



Title	発達期マウスのプルキンエ細胞における「勝者」登上線維シナプスの分子解剖学的強化基盤
Author(s)	新田, 麻子
Description	配架番号 : 2941
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16550号
Issue Date	2025-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16550
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95989
Type	doctoral thesis
File Information	NITTA_Asako.pdf



学 位 論 文

発達期マウスのプルキンエ細胞における

「勝者」 登上線維シナプスの分子解剖学的強化基盤

(Molecular and anatomical strengthening of “winner” climbing fiber
synapses in developing mouse Purkinje cells)

2025 年 6 月

北 海 道 大 学

新 田 麻 子

Asako Nitta

学 位 論 文

発達期マウスのプルキンエ細胞における

「勝者」 登上線維シナプスの分子解剖学的強化基盤

(Molecular and anatomical strengthening of “winner” climbing fiber
synapses in developing mouse Purkinje cells)

2025 年 6 月

北 海 道 大 学

新 田 麻 子

Asako Nitta

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
方法	10 頁
結果	18 頁
考察	36 頁
結論	39 頁
謝辞	40 頁
利益相反	41 頁
引用文献	42 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の成果をまとめた論文は、以下の雑誌に発表された。

1. Asako Nitta, Miwako Yamasaki, Taisuke Miyazaki, Kohtarou Konno, Haruto Yoshimura, Masahiko Watanabe. Molecular and anatomical strengthening of “winner” climbing fiber synapses in developing mouse Purkinje cells. *J Neurosci.*, *under revision*.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 新田麻子、山崎美和子、今野幸太郎、宮崎太輔、渡辺雅彦

発達期マウス小脳登上線維－プルキンエ細胞投射系の勝者・敗者シナプスの分子解剖学的研究

第 129 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2024 年 3 月 21 日、沖縄

2. 新田麻子、山崎美和子、宮崎太輔、今野幸太郎、渡辺雅彦

発達期マウスのプルキンエ細胞において、「勝者」登上線維シナプスは分子発現並びに形態が強化される

Molecular and anatomical strengthening of “winner” climbing fiber synapses in developing mouse Purkinje cells

第 130 回日本解剖学会/第 102 回日本整理学会/第 98 回日本薬理学会 合同大会、

2025 年 3 月 17 日、千葉

要旨

【背景と目的】

神経系の発達過程では、初期に形成された余剰なシナプスのうち、必要なものが強化されて残存し、それ以外は除去され効率的な回路が完成する。発達期マウスの小脳登上線維-プルキンエ細胞投射系は、活動依存的な神経回路の精緻化を示す代表的モデルである。生直後のプルキンエ細胞は、似通った強度の5本以上の登上線維に支配されている。その後1本の登上線維が強化され、生後9日目(P9)以降に「勝者」として細胞体から樹状突起に移動する。移動できなかった「敗者」はP21までに除去され、「勝者」による単一支配が確立する。この一連の過程のうち、「敗者」の除去過程は解明が進んでいるが、「勝者」と「敗者」の選別過程には不明な点が多い。本研究では、発達期マウスの「勝者」と「敗者」登上線維シナプスの分化過程について分子解剖学的な解析を行った。

【材料と方法】

主にP7-P21のC57BL/6Jマウスを使用し、以下の組織学解析を行った。生体マウスに対する処置はイソフルラン吸入か、ペントバルビタールの腹腔内投与による深麻酔下で行った。

① 順行性神経標識を組み合わせた蛍光多重免疫染色法

マウスの下オリーブ核に順行性トレーサーを注入し、登上線維を蛍光標識した。2-5日間の生存期間の後、9%グリオキサール/8%酢酸溶液による経心的灌流固定を行い、矢状断切片を作成し蛍光多重免疫染色を行った。分子マーカーとして、全ての登上線維終末を標識する2型小胞膜型グルタミン酸トランスポーター(VGluT2)、シナプス前終末のRIM1/2、シナプス後部のAMPA型グルタミン酸受容体(AMPA受容体)、シナプス後部の足場タンパク質(PSD-95)の抗体を使用した。共焦点レーザー顕微鏡の撮像では、登上線維の経路を追跡するため適宜Zスタックを用いた。画像は各蛍光チャンネルに分解して二値化し、VGluT2のシグナルに基づいて対象領域を設定し、内部に含まれるAMPA受容体、RIM1/2、PSD-95のシグナル強度を測定した。切片間のばらつきによる影響を最小限にするため、解析領域毎にシグナル強度の標準化を行った。

② 連続電子顕微鏡法を用いた登上線維シナプスの三次元再構築

0.1%グルタルアルデヒド添加4%パラホルムアルデヒド溶液により経心的灌流固定したマウス(P12)の矢状断切片を使い、VGluT2抗体を用いた金コロイド銀増感法による包埋前免疫電顕を行った。軟膜と平行な断面から細胞体と近位樹状突起の移行部を含む連続超薄切片を作成し、走査型電子顕微鏡により210枚の連続画像を取得した。セグメンテーションは手動で行い、得られたプルキンエ細胞と登上線維シナプスの三次元再構築画像からスパインの体積とシナプス後肥厚(PSD)の面積を算出した。

【結果】

① 蛍光多重免疫染色によるシナプス分子発現の比較

本研究では、大部分の「勝者」が細胞体に限局する P7-P9 と、樹状突起に移動する P10-P12、樹状突起への移動がほぼ完了する P13-P15 の 3 ステージに分けて分子発現の変化を検討した。また登上線維シナプスは以下の 3 群、(a)「勝者」線維の樹状突起シナプス、(b)「勝者」線維の細胞体シナプス、(c)「敗者」線維の細胞体シナプス、に分類した。AMPA 受容体のシグナル強度は、P7-P9 において「勝者」線維の細胞体シナプスで最も高かった。しかしその後は「勝者」線維の樹状突起シナプスでのシグナル強度が、「勝者」線維の細胞体シナプスより有意に高かった。また「敗者」線維の細胞体シナプスのシグナルは一貫して最も低く、発達とともにさらに低下した。シナプス前部のアクティブゾーンでグルタミン酸放出制御の中心的役割を担う RIM1/2 の発現は一貫して「勝者」線維の樹状突起シナプスで高く、この傾向はその後さらに顕著になった。シナプス後部の足場タンパクである PSD-95 のシグナル強度はゆるやかに推移し、P7-P9 では 3 群でほぼ同様であった。その後、P10-P12 以降に「勝者」線維の樹状突起シナプスでの発現が、他の 2 群よりも有意に高くなった。また「勝者」と「敗者」線維の細胞体シナプスでは、発達とともに発現が減少した。

② 連続電子顕微鏡法を用いた登上線維シナプスの三次元再構築

「勝者」線維の樹状突起および細胞体シナプスでは、終末およびスパインが分葉化を伴う複雑な形態に分化し、PSD の面積は有意に大きかった。これに対し「敗者」線維の細胞体シナプスは分葉化を伴わない単純な形態を示し、PSD の面積は有意に小さかった。シナプスを形成するスパインの体積や、スパイン当たりのシナプス数については 3 群間で有意差は検出されなかった。また全ての群でスパインの体積と PSD の面積は線形の正の相関を示したが、「勝者」線維のシナプスでは「敗者」線維のものよりも近似直線の傾きが大きく、大きなスパインはより大きな PSD を形成する傾向が示唆された。

【考察】

これまでの研究から、P7 頃までの登上線維入力シナプス機能や構造が似通っており、入力間の強弱は各線維が形成するシナプスの数で決まることが明らかになっている。本研究では P7 以降の「勝者」の登上線維シナプスにおいて、シナプス強度に影響を与える分子発現の増加や PSD の増大、シナプス形態の分葉化など分子解剖学的な強化が生じていることを明らかにした。

P7-P9 の「勝者」線維における細胞体シナプスの後部では、AMPA 受容体の発現が「敗者」線維のシナプスよりも有意に高く、両者のシナプス機能における質的な分化を示唆している。P10 以降では樹状突起に移動した「勝者」線維のシナプスで AMPA 受容体や RIM1/2 の発現がさらに増加していた。この所見は「勝者」線維のシナプスでグルタミン酸放出効率などの機能的な成熟が進むという、同時期の電気生理学解析の報告と合致する。また、シナプス後部の AMPA 受容体の活動は登上線維終末からのグルタミン酸放出機能の維持に不可欠であることも知られている。したがってこの結果は「勝者」シナプスの AMPA 受容体の活動が、

未知の逆行性シグナルを介してシナプス前部の RIM1/2 の発現を増加させ、シナプス伝達効率を高めるという正のフィードバック機構の存在を示唆している。

シナプス機能の変化は、PSD サイズの増減などの構造的変化に先行することが知られている。本研究では、樹状突起のシナプス形成がピークとなる P12 で「勝者」線維の細胞体と樹状突起シナプスの PSD 面積は、「敗者」線維の細胞体シナプスより大きいことを明らかにした。しかし「勝者」線維の細胞体シナプスでは「敗者」のシナプスと同様に、その後の発達過程で AMPA 受容体の発現が減少することから、機能的に弱化されていくと予想される。また、細胞体のシナプス除去が進む生後 2 週目において、抑制性のバスケット細胞終末が形成するシナプス後部に一過性に PSD-95 が検出されることが知られている。こうした結果からは、AMPA 受容体の発現低下に伴うシナプス機能の弱化の後で、PSD-95 を含むシナプス後部構造の分解が進行しシナプス結合が離解していく可能性が示唆される。

【結論】

本研究は発達期における「勝者」登上線維シナプスで、PSD の増大やシナプス形態の分葉化を伴う構造的強化とシナプス分子発現の増加による選択的強化が生じることを明らかにした。この強化は「勝者」シナプスの競合優位性を確保し、神経支配領域の拡大と他の弱いシナプスの除去を促進するための分子解剖学的基盤を提供すると考えられる。

