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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11203
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55714
Type	doctoral thesis
File Information	Atsushi_Iwakura.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

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）

２０１４年３月

北　海　道　大　学

岩　倉　　淳

学　位　論　文

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）

２０１４年３月

北　海　道　大　学

岩　倉　　淳

目　　次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・・・・・・・・・・・・　１頁
緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　２頁
略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　５頁
実験方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　６頁
実験結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　１２頁
考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　３３頁
総括および結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　４０頁
謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　４２頁
引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　４３頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

著者名：岩倉　淳、内ヶ島　基政、宮崎　大輔、山崎　美和子、渡辺　雅彦

論文タイトル：Lack of Molecular-Anatomical Evidence for GABAergic Influence on Axon Initial Segment of Cerebellar Purkinje Cells by the Pinceau Formation

学術雑誌名：The Journal of Neuroscience、３２巻、９４３８－９４４８頁、

２０１２年

本研究の一部は以下の学会に発表した。

１．日本解剖学会（第１１６回日本解剖学会総会・全国学術集会）

- Lack of molecular-anatomical machineries for GABAergic synaptic transmission at the axon initial segment of Cerebellar Purkinje cells

  ２０１１年3月　神奈川県横浜市

２．日本解剖学会（第１１７回日本解剖学会総会・全国学術集会）

- 小脳プルキンエ細胞軸索初節における GABA 作動性シナプス伝達機構についての分子形態学的解析

  ２０１２年3月　山梨県甲府市

緒言

ニューロンは極性を持つ細胞であり、樹状突起と軸索という機能と性質の異なる神経突起を有している。軸索は、細胞体の軸索小丘から伸びる細く長い 1 本の神経突起であり、活動電位の発生と伝播を担っている。中枢神経系において、軸索の大部分はオリゴデンドロサイトが形成する髄鞘によって覆われる。しかし、軸索起始部から最初の髄鞘が巻き始めるまでの部分と、隣接する髄鞘間の部分はむき出しの軸索で、それぞれ軸索初節とランビエ絞輪とよばれる。この２つの軸索領域には、細胞膜直下に特殊な裏打ち構造が存在し[1, 2]、ここに活動電位の発生や伝播に関与する電位依存性 Na^+チャネルや、活動電位の振幅・持続時間・頻度を制御する電位依存性 K^+チャネルが高密度に集積している[3]。さらに、これらの特殊な組織構築やイオンチャネルの集積化に関わる細胞接着分子、細胞骨格タンパク、足場タンパクなど、軸索初節とランビエ絞輪には特異な分子解剖学的環境が醸成されている[4, 5]。特に、軸索初節は活動電位を最初に発生する場であることから、その解剖学的特性や機能的特性は活動電位の発生制御にとどまらず、種々の神経疾患とも関連するものとして近年注目されている[6]。

大脳皮質や海馬に存在する錐体細胞の軸索初節には、シャンデリア細胞と呼ばれる特殊な GABA 作動性介在ニューロンによる軸索–軸索シナプスが形成されている[7]。シャンデリア細胞の神経終末は GABA 合成酵素であるグルタミン酸脱炭酵素（GAD）と GABA を内蔵し、シナプス間隙から GABA を回収する輸送体 GAT1 も発現している[8-11]。そのポストシナプス膜には、GABA を介した抑制性シナプス伝達に必要な $GABA_A$受容体が発現し、その多くが $GABA_A\alpha1$ サブユニットを含んでいる[12]。このような軸索初節における GABA 伝達関連分

子の集約的配置は、錐体細胞の活動電位発生のタイミングや頻度を強力に制御していると考えられている[13]。

一方、小脳では、プルキンエ細胞の軸索初節を GABA 作動性介在ニューロンであるバスケット細胞の軸索が取り囲み、プルキンエ細胞体基部に巨大な逆円錐形構造として観察できる[14-22]。この特殊な構造体は、フランス語でブラシを意味するパンソーpinceau と命名されている。パンソーは、3〜7 個のバスケット細胞の軸索が集まって分岐し、隔壁様接着を介して相互に密着し合う緻密な構築である[16, 23-25]。プルキンエ細胞の軸索初節は、電位依存性 Na^+チャネル $Na_V1.6$、細胞接着分子である L1-CAM やニューロファシン、足場タンパクのアンキリン G、細胞骨格タンパクのβⅣスペクトリンなどを豊富に発現し[26, 27]、活動電位の発生に関与している[28]。パンソーとプルキンエ細胞の軸索初節との間には、大脳皮質や海馬と同様に GABA 作動性の軸索–軸索シナプスが形成されているという報告や[20]、アストロサイト様構造が介在するためにシナプス構造が少ないという報告もある。[17, 21, 25, 29]。パンソーの構造と機能に関して参考にすべき先行研究は、逃避行動に関与する硬骨魚類のマウスナー細胞の研究である。この巨大な神経細胞の軸索初節周囲には、アクソンキャップと呼ばれるパンソーに類似した構造が形成されている。アクソンキャップは、GABA を介した化学的抑制と過分極による電気的抑制により、マウスナー細胞における活動電位の発生を制御していると想定されている[30, 31]。これに対し、パンソー内部のバスケット細胞軸索膜は電位依存性 Na^+チャネルの発現を欠如することから、Na^+流入による脱分極は起こらないと考えられている。さらに、電位依存性 K^+チャネルが豊富であり発達した隔壁様接着による細胞間隙を介したイオンの拡散も制限されていることから、パンソーでは過分極性の電場が形成され、これがプルキンエ細胞軸索初節に対して電気的抑制をかけることで活動電位の発

生を制御していると想定されている[16, 23-25]。

GABA を介した化学的シナプス伝達は、中枢神経系においてニューロンの興奮を抑制する最も一般的な機構である。この伝達の成立には、プレシナプス側における GABA 合成、シナプス小胞への GABA 充填、シナプス間隙への GABA の開口放出、ポストシナプス膜における GABA 受容体の集積と活性化、さらにシナプス間隙を挟んで向かい合うプレシナプスとポストシナプスの構造的接着を必要とする。しかし、パンソーにおける GABA を介した化学的抑制機構に関するこれまの知見は極めて断片的なものであり、統一した見解は未だ得られていない。

そこで、本研究では、GABA 作動性シナプス伝達に必要な組織構築と分子発現を、マウスのパンソーとプルキンエ細胞軸索初節の接触部において解析し、典型的な GABA 作動性シナプスとして知られるプルキンエ細胞とバスケット細胞軸索との間の細胞体シナプスと比較した。さらに、大脳皮質や海馬の軸索初節に形成される軸索–軸索シナプスにおける分子発現との比較も行った。その結果、パンソーが直接接触するプルキンエ細胞軸索初節の領域は少なく、その大部分はアストロサイトの細胞突起により被われていた。さらに、プルキンエ細胞の軸索初節とパンソーの接触部位にはシナプス結合はほとんど観察されず、GABA 作動性伝達に関わる分子群の多くも欠如し、発現する分子ですら細胞体シナプス発現に比べ明らかに低いレベルであった。これに対し、大脳皮質や海馬の軸索–軸索シナプスには、プルキンエ細胞の細胞体シナプスと同様に、検討した全ての GABA 作動性シナプス伝達分子は高いレベルで発現していた。これらの所見に基づき、パンソーはプルキンエ細胞軸索初節に対して GABA を介した化学的抑制を行うための構造体ではなく、典型的な GABA 作動性の軸索–軸索シナプスとは異なる分子解剖学的基盤を有していると結論した。

略語表

（本文中で使用した略語は以下のとおりである。）

Car8	carbonic anhydrase 8
Cy3	cyanine 3
Cy5	cyanine 5
GABA	γ-aminobutyric acid
$GABA_AR\alpha1$	γ -aminobutyric acid A receptor alpha 1 subunit
GAD	glutamic acid decarboxylase
GAT1	GABA transporter 1
GLT1	glutamate transporter 1
$K_V1.1$	voltage-gated potassium channel subfamily A member 1
$K_V1.2$	voltage-gated potassium channel subfamily A member 2
$Na_V1.6$	voltage-gated sodium channel 1.6
PSD-95	postsynaptic density protein-95
PBS	phosphate-buffered saline
TBS	tris-buffered saline
VIAAT	vesicular inhibitory amino acid transporter

実験方法

使用動物と組織切片作製

実験動物は、成体期（生後 2 ヶ月齢）および生後 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。ペントバルビタール（100mg／kg 体重）を腹腔内投与し、十分な麻酔を得た上で、蛍光抗体法には 4%パラフォルムアルデヒド／0.1M リン酸緩衝液（pH7.2、以下 PB）、免疫電子顕微鏡法には 4%パラフォルムアルデヒド／0.1%グルタルアルデヒド／0.1M PB、通常の電子顕微鏡観察には 2%パラフォルムアルデヒド／2%グルタルアルデヒド／0.1M PB を 7.5 ml/min の流速にて 10 分間、経心的に潅流した。脳を摘出後、同液にて 1 時間の後固定を行った。固定脳を 2%アガロースゲルに包埋し、マイクロスライサー（VT1000S ; Leica、ドイツ）を用いて薄切した。蛍光抗体法と包埋前銀増感免疫電子顕微鏡法には 50 μm 厚、包埋後免疫顕微鏡法には 400 μm 厚の脳切片を作製した。

包埋後免疫電子顕微鏡法に使用する脳切片は、30%スクロース／0.1M PBで凍結保護し、EM CPC ユニット（Leica）を用いて液体プロパンにより急速凍結させた。凍結脳切片は過去の報告に従い[32]、AFS 凍結置換ユニット（Leica）を用いてLowicryl HM-20樹脂（Lowi）に包埋した。通常電子顕微鏡観察用の脳切片は、2%四酸化オスミウムにて1時間後固定をした後、2%酢酸ウラン水溶液にて20分間のブロック染色を施し、脱水後、Epon812に包埋した。ウルトラミクロトーム（UltraCut ; Leica）を用いて、70 nm厚の超薄切片を作製し、ニッケルグリッドにマウントした。

抗体

使用した抗体およびその特異性評価は表１に記載した。本研究ではウサギおよびモルモットアンキリンG抗体、ウサギGAT1抗体、ウサギShaker型電位依存性K^+チャネル$K_V1.1$および$K_V1.2$抗体、ウサギ電位依存性Na^+チャネルpan-Na_V抗体、モルモットニューロリジン２抗体を作成した。GAT1抗体またはニューロリジン２抗体の抗原は、抗原エピトープをコードした塩基配列をpGEX4T2（GE Healthcare、米国）のBamHI/EcoRIサイトにサブクローニングし、グルタチオンSトランスフェラーゼ融合タンパクとして発現、回収を行い、トロンビンによる切断後、グルタチオンセファロース4Bと結合させることによって作製した。アンキリンG抗体、$K_V1.1$抗体、$K_V1.2$抗体、pan-Na_V抗体の抗原には、カブトガニヘモシアニンの結合させた合成ペプチドを使用した。抗原はフロイント完全化アジュバントによりエマルジョン化し、ニュージーランド白ウサギまたはハートレイモルモットに6回皮下注射を行い、抗血清を得た。抗血清を抗原アフィニティーカラムに通すことにより精製抗体を得た。

表１：使用した抗体の抗原部位、動物種、特異性、出典

NCBI は National center Biotechnology Information の略である。HEK は、HEK 細胞可溶化液を遺伝子導入したイムノブロット検定、IB は脳ホモジネートのイムノブロット、PT は抗体吸収試験による特異性検定であることを示す。

分子名	抗原部位のアミノ酸領域（NCBI 登録番号）	動物種	特異性	参考
アンキリン G	1708-1726 (NP_733924.2)	ウサギ モルモット	WB/PT	図 3
バスーン	Rat bassoon	マウスモノクローナル	WB	VAM-PS003, Enzo Life Science

Car8	33-61 (BC010773)	ウサギ モルモット ヤギ	WB/PT	Patrizi et al. (2008)[39]
$GABA_AR\alpha$ 1	369-386 (NM_010250)	ウサギ モルモット	WB/HEK	Ichikawa et al. (2011)[22]
GAD	268-593 (A28072)	ウサギ ヤギ	WB/PT	Yamada et al.(2001)[54]
GAT1	1-46/564-599 (NM_178703)	ウサギ モルモット	WB/HEK	図 2
GLT1	540-572 (NM_001077514)	ウサギ モルモット ヤギ	WB	Yamada et al.(1998)[55]
K_V1.1	478-492 (NM_010595)	ウサギ モルモット	WB/HEK/ PT	図 8
K_V1.2	482-496 (NM_008417)	ウサギ モルモット	WB/HEK/ PT	図 8
pan-Nav	1490-1508 (NM_018733)	ウサギ	WB/PT	図 3
ニューロリジン 2	732-761 (NP_12455)	ウサギ モルモット	WB/HEK	図 6
パルブアルブミン	1-110 (NM_013645)	ウサギ モルモット ヤギ	WB	Nakamura et al. (2004)[56]
PSD-95	1-62 (D50621)	ウサギ モルモット	WB	Fukaya and Watanabe (2000)[32]
VIAAT	31-112 (BC052020)	ウサギ モルモット ヤギ	WB	Miyazaki et al.(2003)[57]

