムイオンチャネル Kv1.1 と Kv1.2、これらの足場タンパクである PSD-95 が豊富に発現していることが知られている。そこで、軸索初節周囲の軸索におけるこれら分子発現について小脳と海馬で比較を行った。パンソーでは、バスケット細胞の軸索には Kv1.1、Kv1.2、PSD-95 の豊富な免疫反応を認めたが、パンソーにより取り囲まれたプルキンエ細胞の軸索初節にはほとんど認められなかった。対照的に、海馬 CA3 錐体細胞では Kv1.1 と Kv1.2 の免疫反応は錐体細胞の軸索初節に認められ、ここに入力する軸索終末には認められなかった。また、PSD95 の免疫反応は、錐体細胞の軸索初節とそれと接触する軸索終末の双方で検出されなかった。したがって、入力線維の軸索膜の過分極に関わるシェイカー型電位依存性カリウムイオンチャネルは、パンソーにおいて特異的に発現していることが判明した。

【考察】　本研究は、軸索–軸索シナプスが頻繁に認められる大脳皮質、海馬、扁桃体の軸索初節とは対照的に、パンソーとプルキンエ細胞の軸索初節の間の直接的な接触は乏しく、シナプス形成もまれであるというユニークな特徴を示した。また、GABA 作動性のシナプス伝達の成立に必要なプレシナプス側やポストシナプス側の発現においても、パンソーやプルキンエ細胞軸索初節ではこれらの分子発現は不完全であり、プルキンエ細胞の細胞体シナプスや海馬や大脳皮質の錐体細胞軸索初節の分子環境とは対照的であることが明らかとなった。さらに、パンソーにおけるシェイカー型カリウムイオンチャネルの高度な集積も、海馬錐体細胞の軸索初節と大きく異なっていた。これらのユニークな分子解剖学的特性を踏まえると、パンソーは GABA 作動性の化学的抑制機構を用いて、プルキンエ細胞軸索初節における活動電位発生を制御していることは考えにくい。むしろ、バスケット細胞の活動性の上昇時には、相対的に電流の流れやすいプルキンエ細胞の軸索初節が受動的な電流の吹き出し口となって過分極を引き起こすという電気的抑制仮説とは矛盾しない分子解剖学的特性を有していた。このことから、バスケット細胞は、プルキンエ細胞の細胞体に形成する典型的な GABA 作動性シナプスを介して化学的に抑制し、軸索初節に対してはパンソーを介した電気的抑制により、プルキンエ細胞の活動電位発生を制御しているものと考えられる。

【結論】　以上の解析結果に基づき、パンソーとプルキンエ細胞軸索初節の接触部には GABA を介した化学的抑制の成立に必要かつ十分な分子基盤が備わっておらず、大脳皮質や海馬の錐体細胞軸索初節に対する GABA 作動性シナプスとは本質的に異なる分子形態学的構成を持った構造であると結論した。したがって、パンソーは化学的抑制のための装置ではなく、電気的抑制を含めた他の作用機序によりプルキンエ細胞からの出力を制御していることが示唆される。パンソーの機能的役割や作用機序の理解は未だ不十分であり、今後のさらなる研究の進展が求められる。