略語表

aa	amino acid residue (アミノ酸残基)
ANCOVA	analysis of covariance (共分散解析)
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA 受容体)
A.U.	arbitrary unit (任意単位)
BDNF	brain-derived neurotrophic factor (脳由来神経栄養因子)
CAST1	cytomatrix at the active zone-associated structural protein 1 (アクティブゾーン細胞マトリックス関連タンパク1)
Cav2.1	pore-forming subunit of the P/Q-type voltage-dependent calcium channel (P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの孔形成サブユニット)
CF	climbing fiber (登上線維)
Cy3	Cyanine 3 (シアニン系色素 Cy3)
DA488	dextran amine-conjugated Alexa Fluor 488 (Alexa Fluor 488 標識デキストラン)
d-CF	double-labeled climbing fiber terminal (二重標識登上線維終末)
EGFP	enhanced green fluorescent protein (緑色蛍光タンパク質)
Go	goat polyclonal antibody (ヤギポリクローナル抗体)
Gp	guinea pig polyclonal antibody(モルモットポリクローナル抗体)
HEK	human embryonic kidney cells (ヒト胎児腎細胞)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸)
IB	immunoblot (イムノブロット法)
IgG	immunoglobulin G (免疫グロブリン G クラス)。
Igsf9	immunoglobulin superfamily 9 (免疫グロブリンスーパーファミリー9)
IH	immunohistochemistry (免疫組織化学法)
KO	knockout (遺伝子欠損)
LTP	long-term potentiation (長期増強)
mGluR1	type 1 metabotropic glutamate receptor (1 型代謝型グルタミン酸受容体)
Mo	mouse monoclonal antibody(マウスモノクローナル抗体)
NCBI	National Center Biotechnology Information (米国国立生物工学情報センター)
O.C.T	optimal cutting temperature (凍結切片作製最適温度)
PB	phosphate buffer (リン酸緩衝液)
PBS	phosphate-buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)
PSD	postsynaptic density (シナプス後肥厚)
Rb	rabbit polyclonal antibody (ウサギポリクローナル抗体)
RIM	Rab3-interacting molecule (Rab3 結合タンパク質)
ROI	region of interest (関心領域)
RRID	research resource identifiers (研究資源識別子)

Rt	rat monoclonal antibody (ラットモノクローナル抗体)
s-CF	single-labeled climbing fiber terminal (一重標識登上線維終末)
SEM	standard errors of the mean (標準誤差)
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B (トロポミオシン関連チロシンキナーゼ B)
VDCC	voltage-dependent calcium channel (電位依存性カルシウムチャネル)
VGluT2	type 2 vesicular glutamate transporter (2型小胞膜型グルタミン酸トランスポーター)
VIAAT	vesicular inhibitory amino acid transporter (小胞膜型抑制性アミノ酸トランスポーター)
z-score	z-score (z 得点)

諸言

中枢神経系および末梢神経系の形成過程では、最初に過剰な数のシナプスが形成される。しかしその後、必要なシナプスは強められて残存する一方、不要なシナプスは弱められて除去される(Purves and Lichtman, 1980; Katz and Shatz, 1996; Lichtman and Colman, 2000; Hensch, 2004)。この現象は「シナプス刈り込み」と呼ばれ、幼若期の無駄の多い未熟な神経回路が外部環境の影響に応じて活動依存性に変化し、将来の機能的で成熟した回路へと再編成される普遍的過程であると考えられている(Purves and Lichtman, 1980; Lichtman and Colman, 2000; Hashimoto and Kano, 2005)。

発達期中枢神経系における活動依存性の神経回路精緻化を研究する代表的モデルの 1 つに、齧歯類の小脳登上線維-プルキンエ細胞投射系がある(Crepel, 1982; Lohof et al., 1996; Hashimoto and Kano, 2005; Hashimoto et al., 2009a)。プルキンエ細胞は小脳皮質で唯一の出力ニューロンであり、深部小脳核への抑制性投射を行うことで協調運動や運動学習を制御する。

プルキンエ細胞は 2 系統の興奮性入力を受けている。1 つが苔状線維から入力を受けた顆粒細胞の軸索である平行線維、もう 1 つが延髄の下オリーブ核に由来する登上線維である。両者の支配様式は対照的であることがよく知られている(Palay and Chan-Palay, 1974)。平行線維は 1 つのプルキンエ細胞の遠位樹状突起に対して約 10–20 万本がシナプスを形成するが、1 本あたりの入力強度は弱い。一方、登上線維は 1 つのプルキンエ細胞に対し、1 本のみで約 200–300 個のシナプスを形成し、強力な脱分極を引き起こす。

生後間もない時期のプルキンエ細胞は複数の登上線維により多重支配されているが、発達とともに余剰な「敗者」が刈り込まれて除去され、1 本の「勝者」のみが残存し登上線維:プルキンエ細胞の 1:1 の支配関係(単一支配)が完成する(図 1)。単一支配の確立過程は段階的であり、次のような詳細が明らかとなっている(図 2)。登上線維は誕生時点で既に下オリーブ核から小脳皮質に投射しており、プルキンエ細胞の未熟な細胞突起に蔦が絡み付くように進展しながら、少数のシナプスを形成している(Chedotal and Sotelo, 1992; Sugihara, 2005)。生後 3 日齢(P3)までは、5 本以上の登上線維が 1 つのプルキンエ細胞を支配しているが、登上線維間に明らかな機能差はない(Hashimoto and Kano, 2003)。P4 頃よりプルキンエ細胞の細胞体に多くの登上線維シナプスが集簇することで細胞周囲巣を形成する(Sugihara, 2005)。同時期に 1 本の登上線維が活動依存的に機能的強化を受けるようになる(Hashimoto and Kano, 2003; Bosman et al., 2008; Ohtsuki and Hirano, 2008; Kawamura et al., 2013)。強化を受けた 1 本の「勝者」登上線維は、支配領域を拡大し始め、P9 以降に形成された樹状突起へ移動を始め(Hashimoto et al., 2009a; Carrillo et al., 2013; Ichikawa et al., 2016)。また、細胞体シナプスも一過性に維持され、樹状突起への移動開始後の数日間を残存している。こうした細胞体にとどまる「敗者」登上線維シナプスの刈り込みは、生後 2 週目以降に増加する抑制性のバスケット細胞シナプスや(Nakayama et al., 2012; Ichikawa et al., 2011)、平行線維シナプス(Altman and Bayer, 1997; Hashimoto et al., 2009b)の活動が重要であることがわかっている。したがって登上線維-プルキンエ細胞投射系は、シナプスの形成、強化、そして除去という段階を経て精緻化され、P21 頃までに「勝者」登上線維による単一支配が確立する(Hashimoto and Kano,

2005)。多重支配が残存したままの成体マウスでは、協調運動や運動学習に障害をきたすことから(Chen et al., 1995; Offermanns et al., 1997; Kano et al., 1998)、単一支配化は正常な運動制御の重要な基盤であると考えられる。

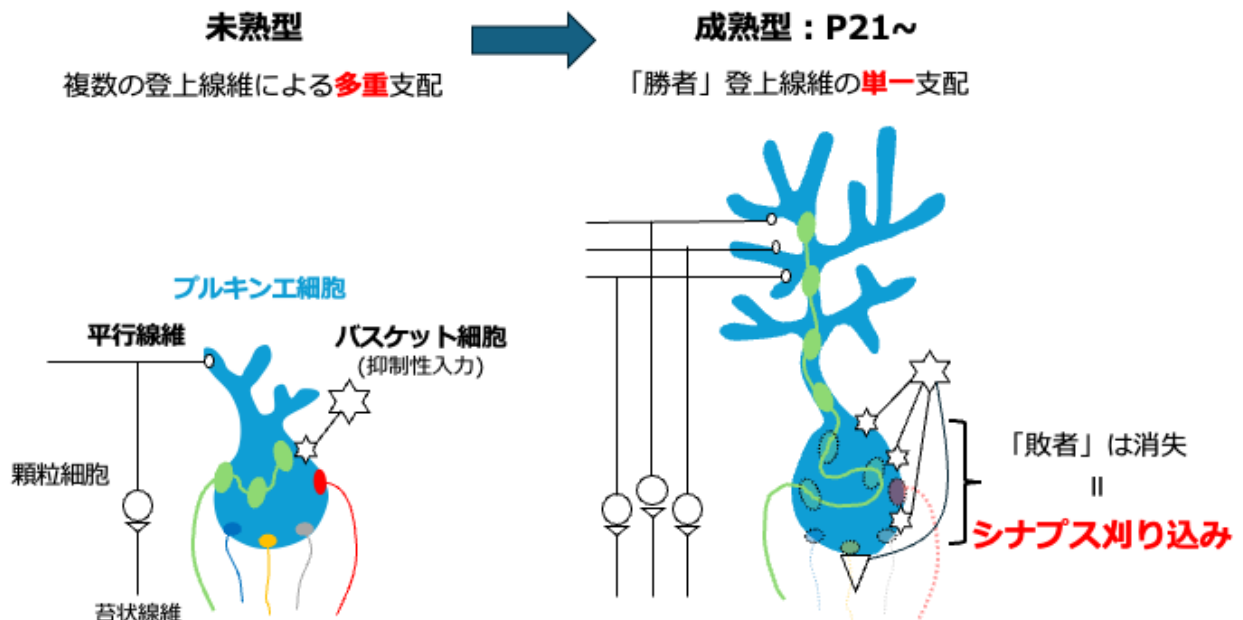


図 1. プルキンエ細胞とその入力線維の生後発達

プルキンエ細胞は小脳皮質で唯一の出力ニューロンであり、登上線維および平行線維の 2 種類の興奮性入力を受ける。また、バスケット細胞などによる抑制性入力も受ける。生後間もない段階では、複数の登上線維による多重支配を受けている。その後、強化された「勝者」登上線維のみが樹状突起へ移動し残存するが、細胞体にとどまるその他の「敗者」登上線維は弱められ、生後 21 日目頃までに除去される。