免疫組織化学

すべての免疫組織化学実験は室温下で浮遊法を用いて行った。蛍光抗体法では、10%正常ヤギ血清にて 20 分間ブロッキングを行い、一次抗体（1 μg/ml）と一晩反応させた後、動物種特異的な indocarbocyanine（Cy3）、

indodicarbocyanine（Cy5）、Alexa488（Invitrogen ; Carlsbad、米国）により標識された蛍光標識二次抗体と 2 時間反応させた。洗浄と抗体の希釈に 0.1%Tween20／リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を使用した。$GABA_AR\alpha1$、ニューロリジン２、電位依存性 Na^+チャネルの検出には抗原露出が必要なため、切片を 0.1 mg/ml ペプシン（DAKO ; Carpinteria、米国）／0.2N 塩酸溶液で 37℃、30 秒-2 分間処理してから通常の免疫反応を行った[33]。撮影は、共焦点レーザー顕微鏡（FV1000 ; Olympus、日本）を用いた。対物レンズは 10 倍（PlanApo 10× ; NA: 0.4）と 60 倍（PlanApo 60× ; NA: 1.42）（Olympus）を使用し、Alexa488、Cy3、Cy5 の検出には 488、543、633 nm のレーザーを使用した。全ての画像は 640×640 ピクセルで撮影した。

銀増感包埋前免疫電子顕微鏡法では、ブロッキング溶液（AURION ; Wageningen、オランダ）で 30 分間処理した後、10%ウシ血清アルブミン／0.004%サポニン／PBS で希釈した一次抗体と一晩反応させた。0.004%サポニン／PBS による洗いを 3 回行った後、ヤギ血清 1.4 nm 金コロイド標識のウサギまたはモルモット二次抗体（Nanogold ; Nanoprobes、米国）と 3 時間反応させた。0.004%サポニン／PBS による洗いを 3 回、2%グルタルアルデヒド／PBS による後固定を 15 分間行い、R-gent SE-EM キット（AURION）を使用して銀増感反応を行った。1%四酸化オスミウム／PB に 30 分間反応させ、1%酢酸ウラン水溶液で 30 分間電子染色を行い、脱水後、Epon812 に包埋して超薄切片を作製した。包埋後免疫電子顕微鏡法においては、ニッケルグリッドに乗せた超薄切片を飽和水酸化ナトリウム-エタノール溶液に 1–5 秒間浸漬し、2%正常ヤギ血清で 20 分間ブロッキングの後、一次抗体（20 µg／ml）で一晩免疫反応を行った。洗浄を 3 回行い、10 nm 径金コロイド標識ウサギ二次抗体（1:100 ; British Bio Cell International、イギリス）を用いて 2 時間免疫反応

を行った。抗体の希釈および洗浄は 0.03%Triton-X100／トリス緩衝生理食塩水（TBS; 150 mM NaCl／10 mM Tris-HCl（pH 7.4））で行った。3 度の洗浄後、2%グルタルアルデヒド／TBS で 15 分間、さらに 1%四酸化オスミウム水溶液で 20 分間の固定を行った後、2%ウラン水溶液で 10 分間、鉛混合液で 1 分間の染色を行った。電子顕微鏡観察は H7100（Hitachi、日本）を使用した。

細胞培養

ヒト胎児由来腎臓 293T（HEK293T）細胞は、1 x ペニシリン–ストレプトマイシン（Sigma、日本）／1 x ピルビン酸（Sigma）／1 x 非必須アミノ酸（Sigma）／1 x グルタマックス（Life Technology、米国）を加えたダルベッコ改変イーグル培地（Sigma）にて 37℃、5%CO_2 下で培養した。トランスフェクションはリン酸カルシウム法により 50%コンフルエントの状態で行い、トランスフェクションから 48 時間後、細胞の回収を行った。

イムノブロット

ジエチルエーテルにてマウスを深麻酔して脳を摘出後、10 倍量のホモジナイズバッファー（0.32 M sucrose、1 mM EDTA、1 mM EGTA、10 mM Tris-HCl、pH7.2、0.4 mM phenylmethylsulfonyl fluoride）を加え、ポッター式ホモジナイザーにて 1000 rpm、15 回のストロークを行い、全脳抽出液を得た。核由来成分と夾雑物を取り除くため、1000×g で 10 分間の遠心後に上清を回収し、タンパク濃度を Lowry 法により定量した[34]。培養細胞サンプルは 5 倍量のホモジナイズバッファーを加え、超音波式ホモジナイザーを用いて作製した。サンプルは 2 x SDS サンプルバッファー／50 mM ジチオスレイトールの下、30 分間、65℃にて変性させた。SDS-PAGE によるタンパク分離を行い、イムノビロン転写膜（Millipore）にブロットした。転写膜は 30 分間、5%スキムミルクでブロ

ッキングした後、一次抗体（1μg／ml）で 1 時間、さらに動物種特異的なペルオキシダーゼ標識二次抗体（1:10,000; Jackson ImmunoResearch、米国）にて 1 時間反応させた。洗浄と希釈用バッファーとして、0.1% Tween／TBS を使用した。ブロット反応は、ECL 化学発光検出システムで可視化した（GE Healthcare）。

実験結果

1. プルキンエ細胞軸索初節に対するシナプス形成の検討

バスケット細胞軸索とプルキンエ細胞軸索初節の間におけるシナプス構造の有無を調べるため、電子顕微鏡法を用いて成体マウスのプルキンエ細胞の軸索初節を観察した（図 1A-E)。図 1A に示すように、リボゾームを豊富に含んだ円錐状のプルキンエ細胞体の底部（軸索小丘）から、微小管に富む細く平滑な軸索が出ていた。軸索起始部もしくはその近傍から、電子密度の高い細胞膜の裏打ち構造（undercoating）が出現し（図 1B、F、矢印)、最初の髄鞘が出現する部位まで連続していた（図 1C、矢印)。本研究では、裏打ち構造を伴う軸索領域を軸索初節と定義した。

従来の報告と一致して[17, 29, 35, 36]、プルキンエ細胞の細胞体底部から軸索初節の周囲にかけて、ミトコンドリアを多く含んだバスケット細胞の軸索が幾重にも取り囲む逆さ円錐形のパンソーを確認した（図 1A)。プルキンエ細胞の軸索小丘を含む細胞体に対して、パンソーを構成するバスケット細胞軸索はしばしば対称性シナプスを形成していた（図 1A、赤、B、D、矢頭)。このような細胞体シナプスでは、プレシナプス側となるバスケット細胞軸索終末にはシナプス小胞が集積し、ポストシナプス側となるプルキンエ細胞の細胞体には対称性のシナプス後膜肥厚部が観察され、典型的なシナプス構造を呈した（図 1B、D、矢頭)。これに対し、軸索初節の領域では、パンソーを構成するバスケット細胞の軸索が軸索初節に直接接することはまれで（図 1A、緑の軸索断面)、両者の間にはアストロサイトと思われる薄い細胞突起が介在していた（図 1A、紫の軸索断面、図 1B)。2 匹のマウスから合計 75 個の軸索初節の断面を採取し、総計 77.7 μm の軸索初節細胞膜を計測したところ、その 9.2%にあたる 7.1 μm にバ

スケット細胞軸索との直接的な接触を認めたたが、それ以外はアストロサイト様の細胞突起が覆っていた。さらに、バスケット細胞軸索の直接的な接触部位を詳細に観察すると、典型的なシナプス構造は一切認められなかった（図 1A、E)。パンソーの形成が始まるとされる生後 13 日齢[20, 21]のマウス軸索初節についても同様の検討をおこなったが、成体期との大きな違いは認められなかった（図 1F)。

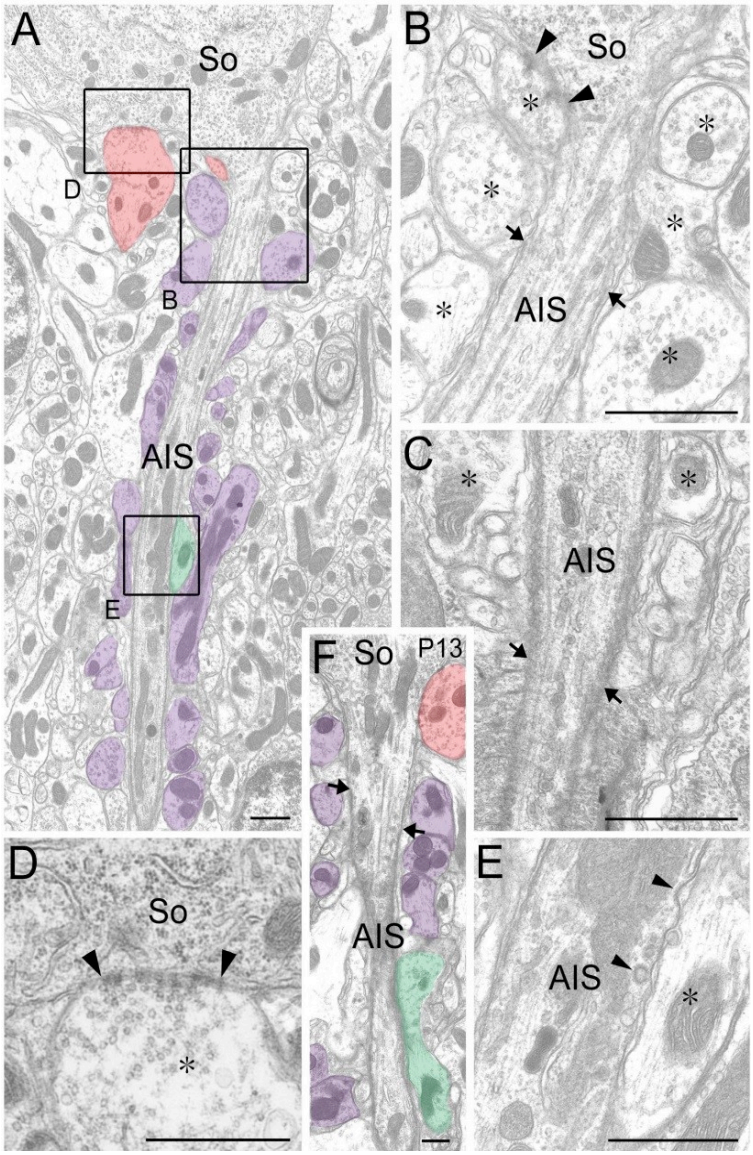


図１　電子顕微鏡法によるプルキンエ細胞軸索初節の形態学的解析

成体（**A-E**）および生後１３日齢マウス（**F**）におけるプルキンエ細胞の軸索初節とパンソーの電子顕微鏡像。プルキンエ細胞の軸索初節（AIS）は細胞体（So）の軸索小丘から伸びている。バスケット細胞の軸索は、プルキンエ細胞の細胞体や軸索起始部に対称性シナプスを形成するのに加え（赤）、軸索初節の一部と直接接触する（緑）。しかし、軸索初節の大部分はグリア様突起により覆われるため、多くのバスケット細胞軸索は軸索初節に接触しない（紫）。**B**、**D**、**E** は、**A** に示す枠内の拡大図である。矢頭はバスケット細胞軸索とプルキンエ細胞軸索初節との接触部を示す。プルキンエ細胞の細胞体（**D**）や軸索起始部（**B**）では対称性シナプスが認められるが、軸索初節（**E**）には認められない。軸索初節の細胞膜には裏打ち構造が認められ（**B** の矢印より下方）、これが髄鞘の巻き始めまで続く（**C** の矢印より上方）。スケール：250 μm

軸索初節を覆うアストロサイト様構造が本当にアストロサイトの神経化学的性質を有するかを確認するため、アストロサイトに選択的なグルタミン酸トランスポーターGLT1[37] に対する抗体を用いて検証した。GLT1（図 2A、赤）、プルキンエ細胞のマーカー分子である炭酸脱水素酵素 Car8[38, 39]（図 2A、B、緑）、プルキンエ細胞とバスケット細胞両者のマーカー分子であるパルブアルブミン[40]（図 2A、青）に対する蛍光三重染色を行った。パンソーでは、パルブアルブミン陽性のバスケット細胞の軸索が Car8 陽性のプルキンエ細胞の軸索初節を囲み、GLT1 陽性のアストロサイト突起と入り交じる形で分布している様子が観察された（図 2A）。

バスケット細胞軸索膜上には GABA 輸送体 GAT1 も発現することが知られる[41, 42]。GLT1 と GAT1 の分布を比較するため、GAT1 の 2 箇所の抗原部位（1-44 番目と 564-599 番目のアミノ酸）に対する抗体を作製した。イムノブロットでは、どちらの抗体も脳サンプルにおいて 75 kDa の単一バンドを認識した（図

2B)。HEK293T 細胞を用いた強制発現サンプルでは、GAT1 を発現させた細胞サンプルを認識し、類縁の GAT3 の発現サンプルには反応しなかった（図 2B)。また、免疫染色ではパンソーが強く標識されたことから（図 2C)、本抗体は GAT1 に特異的であると考えられた。この抗体を用いて、GLT1 との二重免疫染色による蛍光抗体法の解析を行ったところ、パンソーでは、GLT1 と GAT1 の免疫反応が入れ子状の分布を示し相互に異なる細胞要素に発現することを確認することができた（図 2D)。しかし、プルキンエ細胞軸索初節をどちらがどの程度囲んでいるかを判断するのは困難であった。

そこで GLT1 に対する銀増感包埋前電子顕微鏡法を行った（図 2E)。GLT1 の発現を示す金属粒子は、パンソー内部のバスケット細胞の軸索（図 2E、星印）を取り囲むアストロサイトの細胞膜上に豊富に存在していた。これに対して、軸索初節を取り囲むアストロサイトの細胞膜には時折金属粒子がまばらに観察されるにとどまり、アストロサイトであることを確認するに至らなかった（図 2E、矢頭)。そこで、連続電子顕微鏡切片の観察を行ったところ、軸索初節から離れるにつれアストロサイトの細胞膜に豊富な金属粒子が出現した（図 2E、白矢頭)。すなわち、プルキンエ細胞軸索初節を取り囲む細胞突起はアストロサイトであり、軸索初節とバスケット細胞軸索を取り囲むアストロサイトの突起では GLT1 の発現レベルが異なっていることも明らかになった。以上の結果より、プルキンエ細胞の軸索初節に直接接触している主要な細胞要素はアストロサイトであり、一部のパンソーが直接接触している軸索初節領域においてもシナプス形成がないことが判明した。

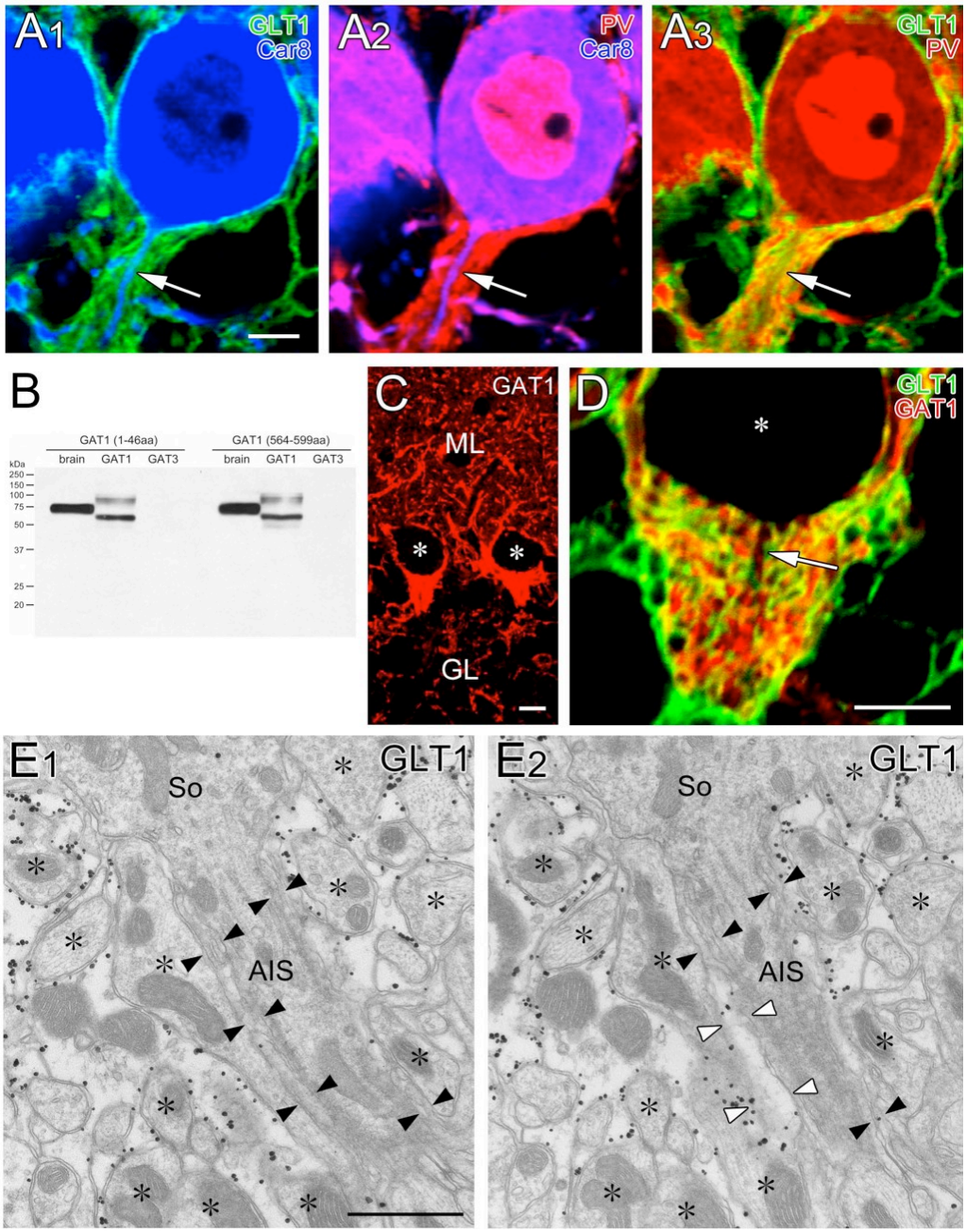


図２　プルキンエ細胞軸索初節は GLT1 陽性のアストロサイト突起により広く覆われる

A.GLT1、Car8、パルブアルブミン（PV）に対する三重蛍光染色像。Car8 陽性（青）のプルキンエ細胞体と軸索初節(矢印)とパルブアルブミン陽性（赤）のバスケット細胞軸索を、GLT1 陽性（緑）のアストロサイトの突起が被覆してい

る。**B**. GAT1 抗体の特異性。イムノブロットでは、二種類の GAT1 抗体（1-46 アミノ酸と 564-599 アミノ酸）はマウス脳（左レーン）と GAT1 発現 HEK293T 細胞（中央レーン）を認識し、GAT3 発現 HEK293T 細胞（右レーン）を認識しない。**C**. GAT1 に対する免疫蛍光染色。GAT1 はパンソーに豊富に発現している。**D**. GAT1（赤）と GLT1（緑）に対する二重蛍光染色像。プルキンエ細胞の軸索初節（矢印）を取り囲むパンソーには、両者の発現が認められるが、相互に排他的な分布を示す。**E**. GLT1 に対する連続切片を用いた包埋前免疫電子顕微鏡法解析。GLT1 の免疫反応はアストロサイトの細胞膜に分布し、バスケット細胞軸索（星印）を囲む領域では豊富だが、軸索初節を被う領域（黒い矢頭）では乏しい。白い矢頭は、両者の移行部となるグリア突起に GLT1 が検出されることから、軸索初節を被覆する細胞要素はアストロサイトであることがわかる。スケール：**A**、**C**、**D**、5 μm：**E**、250 nm

2. GABA 作動性シナプスが備えるべきプレシナプス分子の発現

次に、パンソーにおける GABA 作動性シナプス伝達が成立させるために必要な分子群の発現を、多重蛍光免疫染色と免疫電子顕微鏡法を用いて検討した。軸索初節を蛍光標識する目的で、軸索初節およびランビエ絞輪に発現するアンキリン G^{4} と電位依存性 Na^{+}チャネルに対する抗体を作製した。電位依存性 Na^{+}チャネル抗体の抗原には、9 種類の電位依存性 Na^{+}チャネル α サブユニットの共通アミノ酸配列を選択した（pan-Na_V 抗体）。アンキリン G 抗体は、全脳サンプルを用いたイムノブロットにて 200 kDa 付近に明瞭なバンドを認め（図 3A）、免疫組織化学ではパンソーを貫く軸索初節に強い線状反応を認め（図 3B、矢印）、その反応は抗原吸収試験でほぼ消失した（図 3C）。pan-Na_V 抗体は、全脳サンプルを用いたイムノブロットにて 250 kDa 付近の単一バンドを認識し（図 3A）、免疫組織化学では軸索初節と思われる部位に線状の陽性反応を示した。これら

の抗体を用いて二重蛍光染色を行うと、プルキンエ細胞体直下の軸索初節において共局在することが確認できた（図 3D、E)。さらに包埋後免疫電子顕微鏡法による評価も行ったところ、アンキリン G と電位依存性 Na^+チャネルに対する金コロイドはそれぞれ裏打ちされた軸索初節の細胞膜直下や細胞膜に選択的な分布を示すことが確認された（図 3F、G、矢印)。以上より、作製したアンキリン G 抗体と pan-Nav 抗体はそれぞれ特異的であると判断し、以下の実験ではアンキリン G 抗体を軸索初節マーカーとして用いた。

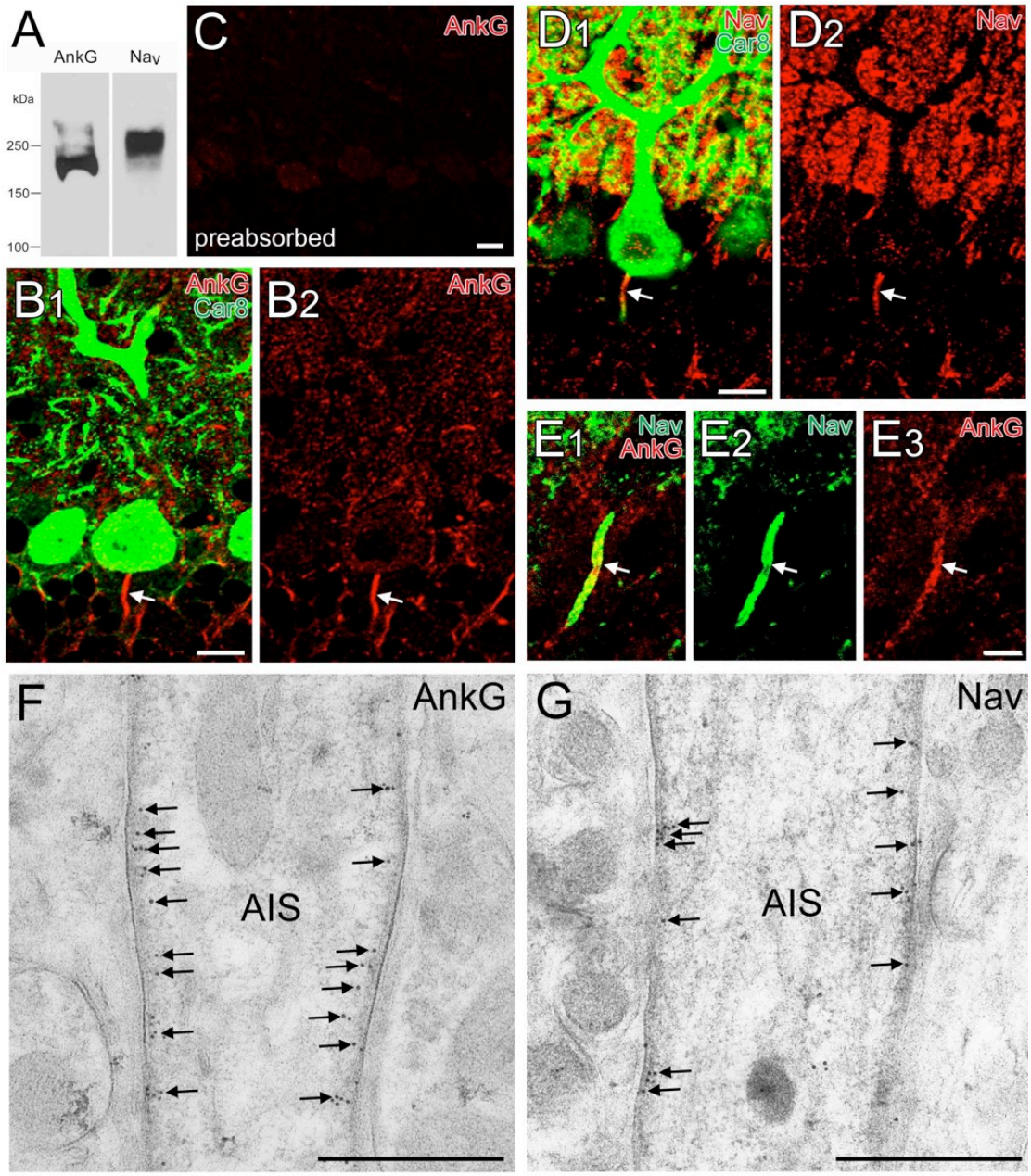


図３　軸索初節におけるアンキリン G と電位依存性 Na^+チャネルの局在

A. モルモットアンキリン G（AnkG）抗体とウサギ pan-Nav 抗体を用いたイムノブロット。それぞれ 200 kDa と 250 kDa のバンドを認識する。**B**. 小脳皮質におけるアンキリン G（赤）と Car8（緑）の二重蛍光染色像。アンキリン G の免疫反応は、プルキンエ細胞の軸索初節に強い（矢印）。**C**. アンキリン G の免疫反応は、抗原吸収試験により消失する。**D**. 小脳皮質における電位依存性 Na^+

チャネル（赤）と Car8（緑）の二重蛍光染色像。Car8 陽性（緑）の軸索初節に電位依存性 Na^+チャネルの免疫反応（赤）が認められる（矢印）。**E**. アンキリン G（赤）と電位依存性 Na^+チャネル（緑）の二重蛍光染色像。アンキリン G（赤）と電位依存性 Na^+チャネル（緑）は軸索初節において共発現している（矢印）。**F**, **G**. アンキリン G（**F**）と電位依存性 Na^+チャネル（**G**）に対する包埋後免疫電子顕微鏡解析。アンキリン G は軸索初節の細胞膜の直下に、電位依存性 Na^+チャネルは軸索初節の細胞膜上に認められる。スケール：**B-D**、10 µm：**E**、5 µm：**F**、**G**、250 nm