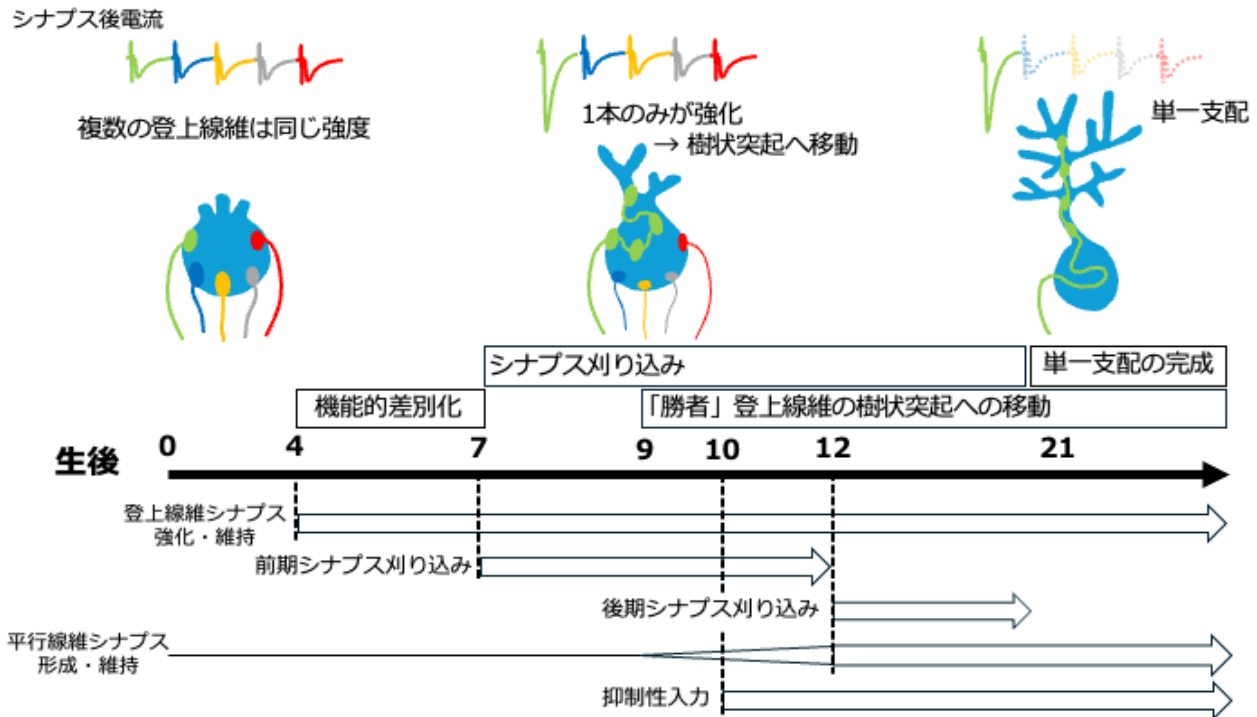


図 2. 「勝者」登上線維による単一支配の確立過程

登上線維の多重支配から単一支配への移行は段階的に進む。生後初期に登上線維間の競合が開始する。強化された「勝者」登上線維は、P9 以降に樹状突起への移動を始める。その後、平行線維シナプスや抑制性シナプスの活動により、余剰シナプスの刈り込みが進行し、登上線維の単一支配が確立する。

単一支配の確立過程のうち、生後 2 週以降に生じるシナプス刈り込みについては特に解明が進んでいる(Kano et al., 2018)。しかし、「勝者」と「敗者」への選別や分化の過程については不明な点が多く残されている。例えば電気生理学解析により、樹状突起へ移動した後(P11–P14)の伝達物質の放出効率は、「敗者」よりも「勝者」の登上線維終末で高いことが明らかとなっている(Hashimoto and Kano, 2003)。しかし、シナプス後部の分化の差異については不明である。また、Carrillo ら(2013)は、生体マウスを用いた実験により、樹状突起に移動した「勝者」登上線維をレーザーで切除しても、「敗者」は樹状突起へ移動できないことを報告している。この結果からは、樹状突起への移動自体が、「勝者」登上線維に不可逆的な優位性をもたらす可能性が示唆された。しかし、「勝者」の機能的強化が、シナプス構造や分子発現などの解剖学的強化を伴うかどうかについては明らかになっていない。本研究では、野生型マウスで「勝者」登上線維が樹状突起へ移動する時期を中心に、「勝者」と「敗者」登上線維シナプスの解剖学的分化過程について、主要なシナプス機能分子発現およびシナプス微細構造の観点から組織学的に解析した。

方法

1. 動物

本研究は「国立大学法人北海道大学 動物実験に関する規程」を遵守し実施した(承認番号: 19-0111、24-0054)。主に P7, P9, P10, P12, P14, P15, P21 の野生型 C57BL/6J マウス(Jackson Laboratory, USA)を使用した。一部の予備実験には、Igsf9 遺伝子プロモーター下で EGFP を下オリーブ核と登上線維に発現する Igsf9-EGFP マウス [Mutant Mouse Resource and Research Center, USA; stock number 030804-UCD; RRID:MMRRC_030804-UCD] を使用した。なおこの系統は Crl:CD1 マウスと C57BL/6J マウスの交配により維持し、ヘテロマウス(P7, P8, P9)を実験に使用した。

2. 一次抗体

以下の抗体を使用した。Alexa 488, Bassoon, calbindin, CAST1, EGFP, Munc13-1, pan-AMPA, PSD-93, PSD-95, RIM1/2, Shank2, Cav2.1, VGluT2, VIAAT の各分子に対する一次抗体を濃度 1 µg/mL で使用した。各一次抗体の詳細は、以下の表 1 に示す。

表 1. 免疫組織化学に使用した一次抗体の詳細 (アルファベット順)

分子名	抗原のアミノ酸領域 会社(カタログ番号)	#NCBI/RRID	動物 種	特異性	参考文献
Alexa488	Invitrogen(A-11094)	AB_221544	Rb	IB	
Bassoon	Enzo Life Science (ADI-VAM-PS003-D)	AB_11181058	Mo		
	abcam (ab82812)	AB_165845	Mo	IB	
calbindin	1–261 aa	NM009788/ AB_2571569 AB_2571568	Go, Rb	IB	Nakagawa et al., 1998
CAST1	113–161 aa	NM178085/ AB_2571671	Gp	IB	Uchigashima et al., 2016
Cav.2.1	361–400 aa	U76716/ AB_2571851	Gp	KO	Miyazaki et al., 2012
EGFP	1–238 aa	YP002302326/ AB_2491093	Rb	KO	Takasaki et al., 2011
Munc13-1	Synaptic Systems (126103)	AB_887733	Rb	KO	
pan-AMPA	727–745 aa	X57497/ AB_257161	Gp	IB/HEK	Fukaya et al., 2006
PSD-93	347–413 aa	NM022282/ AB_2571834	Rb	IB	Fukaya and Watanabe, 2000

PSD-95	1–62 aa	D50621/ AB_292079	Gp, Rb	IB, IH	Fukaya and Watanabe, 2000
RIM1/2	Synaptic Systems (140217)	AB_292494	Rt	KO	
Shank2	1464–1476 aa	NM001081370/ AB_2571839	Rb	IB/HEK	Matsuda et al., 2010
VGluT2	559–582 aa	BC038375/ AB_2571620 AB_2571621	Go, Gp	IB	Miyazaki et al., 2003
VIAAT	31–112 aa	BC052020/ AB_2571623	Go	IB, IH	Miyazaki et al., 2003

3. 光学顕微鏡法

3.1 順行性トレーサーによる登上線維蛍光標識

2%イソフルランによる吸入麻酔下で、延髄背側からのアプローチによりトレーサー注入実験を行った(Miyazaki and Watanabe, 2011; 図 3)。順行性蛍光トレーサーとして、PBS に溶解した 10%DA488 溶液 (Invitrogen, USA)を使用し、これを 2–3 μ L 充填したガラスピペット (G-1.2, Narishige, Japan)を、両側下オリーブ核の間(P7, P9)もしくは右側の下オリーブ核(P10以降)へ刺入した。シリンジポンプ(Micro4, World Precision Instruments, USA)を用いて計 80 nL の溶液を 3 分間かけて投与した。順行性軸索輸送に必要な期間を確保するため、注入後 2–5 日間の生存期間の後、多重免疫染色に使用した。なお DA488 の標識シグナルは、Alexa488 に対する一次抗体を用いた免疫染色により検出した。

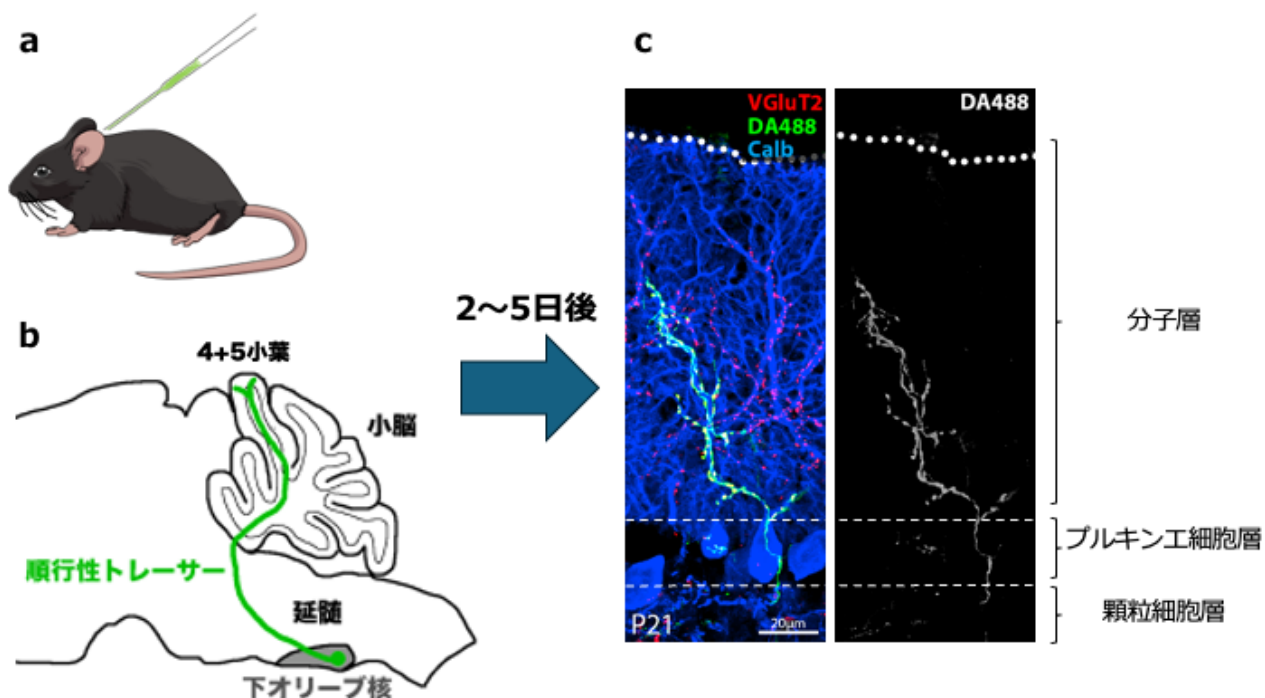


図 3. 順行性蛍光トレーサーによる登上線維標識法の概要

(a) ガラスピペットに充填した微量の順行性蛍光トレーサー (DA488) を背側アプローチ法にてマウスの下オリーブ核へ注入した。(b) 下オリーブ核へ注入した DA488 は、順行性軸索輸送により登上線維へ運ばれ軸索終末が蛍光標識される。(c) 2-5 日後、灌流固定し蛍光免疫染色を実施した。画像は P21 マウスの一例である。左画像は登上線維終末マーカーの VGlut2 (赤)、DA488 (緑)、プルキンエ細胞の細胞質マーカーである calbindin (青) の三重蛍光染色像を示す。右画像は二値化した DA488 を示す。破線は小脳皮質の分子層、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層の各境界線を、点線部は軟膜を示す。