GABA 合成酵素の GAD[43]、GABA の小胞充填を行う小胞膜抑制性アミノ酸輸送体 VIAAT[44]、アクティブゾーンの構成分子バスーン [45] の 3 つのプレシナプス分子の局在について、プルキンエ細胞の細胞体シナプスと軸索初節の比較を行った。三重蛍光染色では、プルキンエ細胞体上の GABA 作動性シナプスを反映して [46, 47]、Car8 陽性のプルキンエ細胞体表面を GAD および VIAAT の強い点状反応が断続的に取り囲んでいる様子が観察された（図 4A、B、赤、矢頭）。対照的に、パンソー内部における GAD と VIAAT の免疫反応は弱くびまん性で、アンキリン G 陽性の軸索初節に向かって集中する傾向もなかった（図 4A、B、矢印）。バスーンも、プルキンエ細胞体を点状反応が取り囲む様子が観察されたが（図 4C、矢頭）、軸索初節に沿うような免疫反応は全く観察されなかった（図 4C、矢印）。

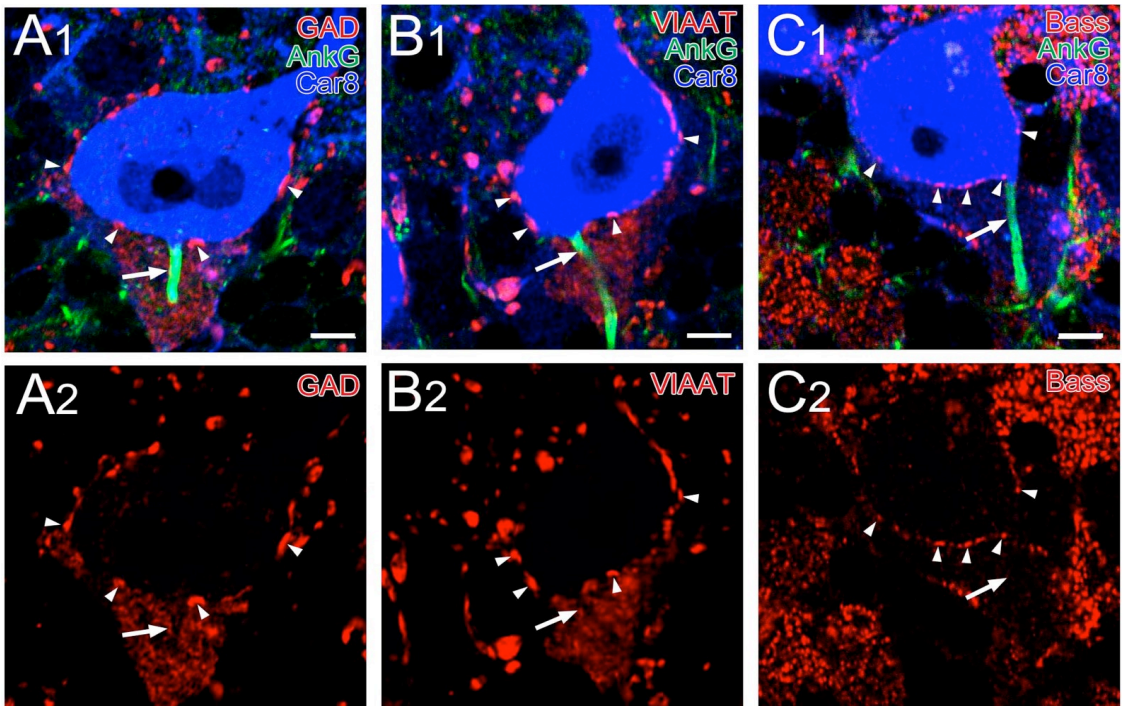


図４　蛍光抗体法を用いた GABA 作動性伝達に必要なプレシナプス分子の発現解析

Car8 陽性（青）のプルキンエ細胞の細胞体（**A**、**B**、**C**）には、GAD（**A**：赤、矢頭）、VIAAT（**B**：赤、矢頭）、バスーン（**C**：赤、矢頭）の輝度の高い点状反応が認められる。しかし、アンキリン G 陽性（緑）の軸索初節（**A**、**B**、**C**、矢印）を囲むパンソー内部は、GAD や VIAAT の免疫反応が弱い。スケール：5 μm

詳細な局在解析を行うため、GAD と VIAAT に対する銀増感包埋前免疫電子顕微鏡法を行った。GAD 示す金属粒子は、プルキンエ細胞体にシナプスを形成するバスケット細胞終末内で高密度に観察され、シナプス結合に向かってに集積するシナプス小胞の分布と同様の集積を示した（図 5A、矢頭）。一方、軸索初節周囲のパンソー内部のバスケット細胞軸索には、GAD を示す銀粒子は低密度で、軸索初節への集積傾向も認められなかった（図 5B、白矢頭）。VIAAT に

ついても同様の結果を得た（データ示さず)。

分子発現の定量解析に優れた包埋後免疫電子顕微鏡法を用いて GAD と VIAAT、バスーンの発現解析を行った（図 5C-H)。GAD と VIAAT を示す金コロイド粒子の分布パターンは、銀増感包埋前免疫電子顕微鏡法の結果とよく一致していた（図 5C-F)。バスケット細胞軸索のうち、プルキンエ細胞の細胞体シナプスを形成する領域と軸索初節と接触する領域の断面積当たりの金コロイド粒子の密度を算出した。GAD はそれぞれ 169/μm^2 と 34/μm^2（図 5C、D、矢印：計測面積はそれぞれ 5.60 と 8.94 μm^2)、VIAAT はそれぞれ 185/μm^2 と 39/μm^2（図 5E、F、矢印：計測面積はそれぞれ 8.65 と 11.9 μm^2）であり、どちらの分子も軸索初節と接触する領域が細胞体シナプスの 5 分の 1 程度であった。バスーンを標識した金コロイドも細胞体シナプスのプレシナプス膜近傍でしばしば観察されたが（図 5G、矢頭)、軸索初節との接触部では全く観察されなかった(図 5H、白矢頭)。計測結果は、バスーンは細胞体シナプスでは 4.12/μm^2、軸索初節では 0 個/μm^2 あった（計測面積はそれぞれ 4.11 と 6.51 μm^2)。免疫電子顕微鏡法による観察においても、バスケット細胞軸索とプルキンエ細胞軸索初節の間の接触部には、シナプス構造様の特殊化は認められなかった（図 5B、D、F、H、白矢頭)。したがって、パンソーとプルキンエ細胞軸索初節の接触部には、細胞体シナプスに認められるような GABA の合成と放出のための分子機構が完備されていないことが判明した。

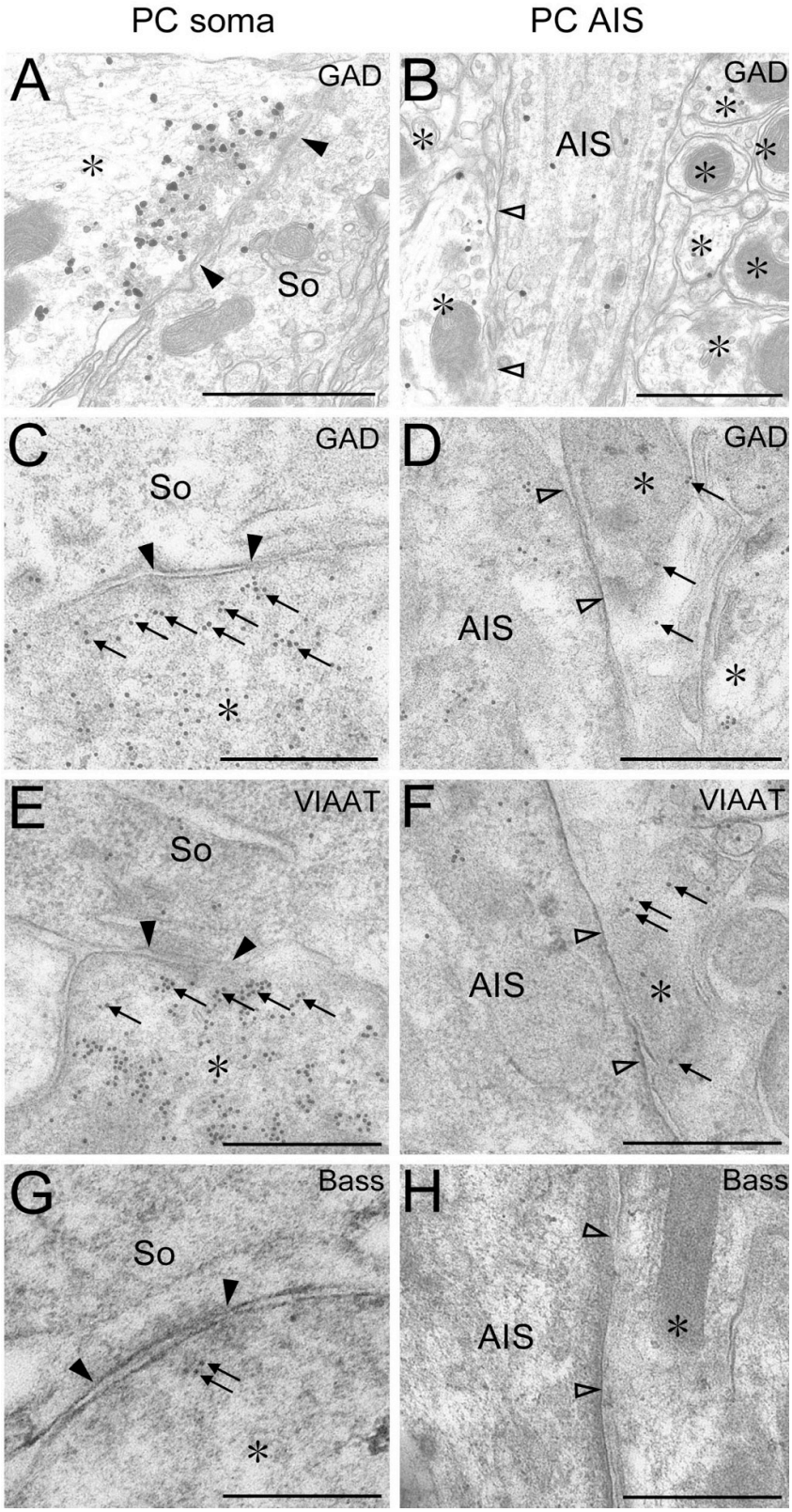


図５　包埋前（A, B）および包埋後免疫電子顕微鏡法（C-H）による GABA 作動性伝達に必要なプレシナプス分子の発現解析

A.プルキンエ細胞の細胞体シナプスにおける GAD に対する包埋前免疫電子顕微鏡解析。GAD を示す金属粒子は、対称性シナプスを形成するバスケット細胞軸索に豊富で、シナプス結合部（矢頭）に向かって集積する。**B**. プルキンエ細胞の軸索初節における GAD に対する包埋前免疫電子顕微鏡解析。軸索初節に接触するバスケット細胞軸索における GAD の集積は乏しい（白い矢頭）。**C-H**. GAD（**C**、**D**）、VIAAT（**E**、**F**）、バスーン（**G**、**H**）に対する包埋後免疫電子顕微鏡法による解析。いずれの分子も、プルキンエ細胞体の対称性シナプス（**C**、**E**、**G**：矢頭）を形成するバスケット細胞軸索に豊富な集積が認められるが、軸索初節に直接接触するバスケット細胞軸索（**D**、**F**、**H**：白い矢頭）には認められない。スケール：250 nm

3. GABA 作動性シナプスが備えるべきポストシナプス分子の発現

GABA 作動性シナプス伝達に必要なポストシナプス分子として、$GABA_AR\alpha 1$[48] と抑制性シナプス特異的なシナプス接着分子ニューロリジン２[49] の発現を検討した。作成したニューロリジン２抗体は、イムノブロットにてマウス全脳サンプルおよびニューロリジン２の発現細胞サンプルの双方で 100 kDa 付近に単一バンドを検出した（図 6B）。さらに、免疫組織化学では、ニューロリジン２は、細胞体および樹状突起に形成される GABA 作動性シナプスを反映する GAD の強い点状反応と一致した分布を示したことから、この抗体はニューロリジン２を特異的に認識していると判断した（図 6C）。