3.2 蛍光抗体法

広く使われている組織固定液は 4%パラホルムアルデヒド溶液だが、タンパク質架橋形成や組織収縮により抗体の抗原へのアクセスが制限され、多くのシナプス分子の検出が困難になることが知られている (Fukaya and Watanabe, 2000)。この問題を解決するため、本研究ではシナプス分子の検出効率を劇的に改善するグリオキサール固定液を用いて染色を行った (Richter et al., 2018; Konno et al., 2023)。マウスはペントバルビタール 100 mg/kg (腹腔内投与) による深麻酔下で経心的灌流固定を行った。生理食塩水を 1 分間程度灌流した後、10 分間かけて 60 mL のグリオキサール固定液 [9%グリオキサール (Merck, Germany)/8%酢酸、pH 4.0] (Konno et al., 2023) を灌流した。取り出した脳を同固定液に浸漬する後固定を 4 °C で 1 晩行った後、30%スクロース溶液 [0.1 M リン酸緩衝液(Phosphate Buffer, PB, pH 7.2)] に浸漬し、O.C.T.コンパウンド (Sakura Finetek Japan, Japan) に包埋し超低温槽(−80°C) 内で凍結させた。クライオスタット (CM1860, Leica Microsystems, Germany) を用いて 50 μm 厚の小脳虫部の矢状断切片を作成し、試験管を用いた浮遊法による蛍光免疫染色を行った。切片の洗

浄ならびに抗体希釈には、0.1% Triton X-100 を添加した PBS (pH 7.4)を使用し、処理は全て室温で行った。10%正常ロバ血清(Jackson ImmunoResearch, USA)によりブロッキングを 20 分間行い、一次抗体の混合溶液を一晩反応させた後、動物種特異的な蛍光標識二次抗体 (DyLight 405, Alexa 488, Cy3, Alexa 647, 全て 1:200 希釈)の混合液で 2 時間反応させた (Jackson ImmunoResearch, USA; Thermo Fisher Scientific, USA)。PBS で洗浄した後、アミノシランコートスライドガラス(Matsunami, Japan)に貼付し、切片の乾燥を確認後に褪色防止用封入剤である ProLong Glass (Thermo Fisher Scientific, USA)を用いて封入した。

3.3 蛍光免疫染色画像の撮影

撮像は油浸レンズ UPlanXApo(60/1.42, Evident, Japan)と 405, 473, 559, 547 nm のダイオードレーザーを搭載した共焦点レーザー顕微鏡(FV1200, Evident, Japan)を用いて行った。小葉間の発達の違いを考慮し(Sugihara, 2005)、撮影対象は 4+5 小葉に限定した。DA488 で標識された登上線維の投射経路全体が追跡できるように、切片の z 軸方向に 0.5 μm 間隔でおよそ 2–5 μm 厚分を連続撮影した。すべての画像は 1024 $\times$ 1024 pixel にて撮影した。シナプス前終末およびシナプス後部の足場タンパク発現解析では、3 倍のデジタル拡大を併用して撮影した。

3.4 蛍光免疫染色画像の定量解析

MetaMorph ソフトウェア(Molecular Devices, USA)を用いて解析した。登上線維終末の分子マーカーである VGluT2 陽性領域は、同ソフトウェア内の“Inclusive Threshold”および “Create Regions Around Objects”機能により半自動的に検出した。なお、樹状突起幹周囲に認められる粗大な登上線維終末のみを解析対象とし、発達期小脳皮質でプルキンエ細胞樹状突起幹の間のニューロピル領域に認められる平行線維終末における小さく均一な陽性反応(Miyazaki et al., 2003)は除外した。

樹状突起に移動した標識物質陽性の登上線維終末の相対的な位置(高さ)は、以下の 2 つの距離の比 $A/B \times 100(\%)$ として算出した。A = 樹状突起基部(細胞体直径の 1/3 未満に細くなる地点)から最も遠位の DA488/VGluT2 二重標識終末までの最短距離、B = 分子層の厚さ(すなわち、樹状突起基部から最も遠位まで伸びている樹状突起枝末端までの最短距離)。

登上線維終末のうち最も高い位置に到達している終末を持つ登上線維を「勝者」登上線維と定義した。シナプス発現分子の定量解析では、さらにこれが細胞体から樹状突起にかけて連続して追跡できたものだけを解析対象とした。こうした細胞での DA488/VGluT2 二重標識終末(d-CF)を「勝者」とし、それ以外の標識物質陰性終末 (VGluT2 一重標識陽性終末, s-CF) を「敗者」とした。さらに終末を形成部位に基づき (a)「勝者」線維の樹状突起シナプス、(b)「勝者」線維の細胞体シナプス、(c)「敗者」線維の細胞体シナプス、の三種類に分類した (図 4)。なお、DA488/VGluT2 二重標識終末でも、細胞体から樹状突起まで連続して追跡できないものについては、解析対象から外した。

この 3 群のシナプスに関し、大部分の「勝者」が細胞体に存在する P7–P9、樹状突起に移動する P10–P12、樹状突起への移動がほぼ完了する P13–P15 の 3 ステージに分けて解析を行

った。

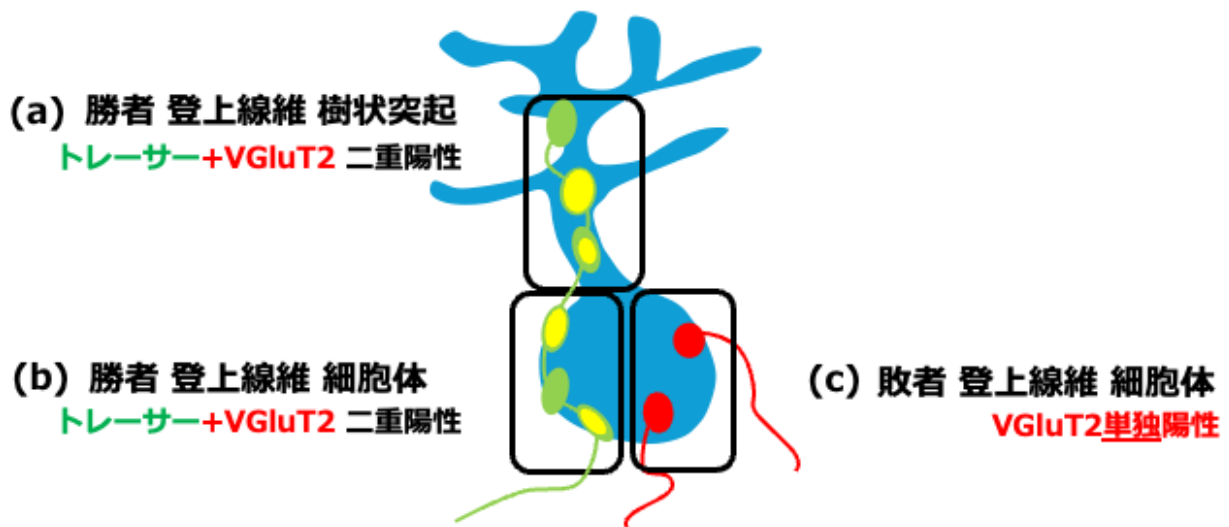


図 4. 登上線維終末の分類

登上線維終末を、線維の由来と終末の位置により 3 種類に分類した。本研究では「勝者」登上線維が蛍光標識されている例を解析対象とした。「勝者」登上線維シナプスは緑色もしくは黄色、「敗者」登上線維シナプスは赤色の登上線維終末として識別できる。

二値化した個々の VGluT2 陽性領域を ROI と設定した。ROI の外縁を手動で輪郭を描き、その中に含まれる AMPA 受容体、RIM1/2、PSD-95 の平均蛍光強度(単位は A.U.)を計測した。ただし、z-stack した画像枚数が解析画像により異なることや撮影した切片の深さに応じた抗体浸透性の違いなどにより、解析画像ごとの蛍光強度のばらつきが大きいことを考慮する必要がある。そこで、本実験では z-score による各 ROI の蛍光強度の標準化を行い、この差異を、3 つのシナプス群間で比較した。1 つのプルキンエ細胞に設定したすべての ROI の平均蛍光強度を 0 とし、これを基準に各 ROI の z-score を算出した(Harris et al., 2022; 図 5)。

z-score の計算式は以下の通りである。

$$z = (X - \mu) / \sigma$$

X = 各 ROI の蛍光強度 (A.U.)

μ = 各プルキンエ細胞の全ての ROI の平均蛍光強度の平均値 (A.U.)

σ = 各プルキンエ細胞の全ての ROI の平均蛍光強度の標準偏差

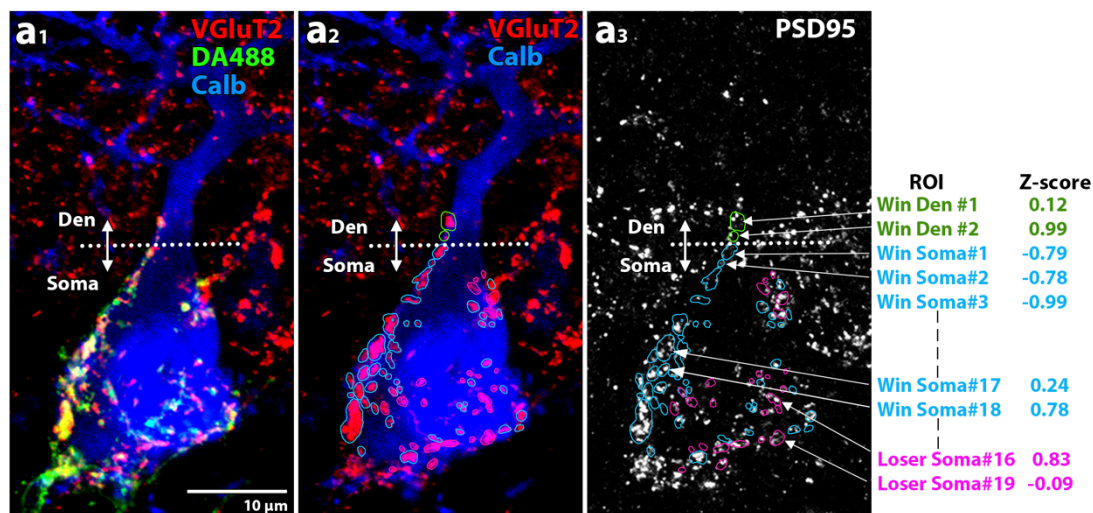


図 5. z-score によるシグナル強度の標準化

calbindin(青)、DA488(緑)、VGluT2(赤)、PSD-95(白)の四重蛍光免疫染色画像(P7)。点線は樹状突起と細胞体の境界を示す。VGluT2 陽性領域を囲んだ領域を ROI に設定し、各 ROI に含まれる PSD-95 蛍光強度(A.U.)を測定した。それぞれの ROI の輪郭は樹状突起の「勝者」(緑)、細胞体「勝者」(青)、細胞体「敗者」(マゼンタ)で示す。1つのプルキンエ細胞上の ROI の蛍光シグナル(X)から μ , σ と z-score を算出する。各プルキンエ細胞の全ての ROI の z-score の合計は 0 となる。画像内の点線はプルキンエ細胞樹状突起と細胞体の境界線を示す。

3.5 統計解析

統計解析は GraphPad Prism 10 ソフトウェア(GraphPad Software, USA)を用いて行った。D'Agostino & Pearson, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov の各検定により、すべてのデータは正規分布に従わないことを確認したため、3つのシナプス群の標準化蛍光強度の差異をノンパラメトリックの Kruskal-Wallis 検定により比較した。 $p < 0.05$ を有意差ありと判定し、有意差が出た場合は Dunn 検定による多重比較を行った。

4. 電子顕微鏡法

4.1 包埋前免疫電子顕微鏡法

1 匹のマウス (P12) に対し、ペントバルビタール 100 mg/kg (腹腔内投与) による深麻酔下で、0.1%グルタルアルデヒド添加 4%パラホルムアルデヒド溶液/0.1 M PB (pH 7.2) を 60 mL 使用し 10 分間かけて経心的灌流固定を行った。抜脳後同固定液に 2 時間浸漬の後、2% アガロースゲルに包埋しビブラトーム (VT1000S, Leica Microsystems, Germany) を用いて作成した小脳虫部の矢状断切片 (50 μm 厚) を、ガラスシャーレを用いた浮遊法により免疫反応を行った。抗原抗体反応および洗浄には、0.1% Tween 20 を添加した PBS を使用し、操作は全て室温で行った。10%正常ヤギ血清 (Nichirei Bioscience Corporation, Japan) による 20 分間のブロッキング後、モルモット VGluT2 抗体溶液と一晚反応させた。続けて、1.4 nm 金コロイド標識モルモット IgG 抗体 (1:100; Nanoprobes, USA) を 4 時間反応させた。HEPES 緩衝液 (50 mM HEPES、200 mM スクロース; pH 8.0) で洗浄した後、銀増感試薬 (AURION R-Gent SE-EM; AURION, Netherlands) で 30 分間の増感反応を行った。洗浄後、1%四酸化オスミウム、2%酢酸ウランで 15 分ずつ反応させ、段階的に濃度上昇させたエタノールによる脱水と、n-ブチルグリシジルエーテルで透徹後、エポキシ系樹脂の Epon812 に包埋し、60 $^{\circ}\text{C}$ で 48 時間の重合硬化反応を行った。ウルトラミクロトーム (UC7, Leica Microsystems, Germany) およびダイヤモンドナイフ (Diatome, Switzerland) を用いて超薄切片を作成した。ダイヤモンドナイフのポート水面に浮かぶ切片の干渉色をもとに、80 nm 程度の厚みになるよう調整した (Meek, 1976)。リボン状に連なった連続切片を、導電性のある酸化インジウム錫被覆ガラススライド (IT5-111-50, NANOCSS, USA) に貼付し、2%酢酸ウランおよびクエン酸鉛による電子染色を行った。洗浄後、導電性カーボンペースト (Colloidal Graphite, Ted Pella Inc, USA) を連続切片リボンの周囲を囲むように塗布した。

4.2 画像撮影および三次元再構築、シナプス形態解析

後方散乱電子検出器を搭載した走査型電子顕微鏡 (SU8240, Hitachi High Technologies, Japan) を用いて、1.0 kV の加速電圧および 10,000 倍の倍率にて撮影した。プルキンエ細胞の細胞体上部～樹状突起基部までの範囲で得られた計 210 枚の画像を、オープンソースソフトウェアの TrakEM2 を用いて整列した後 (Cardona et al., 2012; NIH Image J, FIJI の plug-in)、Image Pro 10 ソフトウェア (Media Cybernetics, USA) にロードし、手動で各画像の登上線維およびプルキンエ細胞断面の輪郭を描き、三次元再構築画像を生成した。スパイン体積は、各画像でトレースしたスパインの断面積 (μm^2) に切片の厚み (0.08 μm) を乗じ、それらを合計して算出した (μm^3)。PSD 面積は、各画像でトレースした PSD 長 (μm) に切片の厚みを乗じ、それらを合計して算出した (μm^2)。

4.3 統計解析

シナプス分子発現解析と同様、GraphPad Prism 10 ソフトウェアを用いて解析を行った。「勝者」樹状突起と細胞体シナプス、「敗者」シナプスの間で、単一スパインあたりの PSD 面積 ($n = 69, 25, 15$)、スパイン体積 ($n = 69, 17, 12$)、1 つのスパインあたりに形成するシナプ

ス(PSD)の数($n = 46, 13, 6$)の差異は、データが正規分布に従わないことを確認したため、Kruskal-Wallis 検定により比較検討した。 $p < 0.05$ を有意差ありと判定し、有意差が出た場合は Dunn 検定による多重比較を行った。なお、同一のスパイン上で PSD が一部途絶している perforated PSD (Lüscher et al., 2000)を認めた場合は、それらの合計面積を単一スパインあたりの PSD 面積とみなした。さらに 3 群それぞれについて、個々のスパイン体積と各シナプスの PSD 面積の関係をプロットした散布図を作成し、これを元に算出された単回帰直線の傾きの差異について ANCOVA を用いて検討した。 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。

結果

1. 「勝者」と「敗者」登上線維への分化過程に関する組織学的検討

まず野生型 C57BL/6J 系統マウスの小脳(P9, P12, P15)を使って calbindin と VGluT2 二重蛍光免疫染色を行い、発達に伴う VGluT2 陽性登上線維終末の分布変化を追跡した(図 6)。P9 では細胞体に多くの VGluT2 陽性終末を認めたことから、多くの登上線維終末は細胞体でシナプスを形成していることが示唆された(図 6a)。一方、P12 から P15 の間に、細胞体上の終末の数が減り、反対に樹状突起上の終末の数が急増していることがわかった(図 6b, c)。しかし、この実験からは二重免疫染色のみでは「勝者」と「敗者」など異なる登上線維を識別できないことが分かった。したがって本研究では DA488 順行性トレーサーを用いた登上線維標識により、「勝者」と「敗者」の登上線維終末を区別できる細胞に限定し、P7 から P21 にかけてより詳細な解析を行った。

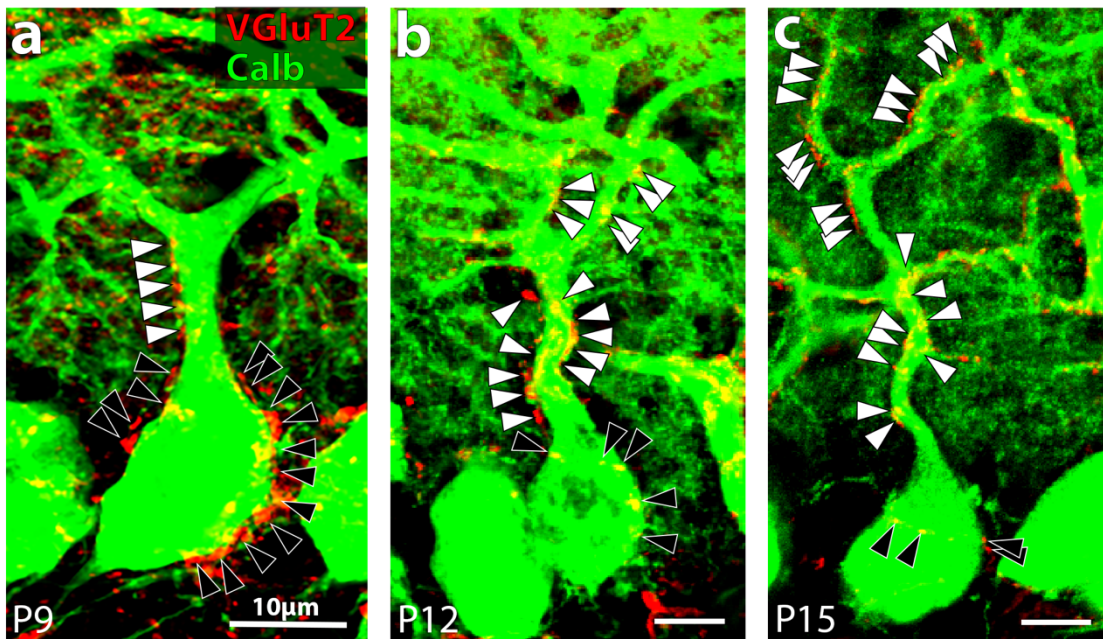


図 6. 登上線維終末の分布様式の発達変化

P9(a)、P12(b)、P15(c)における VGluT2(赤)と calbindin(緑)の二重蛍光免疫組織像。登上線維終末は赤色もしくは calbindin の緑色との融合色である黄色の斑状反応として認められる。白と黒の矢頭はそれぞれ樹状突起と細胞体の登上線維終末を示す。

なお、P7–P9 マウスについては、トレーサー投与処置自体による神経変性や死亡、母マウスによる食殺が起きたため、実験効率の改善を図る目的で試験的に Igsf9-EGFP マウス(Pätz et al., 2018)を使用した。しかし同じ小脳領域を観察したにも関わらず、登上線維の発達に大きな違いが見られた(図 7)。これはマウス系統の違いによる相違である可能性が高いと考えられたため、一部の予備実験を除き、野生型 C57BL/6 マウス系統を用いた。