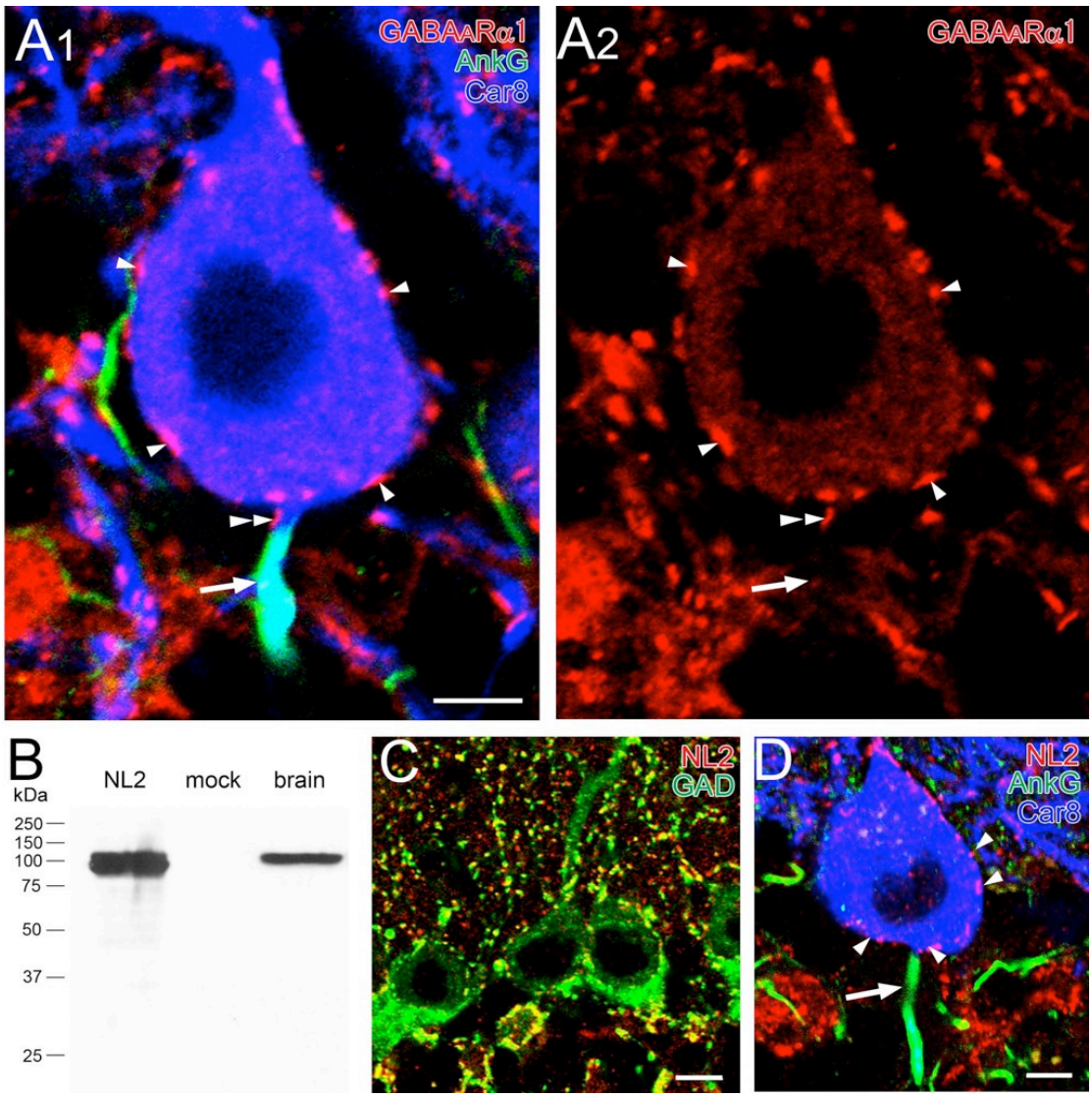


図６　蛍光抗体法を用いた GABA 作動性伝達に必要なポストシナプス分子の発現解析。

A.　小脳皮質におけるアンキリン G（緑）、Car8（青）、$GABA_AR\alpha1$（赤）の三重蛍光染色像。Car8 陽性のプルキンエ細胞体および軸索小丘には、$GABA_AR\alpha1$ の点状反応がみられるが（矢頭）、Car8 とアンキリン G 陽性の軸索初節には $GABA_AR\alpha1$ の反応はない（矢印）。時折、アンキリン G 陰性の軸索起始部には GABAARα1 の反応がみられる（二重矢頭）。**B**. イムノブロットによるニューロリジン２抗体の特異性検定。マウス全脳サンプル（左レーン）およびニューロ

リジン２発現 HEK 細胞サンプル（右レーン）において 100 kDa の単一バンドを検出するが、コントロールの HEK 細胞サンプル（中央レーン）には検出されない。**C**. ニューロリジン２（赤）と GAD（緑）に対する二重蛍光染色像。両者の点状反応は共局在をしめす。**D**.ニューロリジン２(赤)、アンキリン G(緑)、Car8（青）の三重蛍光染色像。Car8 陽性のプルキンエ細胞体表面にはニューロリジン２の反応はみられるが（矢頭)、アンキリン G 陽性の軸索初節には反応はみられない（矢印)。スケール：**A**、10 μm：**C**、**D**、5 μm

三重蛍光染色により、$GABA_AR\alpha1$ とニューロリジン２の免疫反応は、Car8 陽性のプルキンエ細胞体表面にて断続的に集積する様子が観察された（図 6A、D、矢頭)。この所見は過去の報告に合致する [39, 50, 51]。しかし、$GABA_AR\alpha1$ とニューロリジン２の免疫反応の集積は、アンキリン G 陽性の軸索初節上には認められなかった（それぞれ 58 個または 43 個のアンキリン G 陽性軸索初節の観察結果；図 6A、D、矢印)。 時折、$GABA_AR\alpha1$ とニューロリジン２の点状反応がプルキンエ細胞の軸索起始部に認めたが、その部位はアンキリン G 陰性であったことから軸索初節ではないと判断した（図 6A、二重矢頭)。包埋後免疫電子顕微鏡法を用いた解析では、バスケット細胞軸索がプルキンエ細胞体表面に形成する対称性シナプスのポストシナプス膜に $GABA_AR\alpha1$ とニューロリジン２を標識した金コロイドがそれぞれ確認された（図 7A、C、矢頭)。ポストシナプス膜 1 μm 当たりの金コロイド密度を計測したところ、$GABA_AR\alpha1$ は 7.9/μm（計測長は 8.6 μm)、ニューロリジン２は 3.5/μm（計測長は 5.1 μm）であった。これに対して、バスケット細胞軸索が接触している軸索初節には全く金コロイド粒子は認められなかった（図 7B、D、白矢頭：計測長は $GABA_AR\alpha1$ が 2.5 μm、ニューロリジン２は 1.6 μm)。したがって、プルキンエ細胞の軸索初節には、典

型的な GABA 作動性シナプスが備えるべきポストシナプス分子の発現を欠失していることが判明した。

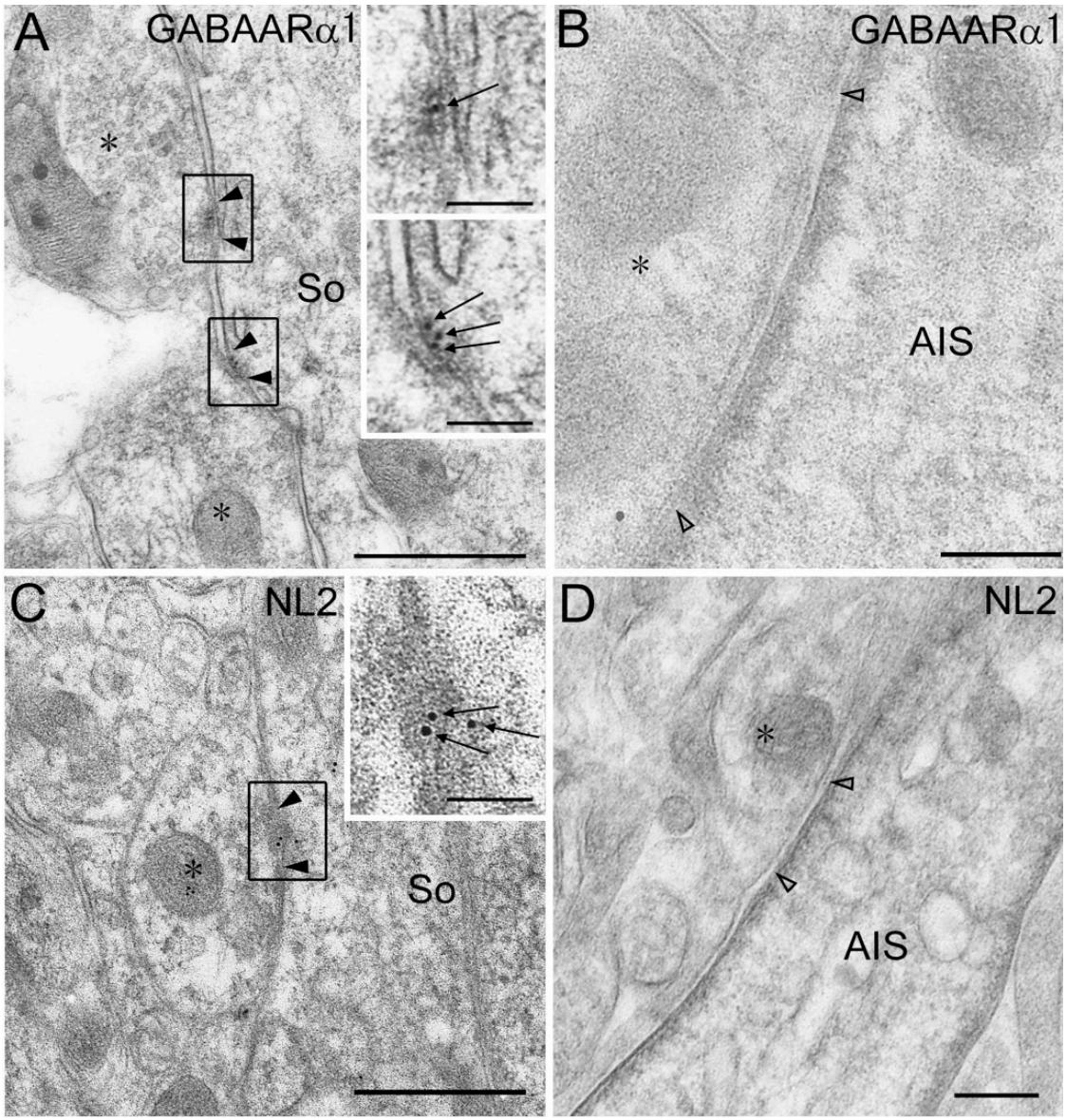


図７　$GABA_AR\alpha1$（A、B）とニューロリジン２（C、D）の包埋後免疫電子顕微鏡解析。

両分子は、プルキンエ細胞体上の対称性シナプスのシナプス後部に金コロイドの標識がみられるが（**A**、**C**：黒い矢頭)、パンソーと軸索初節の接触部位に金

コロイド標識は認められない（**C**、**D**：白い矢頭）。スケール：250 nm

4. 大脳皮質・海馬錐体細胞の軸索–軸索シナプスとの比較

大脳皮質や海馬では、シャンデリア細胞が錐体細胞の軸索初節を標的として軸索–軸索シナプスを形成し、GABA を介したシナプス伝達を行っていることが知られる [7, 52]。プルキンエ細胞軸索初節の分子環境と比較するため、GAD、VIAAT、バスーン、$GABA_AR\alpha1$、ニューロリジン２の 5 つの分子発現について、海馬 CA3 領域（図 8A-E）と大脳皮質の体性感覚野（図 8F-J）において三重蛍光染色による発現解析を行った。錐体細胞の軸索初節も、アンキリン G の免疫反応により確認できた（図 8A、F、矢印）。介在ニューロン終末を示す GAD の点状反応は細胞体表面を断続的に覆い、さらにアンキリン G 陽性の軸索初節にも及んでいた（図 8B-E、G-J、矢印）。これらの GAD 陽性終末は VIAAT の免疫反応と共局在し、（図 8B、G、矢印）、さらにバスーンとも一致した分布を示した（図 8C、H、矢印）。また、ニューロリジン２（図 8D、I、矢印）と $GABA_AR\alpha1$（図 8E、J、矢印）の点状反応は、アンキリン G 陽性の軸索初節上で GAD の陽性反応と向かい合うように配列していた。したがって、海馬や大脳皮質の錐体細胞の軸索初節における軸索–軸索接触部には、GABA 作動性シナプス伝達に必要な分子が揃っていることが明らかとなった。