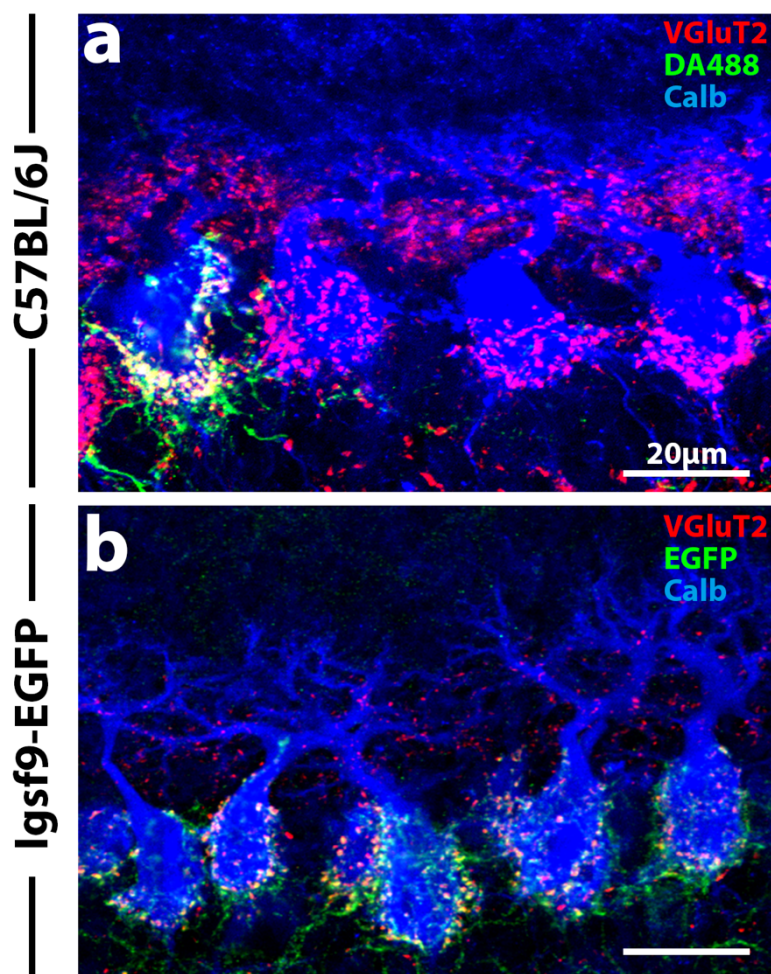


図 7. P7 の野生型 C57BL/6J マウスと Igsf9-EGFP マウスの発達の比較

C57BL/6J マウス(a)と Igsf9-EGFP マウス(b)における VGlut2(赤)、DA488 もしくは EGFP(緑)、calbindin(青)の三重蛍光免疫染色像。(a)では樹状突起へ移動している標識登上線維は稀であった。また、プルキンエ細胞樹状突起の分岐や形状も未熟であった。一方(b)では、(a)よりも「優勢」な登上線維の伸長距離が長く、プルキンエ細胞の樹状突起も分岐・伸長しており、同じ日齢でも発達が進んでいる可能性が高い。

次に DA488 による登上線維標識を行ったマウスを用いて DA488、calbindin、VGlut2 に対する三重蛍光免疫染色により検討を行った(図 8)。まず、樹状突起に到達している d-CF 終末を持つ登上線維を「勝者」とし、その終末が到達している高さについて定量評価した(図 8a, d, g, h, k)。「勝者」登上線維の d-CF の最高到達点の高さを、樹状突起基部から最も遠位にある樹状突起先端までの垂直距離に対する割合(%)として算出した。この高さは発達とともに徐々に上昇し、P15 で 70%弱となりプラトーに達していた(図 8l)。これは、過去の研究結果とおおよそ一致していた(Hashimoto et al., 2009a)。

次に終末の分布について検討した。P7 では、ごく一部のプルキンエ細胞の樹状突起上にわずかな数の d-CF が観察された一方、d-CF と s-CF はともに細胞体の底部に多く集簇して

いた(図 8a-c)。P9 では、多くのプルキンエ細胞の樹状突起上に d-CF を認められるようになったものの、まだ多くの終末は細胞体に集中していた(図 8d-f)。P12 以降になると、樹状突起上の d-CF 終末の数は急増し、細胞体上の d-CF および s-CF 終末は双方とも数が急減していた(図 8g-j)。そして P21 には細胞体上の終末はほぼ認められなくなり、形態学的には樹状突起上の d-CF を有する「勝者」登上線維による単一支配が完成していた(図 8k)。

次に、発達に伴う樹状突起および細胞体に分布する登上線維終末の割合を検討した。しかし、発達段階の初期では小さな登上線維終末の数の計測が困難であり、正確な評価ができない可能性が考えられた。そのため、1つのプルキンエ細胞全体に観察される終末の面積合計に対する樹状突起と細胞体それぞれの領域全体の終末面積割合(Fraction of CF terminals；図 8m, n)を算出することで評価を行った。細胞体では、P9 までは終末が全体の 80%以上を占めているが、P10 以降はその割合が急減し、P21 には消失した。反対に樹状突起では登上線維の相対的高さの上昇に伴い、終末面積の割合が増加していたことがわかった(図 8m)。さらに、細胞体周囲の終末を詳細に評価したところ、d-CF 終末の面積割合は P10 以降に、s-CF 終末の面積割合は P12 以降にそれぞれ急減していた(図 8n)。

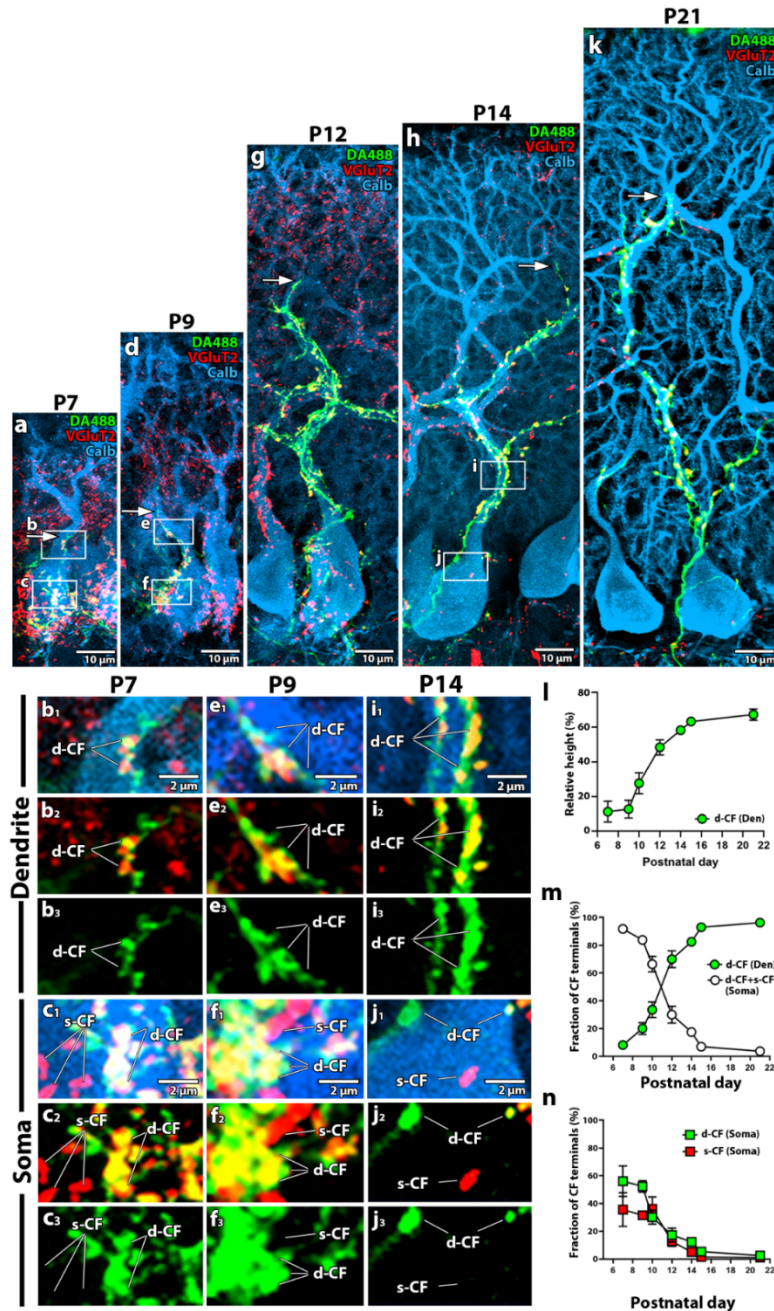


図 8. 「勝者」および「敗者」登上線維終末の分布

(a-k) P7(a-c)、P9(d-f)、P12(g)、P14(h-j)、P21(k)の各段階における VGlut2(赤)、DA488(緑)、calbindin(青)の三重蛍光免疫染色像。(a)、(d)、(h)の画像内に示した四角の領域は、拡大像として(b, c)、(e, f)、(i, j)にそれぞれ示す。d-CF は VGlut2・DA488 二重陽性の登上線維終末、s-CF は VGlut2 単独陽性登上線維終末を表す。(l) 分子層における樹状突起 d-CF 終末の相対的な位置(高さ)の発達変化。(m) プルキンエ細胞の樹状突起と細胞体上に分布する登上線維終末の内訳の発達変化。樹状突起上の d-CF 終末(緑)と、細胞体上の d-CF および s-CF 終末(白)を示す。(n) 細胞体上に分布する d-CF 終末(緑)と s-CF 終末(赤)の内訳の発達変化。(l)では各段階あたり 9-13 本の登上線維を計測した(2-3 匹ずつのマウスから 3-7 枚の z-stack 画像を取得)。(m)と(n)は、各段階あたり 5 個のプルキンエ細胞を計測した(2-3 匹ずつのマウスより 5

枚の z-stack 画像を取得)。データはすべて平均 $\pm$ SEM で表示している。

2. シナプス分子発現の検討

次に、AMPA 型グルタミン酸受容体、RIM1/2、PSD-95 の 3 種類のシナプス分子発現について、「勝者」樹状突起シナプス、「勝者」細胞体シナプス、「敗者」シナプスの 3 群間で比較した。なお、使用したマウス(プルキンエ細胞)の数および解析したシナプスの数は表 2 の通りである。

表 2. シナプス分子発現解析を行ったマウス(プルキンエ細胞)およびシナプスの数

		P7-P9	P10-P12	P13-P15
AMPA 受容体	マウス (プルキンエ細胞)	3 (8)	5 (10)	5 (8)
	シナプス	167-102-51	743-136-112	930-30-21
RIM1/2	マウス (プルキンエ細胞)	3 (8)	3 (10)	3 (8)
	シナプス	222-159-141	665-93-80	1075-64-38
PSD-95	マウス (プルキンエ細胞)	3 (8)	2 (5)	2 (5)
	シナプス	197-118-100	530-90-28	1063-26-19

シナプスの数は、「勝者」樹状突起シナプス-「勝者」細胞体シナプス-「敗者」シナプス、の順に記載している。

2.1 AMPA 受容体

AMPA 受容体は興奮性シナプス後電流の発生に関わり、シナプス後部の強度を規定するイオンチャネル型グルタミン酸受容体である。まずは予備実験として、トレーサー非標識マウス(P9, P12, P15)に対し、4 種類の AMPA 受容体サブユニットに共通する抗原エピトープに結合する pan-AMPA 抗体を用いて(Fukaya et al., 2006)、calbindin 抗体、VGluT2 抗体とともに三重蛍光免疫染色を行い、平均蛍光強度(A.U.)を比較した(図 9)。P9 では樹状突起シナプスと細胞体シナプスの間で AMPA 受容体シグナル強度に差異は認められなかった(図 9a-c, j)。しかし、その後の P12 と P15 では樹状突起シナプスの平均蛍光強度が細胞体よりも有意に高く、樹状突起領域で AMPA 受容体発現が増加していることを確認した(図 9d-i, k-l)。

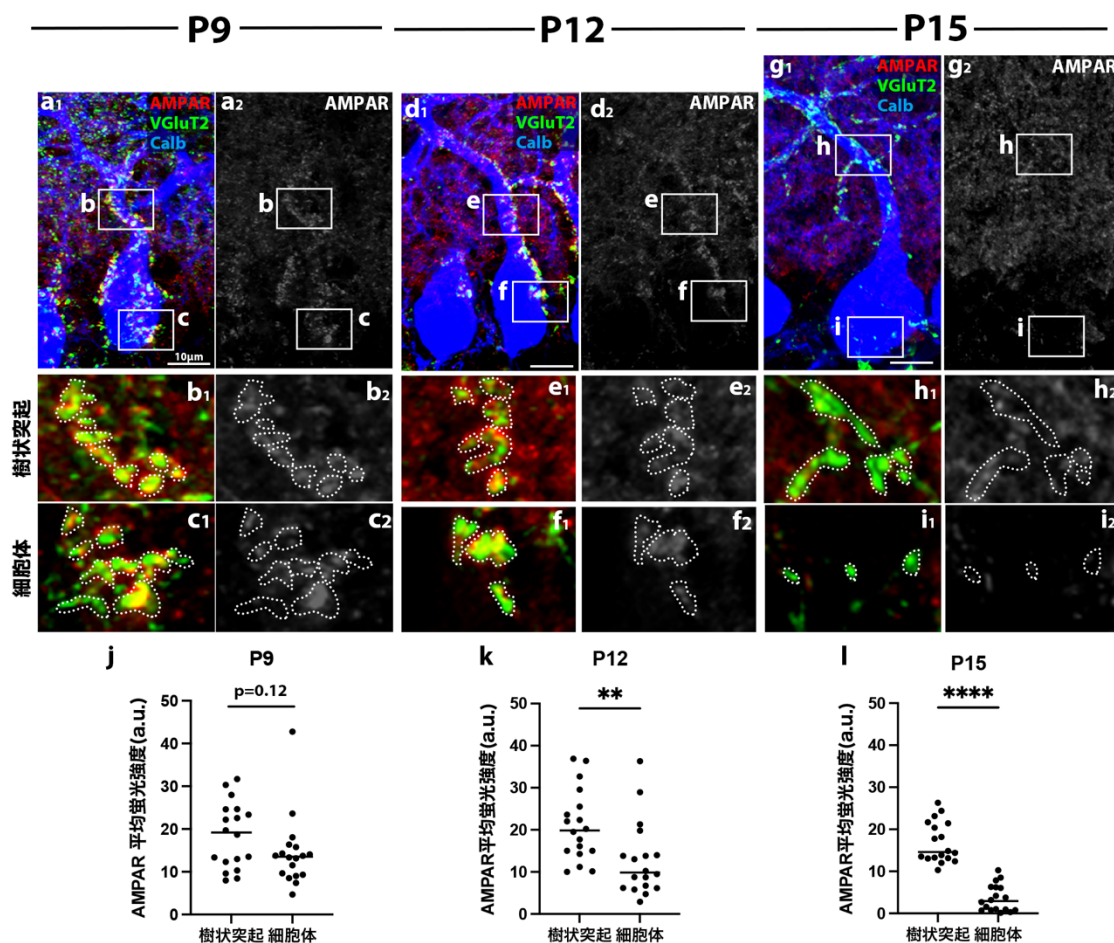


図 9. 樹状突起と細胞体シナプスにおける AMPA 受容体のシグナル強度の比較

P9(a-c)、P12(d-f)、P15(g-i)における AMPA 受容体(赤)、VGluT2(緑)、calbindin(青)による三重蛍光免疫染色像。(a), (d), (g)の画像内に示した四角の領域は、拡大像として(b, c), (e, f), (h, i)にそれぞれ示す。また、AMPA 受容体シグナルを二値化した画像を(a₂-i₂)に示した。結果グラフを、P9 は(j)、P12 は(k)、P15 は(l)にそれぞれ示す。各グラフ中のバーは中央値を示す。** $p < 0.01$ 、**** $p < 0.0001$; Mann-Whitney 検定。

さらに終末の形成部位の違いに加えて線維の由来による発現差異についての検証を行うため、トレーサー標識マウスを用いて pan-AMPA、calbindin、DA488、VGluT2 に対する四重蛍光免疫染色により検討を行った(図 10)。P7-P9 では、観察された AMPA 受容体蛍光シグナルはどのシナプス群でも概して弱かった(図 10a-d)。P10-P12 では、「勝者」樹状突起シナプスでのシグナルがより明瞭となったが(図 10e-h)、「敗者」シナプスでのシグナルは弱かった。そして P14-P15 では、「勝者」樹状突起シナプスでさらにシグナルが強くなり、「勝者」細胞体シナプスでは弱くなっていた(図 10i-l)。3 群それぞれの平均 z-score(平均値 $\pm$ SEM)を算出したところ、P7-P9 では「勝者」細胞体シナプスが 0.37 ± 0.09 で最も高く、次いで「勝者」樹状突起シナプスの 0.08 ± 0.07 、最も低いのは「敗者」シナプスの 0.46 ± 0.14 であった(「勝者」細胞体 vs. 「勝者」樹状突起、 $p < 0.05$; vs. 「敗者」細胞体、 $p < 0.001$; Kruskal-Wallis 検定および *post hoc* Dunn 検定 ; 図 10m)。その後 P10-P12 では、「勝者」樹状突起シナプス

が 0.19 ± 0.06 で最も高くなった一方、「勝者」細胞体シナプスでは 0.50 ± 0.10 と減少し、「敗者」シナプスは 1.15 ± 0.10 と最も低いままであった(すべての比較で $p < 0.001$; 図 10n)。この序列は P14-P15 でも同様であり、「勝者」樹状突起シナプスで 0.06 ± 0.03 、「勝者」細胞体シナプスで -0.86 ± 0.19 、「敗者」細胞体シナプスで -1.62 ± 0.14 であった (「勝者」樹状突起 vs. 「勝者」細胞体、 $p < 0.001$; vs. 「敗者」細胞体、 $p < 0.05$) (図 10o)。

このことから、樹状突起への移動前では「勝者」樹状突起および細胞体シナプスでは AMPA 受容体の発現が増加しており、樹状突起への移動が進むにつれ「勝者」樹状突起シナプスでの発現がさらに促進されることがわかった。また、細胞体シナプスでは「勝者」と「敗者」ともに減少していくことが示唆された。