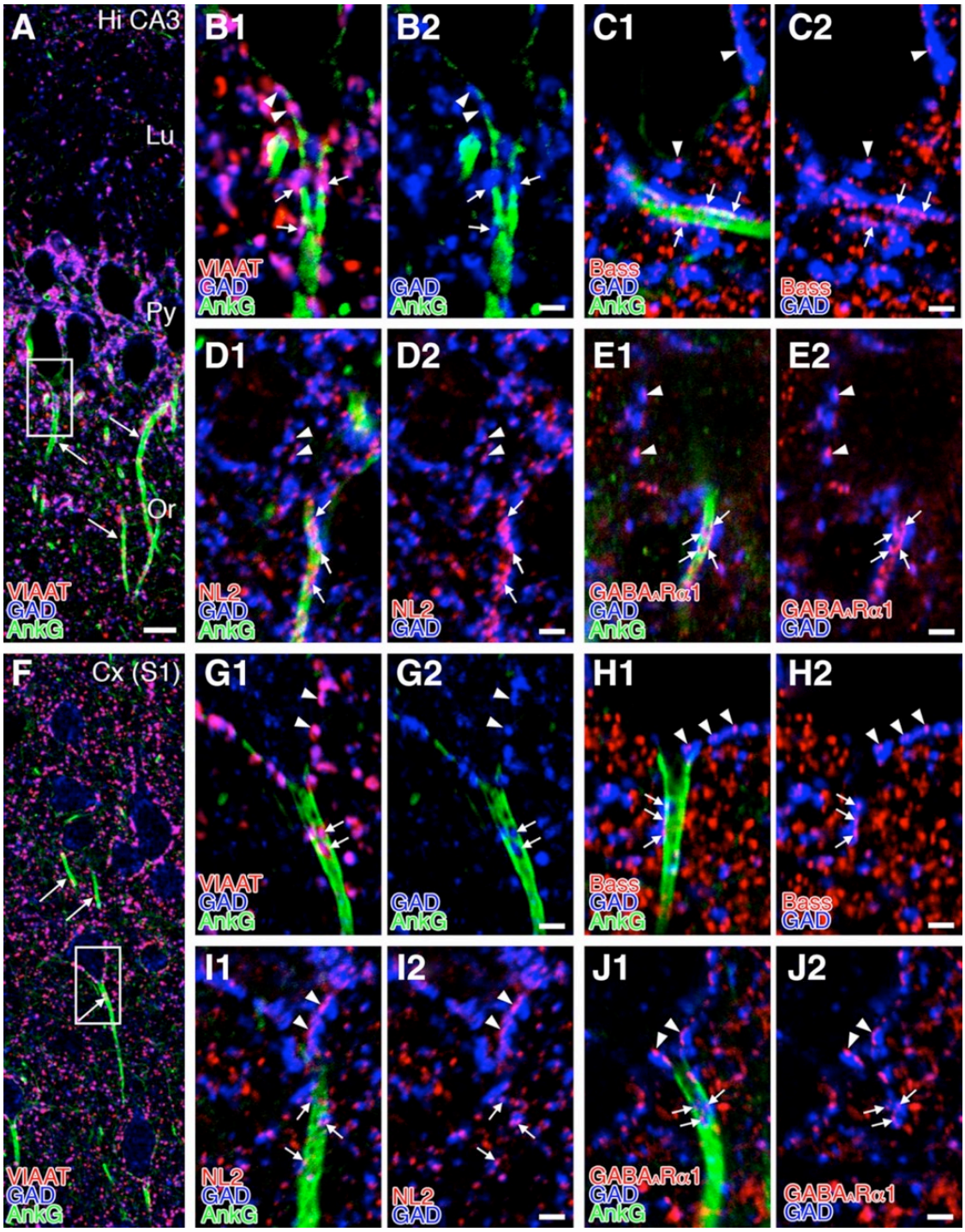


図８　海馬 CA3 領域（A-E）および大脳皮質（F-J）の錐体細胞における GABA 作動性シナプス伝達分子発現の三重蛍光染色像。

軸索初節を標的とする密な GABA 作動性軸索－軸索シナプスの形成を反映して、VIAAT 陽性（**A, B, F, G**：赤）、バスーン陽性（**C, H,**：赤）、ニューロリジン

２陽性（**D, I,**：赤）、$GABA_AR\alpha1$ 陽性（**E, J,**：赤）の点状反応がアンキリン G 陽性（緑）軸索初節に沿って観察され、GAD（青）とオーバラップもしくは近接している（矢印）。Lu、透明層；Or、多形細胞層；Py、錐体細胞層。スケール：**A**、**F**、10 µm；**B-E**、**G-J**、2 µm

一方、パンソー内部のバスケット細胞軸索は電位依存性 Na^+チャネルを発現せず、細胞膜の過分極化に関わる Shaker 型 K^+チャネル $K_V1.1$ と $K_V1.2$ およびこれらの足場タンパク PSD-95 が豊富に発現していることが知られている[23, 24, 32, 53]。軸索–軸索接触部におけるこれら分子発現を小脳と海馬で比較するため、$K_V1.1$ と $K_V1.2$ に対する抗体を作製した。これらの抗体は、脳サンプルを用いたイムノブロットにて単一バンドを認識し、$K_V1.1$ または $K_V1.2$ を発現する HEK293T 細胞サンプルにおいてもそれぞれを選択的に認識したことから、特異的であると判断した（図 9A）。三重蛍光染色により、パルブアルブミン陽性のパンソー内部のバスケット細胞軸索には $K_V1.1$、$K_V1.2$、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 Car8 陽性のプルキンエ細胞軸索にはほとんど認められなかった（図 9B-D、矢印）。対照的に、海馬 CA3 錐体細胞では、$K_V1.1$ と $K_V1.2$ の免疫反応はアンキリン G 陽性の軸索初節に認められたが、GAD 陽性の軸索終末側には認められなかった（図 9E、F、矢頭）。PSD-95 の免疫反応は軸索初節や介在ニューロン終末のどちらにもほとんど観察されなかった（図 9G、矢頭）。以上の結果から、軸索初節領域における Shaker 型 K^+チャネルとその足場蛋白の分子発現も、プルキンエ細胞と大脳皮質・海馬との間で異なっていることが明らかとなった。

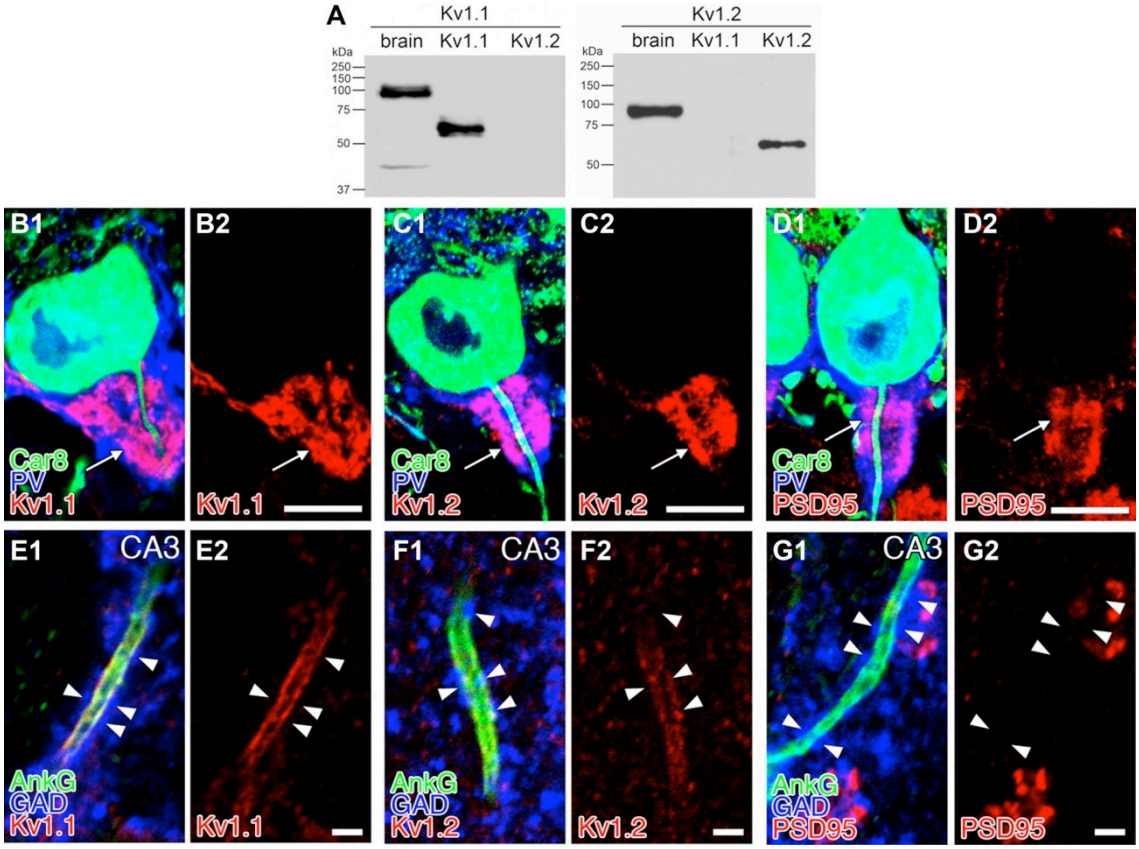


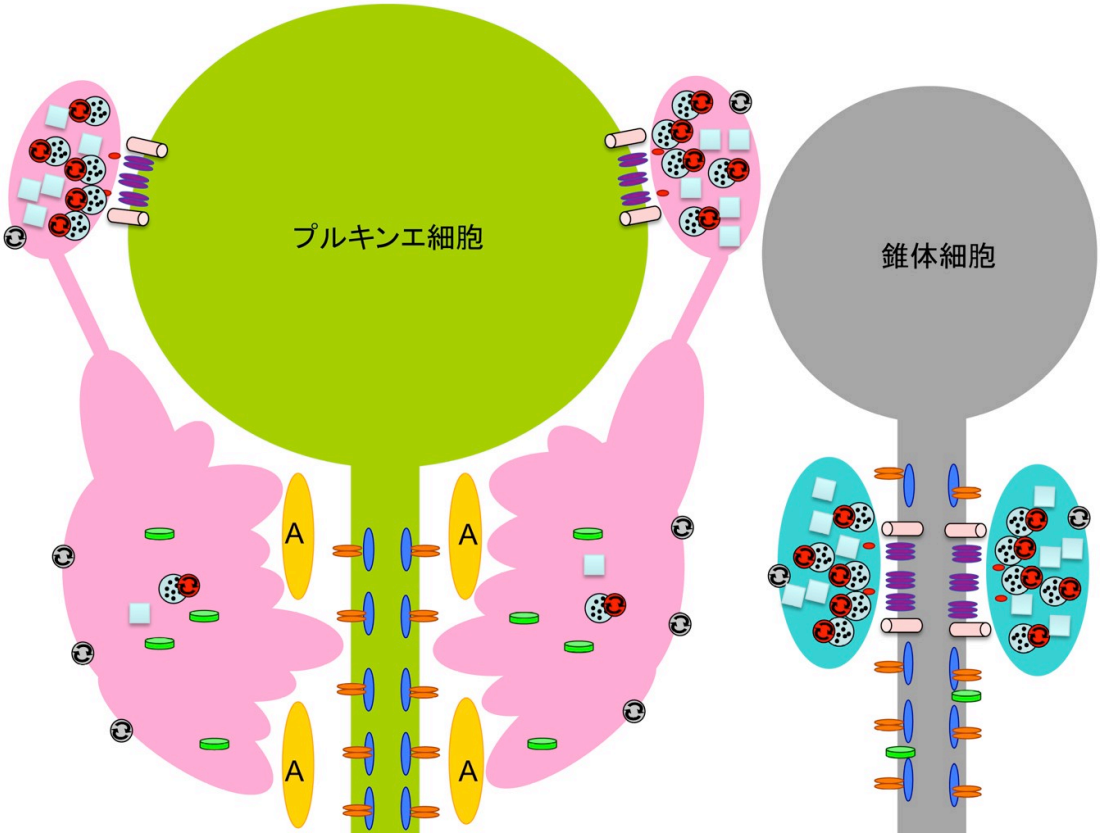
図９　プルキンエ細胞と海馬 CA3 錐体細胞の軸索初節における異なる Shaker 型カリウムチャネルとその足場タンパク PSD-95 の発現局在。

A. イムノブロットによる K_V1.1 抗体と K_V 1.2 抗体の特異性検定。K_V 1.1 抗体はマウス脳と K_V 1.1 発現細胞サンプルにおいてそれぞれ 100 kDa と 60 kDa のバンドを認識し（左）、K_V1.2 抗体はマウス脳と K_V 1.2 発現細胞サンプルにおいてそれぞれ 90 kDa と 60 kDa のバンドを認識する（右）。**B-D**.小脳パンソーにおける Car8（緑）、パルブアルブミン（青）、K_V 1.1（赤、**B**）、K_V 1.2（赤、**C**）、PSD-95（赤、**D**）に対する三重蛍光染色像。K_V 1.1、K_V 1.2、PSD-95 は、パルブアルブミン陽性のパンソーに高いレベルで発現し、Car8 陽性の軸索初節には発現しない。**E-F**. 海馬 CA3 錐体細胞の軸索初節におけるアンキリン G（緑）、GAD（青）、K_V 1.1（赤、**B**）、K_V 1.2（赤、**C**）、PSD-95（赤、**D**）に対する三重蛍光染色像。K_V 1.1 と K_V 1.2 は、アンキリン G 陽性の軸索初節に発現するが、

GAD 陽性の軸索終末には発現しない。PSD-95 の反応は、軸索初節と軸索終末のいずれも陰性である。スケール：10 µm

考察

本研究では、バスケット細胞軸索とプルキンエ細胞軸索初節の接触部において、GABA を介した化学的抑制に必要な分子構造基盤が備わっているかどうかを、シナプスの有無とシナプス伝達分子の発現の視点から検討した。本研究の観察結果は、軸索初節を標的として構築される分子解剖学的環境が、小脳プルキンエ細胞と大脳皮質・海馬の錐体細胞との間で大きく異なっていることを明らかにした（図 10）。



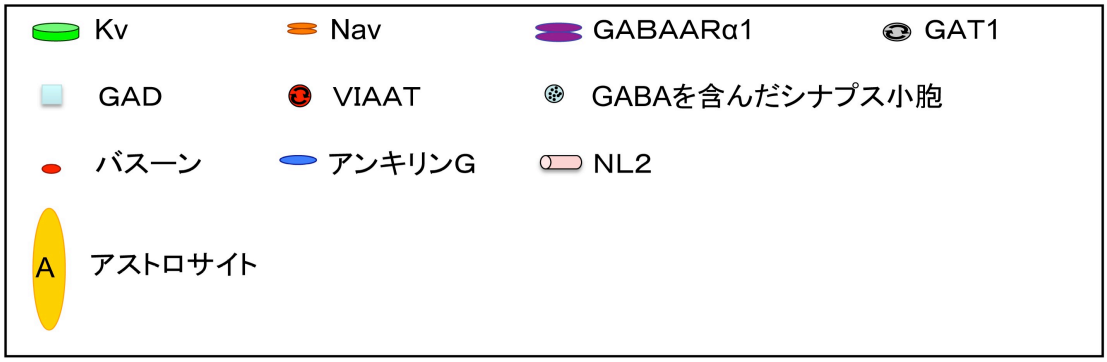


図１０　プルキンエ細胞（A）と大脳皮質・海馬錐体細胞（B）の軸索初節における GABA 作動性シナプス伝達に関する異なる分子形態学的基盤。

A. 小脳プルキンエ細胞体（緑）表面に形成される GABA 作動性シナプスでは、プレシナプス側のバスケット細胞の軸索（ピンク）に GAD、VIAAT、バスーンの発現と集積が確認され、そのポストシナプス側には $GABA_AR\alpha1$ やニューロリジン２の選択的発現も認められる。アンキリンGや電位依存性 Na^+チャネルが集積する軸索初節では、その表面の大部分をアストロサイトの突起が覆い、一部でパンソーと直接接触している。パンソーとの接触部位はシナプス構造に乏しく、GAD と VIAAT の発現も 5 分の 1 程度と低く、バスーンや $GABA_AR\alpha1$ やニューロリジン２の発現を欠いている。**B**. 海馬および大脳皮質の錐体細胞の軸索初節にも（灰）、アンキリンGや電位依存性 Na^+チャネルが集積する軸索初節が存在し、そこに GAD、VIAAT、バスーン、GABAARα1、ニューロリジンなどの発現が認められ、GABA 作動性の抑制性シナプス伝達に分子発現が揃っている。これらの分子形態学的特性の違いから、海馬および大脳皮質の錐体細胞の軸索初節とは異なり、パンソーがプルキンエ細胞の軸索初節に対して GABA を介した抑制性伝達を行なっていないことを示唆する。

Palay ら[35]が行った 60 個のラットプルキンエ細胞の軸索初節の検討では、バスケット細胞軸索によるシナプス形成が認められた軸索初節はたった 1 個であ

った。一方、Somogyi と Hamori[29] は、17 個のプルキンエ細胞軸索初節について電子顕微鏡連続切片を用いた三次元立体構築を行い、1 個の軸索初節あたりに形成される軸索–軸索シナプス数は、ラットで 2.9 個、ネコで 3.5 個あることを示し、これらのほとんどが軸索初節の近位 3 分の 1 の領域に見られたとした。また、グリアが被覆する軸索初節の表面割合は、ラットで 85.6%、ネコで 74.2%であると報告した。パンソー内部のバスケット細胞軸索間およびパンソーとプルキンエ細胞軸索初節間には特異な隔壁様接着が形成されるが、シナプス小胞の集積やシナプス後膜肥厚部などのシナプス性の特殊化は存在しないことも知られていた [15, 16]。私がこの学位論文の研究を始める段階は、プルキンエ細胞の軸索初節やここに形成される特殊なパンソーが、軸索－軸索シナプスを介して化学的伝達抑制を行使する場であるのかどうかについては不明な状況にあった。

本研究では、マウスを用いて 75 個のプルキンエ細胞軸索初節を解析した。その結果、軸索初節表面の 90.8%をアストロサイトが被覆していることを示し、先行研究と概ね一致していた。一方、典型的なシナプス構造はプルキンエ細胞の軸索起始部に散見されたが、それより遠位となる軸索初節には典型的なシナプス構造を見つけることはできなかった。研究論文による軸索－軸索シナプスの出現頻度の違いは、部分的には使用した動物種の違いや連続電子顕微鏡利用の有無などの相違に起因している可能性が考えられる。しかし、これまでの全ての研究論文は、パンソーとプルキンエ細胞軸索初節の間において軸索–軸索シナプスの出現頻度は小さいという点では一致しており、軸索–軸索シナプスが頻繁に認められる大脳皮質、海馬、扁桃体とは対照的である [13]（図 8 参照）。これらの終脳領域では、軸索–軸索シナプスを形成するシャンデリア細胞がそれぞれ 1 つの軸索初節に沿って 2 から 12 個のシナプスを形成し、さらに 1 つのシャンデリア細胞はおおよそ 250（大脳皮質）から 1200 個（海馬）もの錐体細胞を支

配しているとされている[52, 58]。すなわち、本研究の解析結果は、パンソーがプルキンエ細胞軸索初節を覆っているにも関わらず両者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浮き彫りにした。

パンソーとプルキンエ細胞軸索初節の間においてGABA作動性伝達が備えるべき分子発現を検討するため、典型的なGABA作動性シナプスが発現している代表的な分子（GAD、VIAAT、バスーン、$GABA_AR\alpha1$、ニューロリジン２[46, 47, 49, 50, 59]）の免疫組織化学的な検出を行った。これらの分子に対する免疫反応は、プルキンエ細胞の細胞体シナプスにおいて強く検出されたことから、本研究での免疫組織化学的検出の特異性と感度は妥当と考えられる。また、これらの分子は、海馬や大脳皮質の錐体細胞における軸索初節にも検出された（図 8）。錐体細胞の軸索初節におけるGABA作動性軸索－軸索シナプスの存在は、ここにGABA と GAT1 が局在することを示した先行研究[8, 10, 11]や、$GABA_AR\alpha1$ と $GABA_AR\alpha2$ の局在を示した先行研究[12]とも一致する。本研究において、GAD と VIAAT の発現レベルはプルキンエ細胞軸索初節と接触するパンソー内部のバスケット細胞軸索では低く、プルキンエ細胞の細胞体シナプスのレベルの 5 分の 1 程度であり、軸索初節に向かうような分子の集積傾向も認められなかった。最も重要なことは、アンキリンGで裏打ちされた軸索初節にバスーン、ニューロリジン２、$GABA_AR\alpha1$といった、シナプスの接着や伝達に関わる分子の発現を欠失していたことである。このうち、自発的抑制性シナプス電流が $GABA_AR\alpha1$ 欠損マウスのプルキンエ細胞で完全に消失することから、$GABA_AR\alpha1$はプルキンエ細胞に発現する唯一のαサブユニットであり、プルキンエ細胞における機能的な $GABA_A$受容体発現に必須であるとされている[48, 51, 59, 60]。したがって、パンソーでは、ある程度のGABAの合成とシナプス小胞充鎮が行われているとしても、GABA の放出や伝達に関わるプレシナプス側とポ

ストシナプス側の分子機構が備わっていないことになる。海馬の錐体細胞では、非常に低い密度ではあるがシナプス外膜にも $GABA_A$ 受容体が分布することが知られていることを考慮すれば [61]、プルキンエ細胞の軸索初節にも検出閾値以下レベルの $GABA_AR\alpha1$ の発現を否定するものではない。しかし、海馬や大脳皮質の錐体細胞の軸索–軸索シナプスの分子発現環境と比較すれば（図 10)、たとえ微量な $GABA_AR\alpha1$ が発現していたとしても、パンソーがプルキンエ細胞軸索初節の機能制御を行う上で十分な効力で作用を及ぼすとは考えにくい。

バスケット細胞の軸索は、GABA の細胞膜輸送に関わる GAT1 を豊富に発現する [62]（図 2C、D)。GABA は Ca^{2+}依存的な開口放出機構により細胞外に放出され、GAT はこれを細胞内に取り込むことで GABA によるシナプス伝達を終焉させ、伝達物質のリサイクルにも寄与する。また、GABA は、GAT の逆輸送機構により、Ca^{2+}非依存的・非小胞性に放出されることも報告されている [63]。GAT による GABA 輸送は 2 個の Na^+と 1 個の Cl^-の共輸送により起こるため、膜電位が上昇する状況や細胞内 Na^+濃度が上昇する状況において、GAT による GABA の逆輸送が起こりやすいと考えられている。したがって、GAT は、生理的条件下で細胞外 GABA 濃度を減少させ、過剰なニューロンの活動時には細胞外 GABA 濃度を増加させることで、GABA を介した抑制を時空間的に制限していることになる。この分子機能は、GABA 作動性シナプス活動の恒常性の維持やニューロンの保護的機構として重要と考えられる。しかし、パンソーとプルキンエ細胞軸索初節の間では GABA 作動性伝達のための構造基盤や分子発現が欠如しているのに加え、パンソー内のバスケット細胞軸索は電位依存性 Na^+チャネルを欠いているため、パンソーにこのような概念を当てはめることは難しい [24]（図 4D、E)。したがって、バスケット細胞軸索に豊富な GAT1 が、パンソーにおいて GABA の逆輸送を媒介していることも考えにくい。

一方、パンソーは、プルキンエ細胞の軸索初節を幾重にも取り囲み隔壁様構造を通して相互に密着することで、軸索初節を電気的に抑制しプルキンエ細胞の興奮性を制御していると考えられている [30]。このような電気的抑制は、パンソーに類似した構造を有する硬骨魚類のマウスナー細胞のアクソンキャップで確立されており [16, 64, 65]、マウスナー細胞の軸索初節は隣接する神経線維の内向き電流に伴って過分極を起こすと考えられている [66]。これは、アクソンキャップでは活動電位の伝播が行われないことに加え、細胞外の高い電気的抵抗により、電流の流れやすいマウスナー細胞の軸索初節が電流の受動的な吹き出し口となるためと考えられている [66, 67]。パンソーでの電位依存性 Na^+チャネルの欠如 [24]（図 4D、E）は、アクソンキャップと同様にパンソーへの活動電位の伝播を遮断していると思われる。また、パンソーで発達している隔壁様結合はパンソー構造の電気抵抗を高めると考えられる。さらに、PSD-95 を足場タンパクとする [24, 25]（図 9）Shaker 型 K^+チャネルの高度な集積は、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可能性を示唆する [16, 68]。対照的に、海馬の軸索-軸索シナプスを構成する終末では、Shaker 型 K^+チャネルや PSD-95 の発現はない（図 9）。つまり、これらのパンソーのユニークな分子形態学的基盤は、プルキンエ細胞の軸索初節に対して電気的抑制を行っているとする見解や仮説とは矛盾しない。すなわち、バスケット細胞はプルキンエ細胞の細胞体シナプスにおいて GABA を介した抑制性シナプス伝達を行い、プルキンエ細胞の軸索初節に対してパンソーを介した電気的抑制を行うことで、2 つの異なる作用機構を介してプルキンエ細胞の興奮性を制御していることが想定される。このような点で、一部の論文等では “パンソーシナプス”という用語を使用してパンソーをよぶこと [20] は不適切である。パンソーが哺乳類の脳にお

いて小脳プルキンエ細胞の軸索初節に特異的であることを考慮すれば、この構造が小脳機能の発現と制御に重要な役割を果たしていることは想像に難くない。しかし、パンソーの機能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ている。

総括

小脳皮質において、GABA 作動性介在ニューロンであるバスケット細胞の軸索はプルキンエ細胞の軸索初節を幾重にも取り囲み、パンソーと呼ばれる特異な構造を形成している。この構造の機能的役割については、プルキンエ細胞における活動電位の発生に対して電気的抑制を行うという仮説と、GABA を介した化学的抑制を行うという 2 つの仮説が存在している。これまで、パンソーは電位依存性 Na^+チャネルを欠く一方、電位依存性 K^+チャネルを豊富に発現し、バスケット細胞軸索同士で隔壁様接着を形成することなどから、一部の研究者から電気的抑制仮説を支持する見解が提起されていた。しかし、GABA を介した化学的抑制仮説を支持する神経化学的基盤については不明なままであった。本研究では、パンソーによる化学的抑制の分子形態学的基盤について、C56BL/6 マウスを用いて検討した。

電子顕微鏡による形態学的観察では、最初の髄鞘が現れるまでのプルキンエ細胞の軸索初節は、バスケット細胞の軸索とは一部で接触するだけで、そのほとんどはアストロサイトの突起によって覆われていた。次に、GABA 作動性抑制性シナプス伝達に関与する分子として、GABA 合成酵素 GAD、GABA の小胞充填に関わる輸送体 VIAAT、アクティブゾーン関連蛋白バスーン、$GABA_A\alpha1$ 受容体、抑制性シナプスの接着分子ニューロリジン 2 に着目し、パンソー領域における発現を調べた。金コロイド標識による包埋後免疫電子顕微鏡法を用いて、プルキンエ細胞軸索初節のパンソー接触部における発現レベルを測定し、プルキンエ細胞体上の抑制性シナプスにおける発現レベルと比較した。GAD と VIAAT の発現レベルはパンソー接触部では低く、細胞体シナプスの 5 分の 1 程度であった。バスーン、$GABA_A\alpha1$、ニューロリジン 2 の発現を調べると、細胞

体シナプス部では高いレベルの発現が検出されたが、パンソー接触部では検出感度以下のレベルであった。一方、大脳皮質や海馬の錐体細胞の軸索初節に形成される軸索－軸索シナプスを同様の方法で検討すると、細胞体シナプスと同様に GABA 作動性シナプス伝達分子を豊富に発現しており、パンソーの分子形態学的特性とは大きく異なっていた。

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 Shaker 型 K^+チャネル $K_V1.1$ と $K_V1.2$、これらの足場タンパクである PSD-95 が豊富に発現した。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たが、ここに入力する軸索終末には認められなかった。したがって、Shaker 型 K^+チャネルやその足場タンパクの発現においても、バスケット細胞軸索と錐体細胞軸索初節への入力軸索の間で対照的な分子形態学的特性を有していることが判明した。

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。

謝辞

本研究の機会を与えて頂き、終始あたたかい御指導と激励を賜りました北海道大学大学院医学研究科解剖学講座教授　渡辺雅彦　先生に謹んで感謝の意を表します。また、日々の研究生活において、直接御指導を賜り、終始懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました助教　内ヶ島基政　先生に心から感謝の意を表します。さらに、研究および論文作成に関して多大なるご指導をいただきました講師　山崎美和子　先生、助教　宮崎太輔　先生、はじめ同講座の皆様には深く感謝いたします。

引用文献

1. Ogawa, Y. & Rasband, M. N. The functional organization and assembly of the axon initial segment. Curr Opin Neurobiol 18, 307-13 (2008).
2. Debanne, D. & Rama, S. Astrocytes shape axonal signaling. Sci Signal 4, pe11 (2011).
3. Clark, B. D., Goldberg, E. M. & Rudy, B. Electrogenic tuning of the axon initial segment. Neuroscientist 15, 651-68 (2009).
4. Kordeli, E., Lambert, S. & Bennett, V. AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. J Biol Chem 270, 2352-9 (1995).
5. Berghs, S. et al. betaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system. J Cell Biol 151, 985-1002 (2000).
6. Kole, M. H. & Stuart, G. J. Signal processing in the axon initial segment. Neuron 73, 235-47.
7. Somogyi, P. A specific 'axo-axonal' interneuron in the visual cortex of the rat. Brain Res 136, 345-50 (1977).
8. Peters, A., Proskauer, C. C. & Ribak, C. E. Chandelier cells in rat visual cortex. J Comp Neurol 206, 397-416 (1982).
9. Freund, T. F., Martin, K. A., Smith, A. D. & Somogyi, P. Glutamate decarboxylase-immunoreactive terminals of Golgi-impregnated axoaxonic cells and of presumed basket cells in synaptic contact with pyramidal neurons of the cat's visual cortex. J Comp Neurol 221, 263-78 (1983).
10. Somogyi, P. et al. Identified axo-axonic cells are immunoreactive for GABA in the hippocampus and visual cortex of the cat. Brain Res 332, 143-9 (1985).
11. DeFelipe, J. & Gonzalez-Albo, M. C. Chandelier cell axons are immunoreactive for GAT-1 in the human neocortex. Neuroreport 9, 467-70 (1998).
12. Nusser, Z., Sieghart, W., Benke, D., Fritschy, J. M. & Somogyi, P. Differential synaptic localization of two major gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha subunits on hippocampal pyramidal cells. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 11939-44 (1996).
13. Howard, A., Tamas, G. & Soltesz, I. Lighting the chandelier: new vistas for axo-axonic cells. Trends Neurosci 28, 310-6 (2005).
14. Roman y Cajal, S. Histolory of the nervous system of man and vertebrates. Oxford University Press (1911).

15. Gobel, S. Axo-axonic septate junctions in the basket formations of the cat cerebellar cortex. J Cell Biol 51, 328-33 (1971).
16. Sotelo, C. & Llinas, R. Specialized membrane junctions between neurons in the vertebrate cerebellar cortex. J Cell Biol 53, 271-89 (1972).
17. Palay, S. L., Billings-Gagliardi, S. & Chan-Palay, V. Neuronal perikarya with dispersed, single ribosomes in the visual cortex of Macaca mulatta. J Cell Biol 63, 1074-89 (1974).
18. Rosina, A., Morara, S. & Provini, L. GAT-1 developmental expression in the rat cerebellar cortex: basket and pinceau formation. Neuroreport 10, 1613-8 (1999).
19. Gianola, S., Savio, T., Schwab, M. E. & Rossi, F. Cell-autonomous mechanisms and myelin-associated factors contribute to the development of Purkinje axon intracortical plexus in the rat cerebellum. J Neurosci 23, 4613-24 (2003).
20. Ango, F. et al. Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. Cell 119, 257-72 (2004).
21. Sotelo, C. Development of "Pinceaux" formations and dendritic translocation of climbing fibers during the acquisition of the balance between glutamatergic and gamma-aminobutyric acidergic inputs in developing Purkinje cells. J Comp Neurol 506, 240-62 (2008).
22. Ichikawa, R. et al. Developmental switching of perisomatic innervation from climbing fibers to basket cell fibers in cerebellar Purkinje cells. J Neurosci 31, 16916-27 (2011).
23. Wang, H., Kunkel, D. D., Schwartzkroin, P. A. & Tempel, B. L. Localization of Kv1.1 and Kv1.2, two K channel proteins, to synaptic terminals, somata, and dendrites in the mouse brain. J Neurosci 14, 4588-99 (1994).
24. Laube, G. et al. Ultrastructural localization of Shaker-related potassium channel subunits and synapse-associated protein 90 to septate-like junctions in rat cerebellar Pinceaux. Brain Res Mol Brain Res 42, 51-61 (1996).
25. Bobik, M., Ellisman, M. H., Rudy, B. & Martone, M. E. Potassium channel subunit Kv3.2 and the water channel aquaporin-4 are selectively localized to cerebellar pinceau. Brain Res 1026, 168-78 (2004).
26. Zhou, D. et al. AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. J Cell Biol 143, 1295-304 (1998).
27. Jenkins, S. M. & Bennett, V. Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje

neuron initial segments. J Cell Biol 155, 739-46 (2001).

28. Foust, A., Popovic, M., Zecevic, D. & McCormick, D. A. Action potentials initiate in the axon initial segment and propagate through axon collaterals reliably in cerebellar Purkinje neurons. J Neurosci 30, 6891-902 (2010).
29. Somogyi, P. & Hamori, J. A quantitative electron microscopic study of the Purkinje cell axon initial segment. Neuroscience 1, 361-5 (1976).
30. Korn, H. & Axelrad, H. Electrical inhibition of Purkinje cells in the cerebellum of the rat. Proc Natl Acad Sci U S A 77, 6244-7 (1980).
31. Gabbott, P. L., Somogyi, J., Stewart, M. G. & Hamori, J. GABA-immunoreactive neurons in the rat cerebellum: a light and electron microscope study. J Comp Neurol 251, 474-90 (1986).
32. Fukaya, M. & Watanabe, M. Improved immunohistochemical detection of postsynaptically located PSD-95/SAP90 protein family by protease section pretreatment: a study in the adult mouse brain. J Comp Neurol 426, 572-86 (2000).
33. Watanabe, M. et al. Selective scarcity of NMDA receptor channel subunits in the stratum lucidum (mossy fibre-recipient layer) of the mouse hippocampal CA3 subfield. Eur J Neurosci 10, 478-87 (1998).
34. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193, 265-75 (1951).
35. Palay, S. L., Sotelo, C., Peters, A. & Orkand, P. M. The axon hillock and the initial segment. J Cell Biol 38, 193-201 (1968).
36. Peters, A., Feldman, M. & Saldanha, J. The projection of the lateral geniculate nucleus to area 17 of the rat cerebral cortex. II. Terminations upon neuronal perikarya and dendritic shafts. J Neurocytol 5, 85-107 (1976).
37. Chaudhry, F. A. et al. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. Neuron 15, 711-20 (1995).
38. Jiao, Y. et al. Carbonic anhydrase-related protein VIII deficiency is associated with a distinctive lifelong gait disorder in waddles mice. Genetics 171, 1239-46 (2005).
39. Patrizi, A. et al. Synapse formation and clustering of neuroligin-2 in the absence of GABAA receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 13151-6 (2008).
40. Kosaka, T., Kosaka, K., Nakayama, T., Hunziker, W. & Heizmann, C. W. Axons and axon terminals of cerebellar Purkinje cells and basket cells have higher levels of parvalbumin immunoreactivity than somata and dendrites: quantitative analysis by immunogold labeling. Exp Brain Res 93, 483-91 (1993).
41. Itouji, A., Sakai, N., Tanaka, C. & Saito, N. Neuronal and glial localization of two

GABA transporters (GAT1 and GAT3) in the rat cerebellum. Brain Res Mol Brain Res 37, 309-16 (1996).

42. Chiu, C. S. et al. Number, density, and surface/cytoplasmic distribution of GABA transporters at presynaptic structures of knock-in mice carrying GABA transporter subtype 1-green fluorescent protein fusions. J Neurosci 22, 10251-66 (2002).
43. Kaufman, D. L., McGinnis, J. F., Krieger, N. R. & Tobin, A. J. Brain glutamate decarboxylase cloned in lambda gt-11: fusion protein produces gamma-aminobutyric acid. Science 232, 1138-40 (1986).
44. McIntire, S. L., Reimer, R. J., Schuske, K., Edwards, R. H. & Jorgensen, E. M. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. Nature 389, 870-6 (1997).
45. tom Dieck, S. et al. Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. J Cell Biol 142, 499-509 (1998).
46. Oertel, W. H., Schmechel, D. E., Mugnaini, E., Tappaz, M. L. & Kopin, I. J. Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat cerebellum with a new antiserum. Neuroscience 6, 2715-35 (1981).
47. Chaudhry, F. A. et al. The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. J Neurosci 18, 9733-50 (1998).
48. Fritschy, J. M. & Panzanelli, P. Molecular and synaptic organization of GABAA receptors in the cerebellum: Effects of targeted subunit gene deletions. Cerebellum 5, 275-85 (2006).
49. Varoqueaux, F., Jamain, S. & Brose, N. Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. Eur J Cell Biol 83, 449-56 (2004).
50. Richter, K. et al. Presynaptic cytomatrix protein bassoon is localized at both excitatory and inhibitory synapses of rat brain. J Comp Neurol 408, 437-48 (1999).
51. Fritschy, J. M., Panzanelli, P., Kralic, J. E., Vogt, K. E. & Sassoe-Pognetto, M. Differential dependence of axo-dendritic and axo-somatic GABAergic synapses on GABAA receptors containing the alpha1 subunit in Purkinje cells. J Neurosci 26, 3245-55 (2006).
52. Somogyi, P., Freund, T. F. & Cowey, A. The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey. Neuroscience 7, 2577-607 (1982).
53. Kistner, U. et al. SAP90, a rat presynaptic protein related to the product of the Drosophila tumor suppressor gene dlg-A. J Biol Chem 268, 4580-3 (1993).
54. Yamada, K., Fukaya, M., Shimizu, H., Sakimura, K. & Watanabe, M. NMDA

receptor subunits GluRepsilon1, GluRepsilon3 and GluRzeta1 are enriched at the mossy fibre-granule cell synapse in the adult mouse cerebellum. Eur J Neurosci 13, 2025-36 (2001).

55. Yamada, K. et al. Glutamate transporter GLT-1 is transiently localized on growing axons of the mouse spinal cord before establishing astrocytic expression. J Neurosci 18, 5706-13 (1998).

56. Nakamura, M. et al. Signaling complex formation of phospholipase Cbeta4 with metabotropic glutamate receptor type 1alpha and 1,4,5-trisphosphate receptor at the perisynapse and endoplasmic reticulum in the mouse brain. Eur J Neurosci 20, 2929-44 (2004).

57. Miyazaki, T., Fukaya, M., Shimizu, H. & Watanabe, M. Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. Eur J Neurosci 17, 2563-72 (2003).

58. Li, X. G., Somogyi, P., Tepper, J. M. & Buzsaki, G. Axonal and dendritic arborization of an intracellularly labeled chandelier cell in the CA1 region of rat hippocampus. Exp Brain Res 90, 519-25 (1992).

59. Fritschy, J. M. & Mohler, H. GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. J Comp Neurol 359, 154-94 (1995).

60. Kralic, J. E. et al. Genetic essential tremor in gamma-aminobutyric acidA receptor alpha1 subunit knockout mice. J Clin Invest 115, 774-9 (2005).

61. Kasugai, Y. et al. Quantitative localisation of synaptic and extrasynaptic GABAA receptor subunits on hippocampal pyramidal cells by freeze-fracture replica immunolabelling. Eur J Neurosci 32, 1868-88.

62. Morara, S., Brecha, N. C., Marcotti, W., Provini, L. & Rosina, A. Neuronal and glial localization of the GABA transporter GAT-1 in the cerebellar cortex. Neuroreport 7, 2993-6 (1996).

63. Attwell, D., Barbour, B. & Szatkowski, M. Nonvesicular release of neurotransmitter. Neuron 11, 401-7 (1993).

64. Nakajima Y & K, K. Fine structure of the Mauthner cell:synaptic topography and comparative study. In: Neurobiology of the Mauthner cell (Faber D, Korn H, eds). New York: Raven (1978).

65. Triller, A. & Korn, H. Glio-axonic junctional like complexes at the Mauthner cell's axon cap of teleosts: a possible morphological basis for field effect inhibitions. Neurosci Lett 18, 275-81 (1980).

66. Furukawa, T. & Furshpan, E. J. Two inhibitory mechanisms in the Mauthner

neurons of goldfish. J Neurophysiol 26, 140-76 (1963).

67. Weiss, S. A. & Faber, D. S. Field effects in the CNS play functional roles. Front Neural Circuits 4, 15.

68. Faber, D. S. & Korn, H. Electrical field effects: their relevance in central neural networks. Physiol Rev 69, 821-63 (1989).