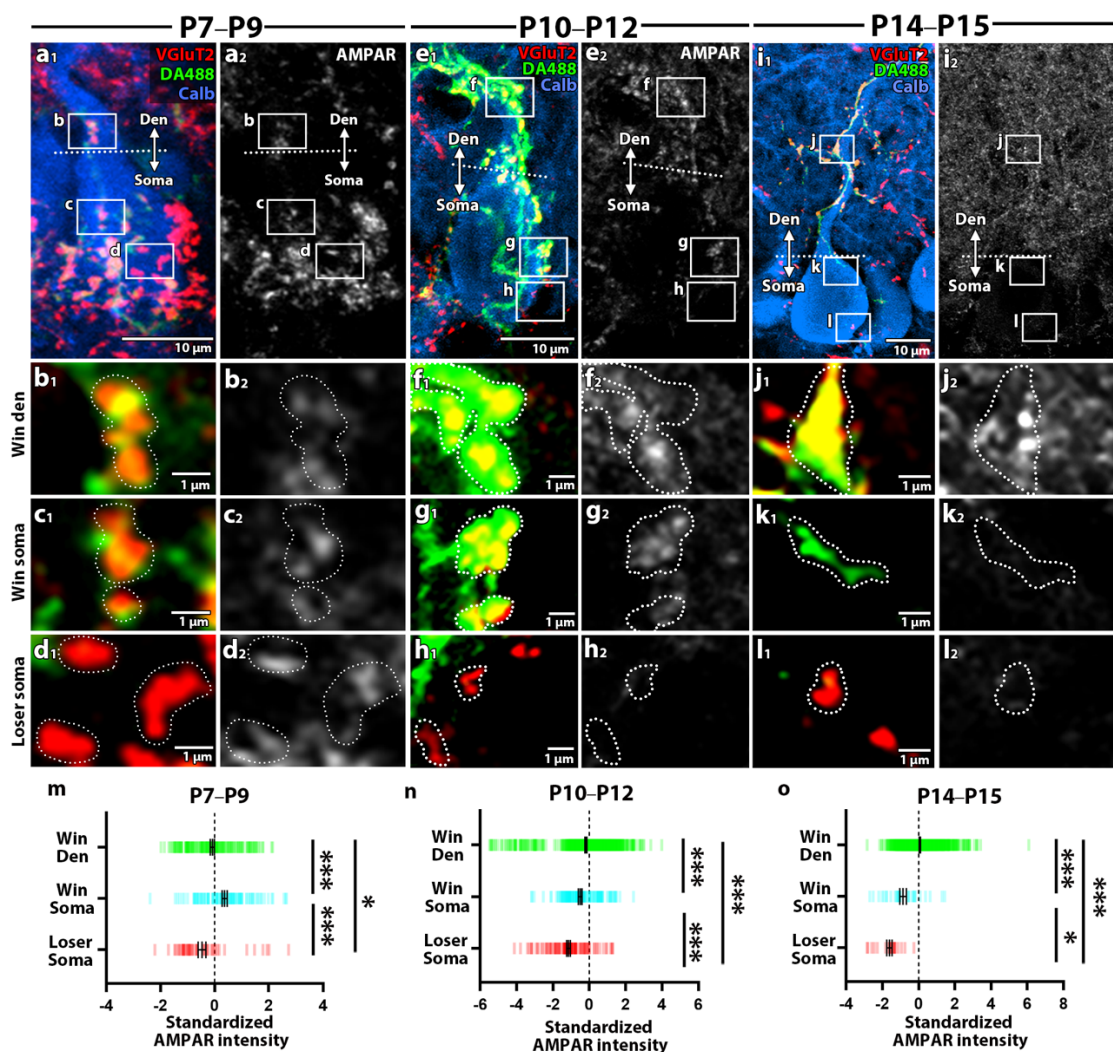


図 10.3 種類の登上線維-プルキンエ細胞シナプスにおける AMPA 受容体の発現

VGLUT2(赤)、DA488(緑)、calbindin(青)、pan-AMPA(白)の四重蛍光免疫染色により、AMPA 受容体の発現量を比較した。P7-P9 (a-d)、P10-P12 (e-h)、P14-P15 (i-l)のそれぞれにおいて、「勝者」樹状突起シナプス(b, f, j)、「勝者」細胞体シナプス(c, g, k)、そして「敗者」細胞体シナプス(d, h, l)の3群間の標準化蛍光強度を比較した。画像内の点線は、プルキンエ細胞樹状突起と細胞体の境界線を示す。結果グラフを、P7-P9 (m)、P10-P12 (n)、P14-P15 (o)にそ

れぞれ示す(平均値 $\pm$ SEM)。グラフ内の色付き符号(「勝者」樹状突起、緑;「勝者」細胞体、青;「敗者」細胞体、赤)は個々のデータ値を示す。 $*p < 0.05$ 、 $***p < 0.001$ 、Kruskal-Wallis 検定および *post hoc* Dunn 検定。

2.2 シナプス前終末

もう一つのシナプス強度の規定要素は、シナプス前終末からのグルタミン酸放出機能である。シナプス前終末において神経伝達物質が放出される特別な領域である活性帯(アクティブゾーン)では、シナプス小胞のアクティブゾーンへの集合から小胞内の神経伝達物質放出に至るまでの一連の過程が、様々なタンパク分子の相互作用によって制御される(図 11)。そこで次は、「勝者」樹状突起シナプス前終末での分子発現について検討した。まず予備実験として、P8 の Igsf9-EGFP マウスを用いて Bassoon、CAST1、Munc13-1、RIM1/2 の 4 つのアクティブゾーンタンパクの発現について検討を行った(図 12)。Bassoon(図 12a-c)および Munc13-1(図 12g-i)は、登上線維終末領域内に特異的なシグナルを認めなかった。一方、CAST1(図 12d-f)と RIM1/2(図 12j-l)では登上線維終末領域に一致したシグナルを認めたが、後者の方がより強かった。

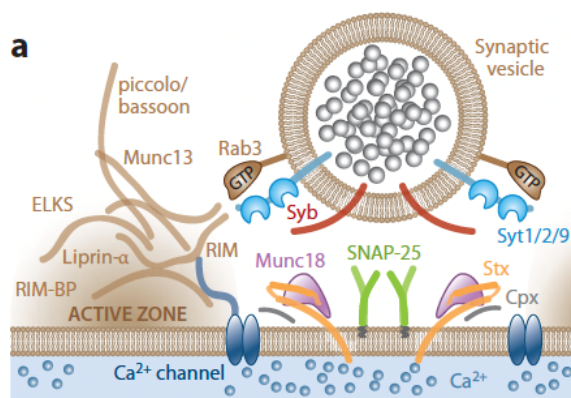


図 11. アクティブゾーンタンパク質

アクティブゾーンではシナプス小胞からの神経伝達物質放出に関わる様々な分子が局在する。図は Kaeser and Regehr(2014)より引用。

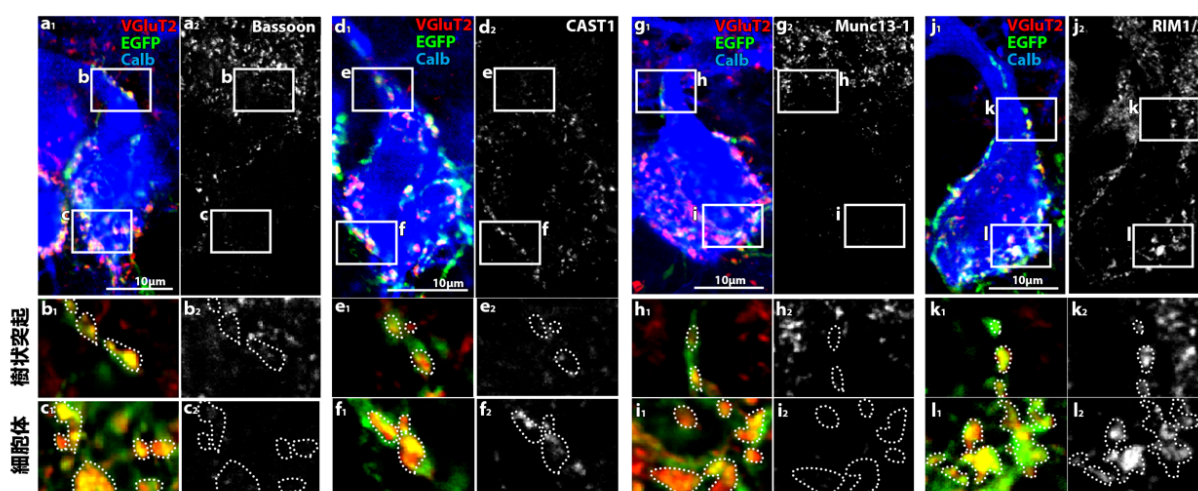


図 12. 各種アクティブゾーンタンパク分子の発現

VGluT2(赤)、DA488(緑)、calbindin(青)、アクティブゾーンタンパク分子(白)の四重蛍光免疫染色像(P8, Igsf9-EGFP マウス)。(a-c), Bassoon; (d-f), CAST1; (g-i), Munc13-1; (j-l), RIM1/2。(a), (d), (g), (j)の画像内にある四角の領域は、拡大像として(b, c), (e, f), (h, i), (k, l)にそれぞれ示す。また、各アクティブゾーンタンパク分子のシグナルを二値化した画像を(a₂-l₂)に示す。

また、Ca²⁺流入を担う P/Q 型 VDCC サブユニット Cav2.1 のシナプス前終末での局在解析も試みた。しかし、プルキンエ細胞側の強く明瞭な陽性反応に対し、神経終末側の陽性反応は弱く判別が困難であった(図 13)。よって、シナプス前終末の分子については RIM1/2 に絞り検討を進めることにした。

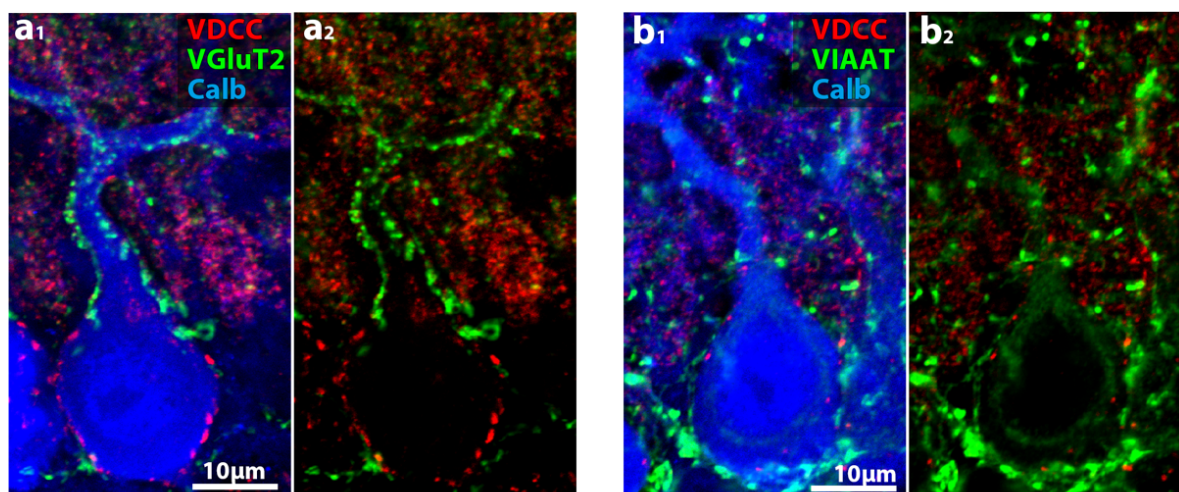


図 13. P/Q 型 VDCC サブユニット Cav2.1 の局在(P12)

(a) VDCC(赤)、VGluT2(緑)、calbindin(青)の三重蛍光免疫染色像。(b) VDCC(赤)、VIAAT(緑)、calbindin(青)の三重蛍光免疫染色像。

次にトレーサー標識マウスを用いて、calbindin、DA488、RIM1/2、VGluT2 に対する四重蛍光免疫染色により検討を行った(図 14)。P7-P9 の段階ですでに「勝者」樹状突起シナプスでのシグナル(図 14b)は、「勝者」細胞体シナプス(図 14c)よりも高いことがわかった。「敗者」細胞体シナプス(図 14d)のシグナルは最も弱かった。この傾向は、P10-P12(図 14e-h)、P14-P15(図 14i-l)と発達が進むにつれさらに顕著となった。また定量解析の結果、P7-P9 の段階ですでに「勝者」樹状突起シナプスの平均 z-score (平均値 $\pm$ SEM)が他二者に比べて有意に高いことがわかった(「勝者」樹状突起、「勝者」細胞体、「敗者」細胞体； 0.46 ± 0.07 , -0.27 ± 0.07 , -0.43 ± 0.06 ；図 14m)。この傾向は、P10-P12 (0.20 ± 0.04 , -0.61 ± 0.07 , -0.94 ± 0.03 ；図 14n)、および P14-P15(0.10 ± 0.03 , -0.87 ± 0.08 , -1.38 ± 0.09 ；図 14o)でも同様であった (すべての段階で $p < 0.001$ ；Kruskal-Wallis 検定および *post hoc* Dunn 検定)。このことから、RIM1/2 は樹状突起に進展した「勝者」の終末でのみ発現が増加することが示唆された。

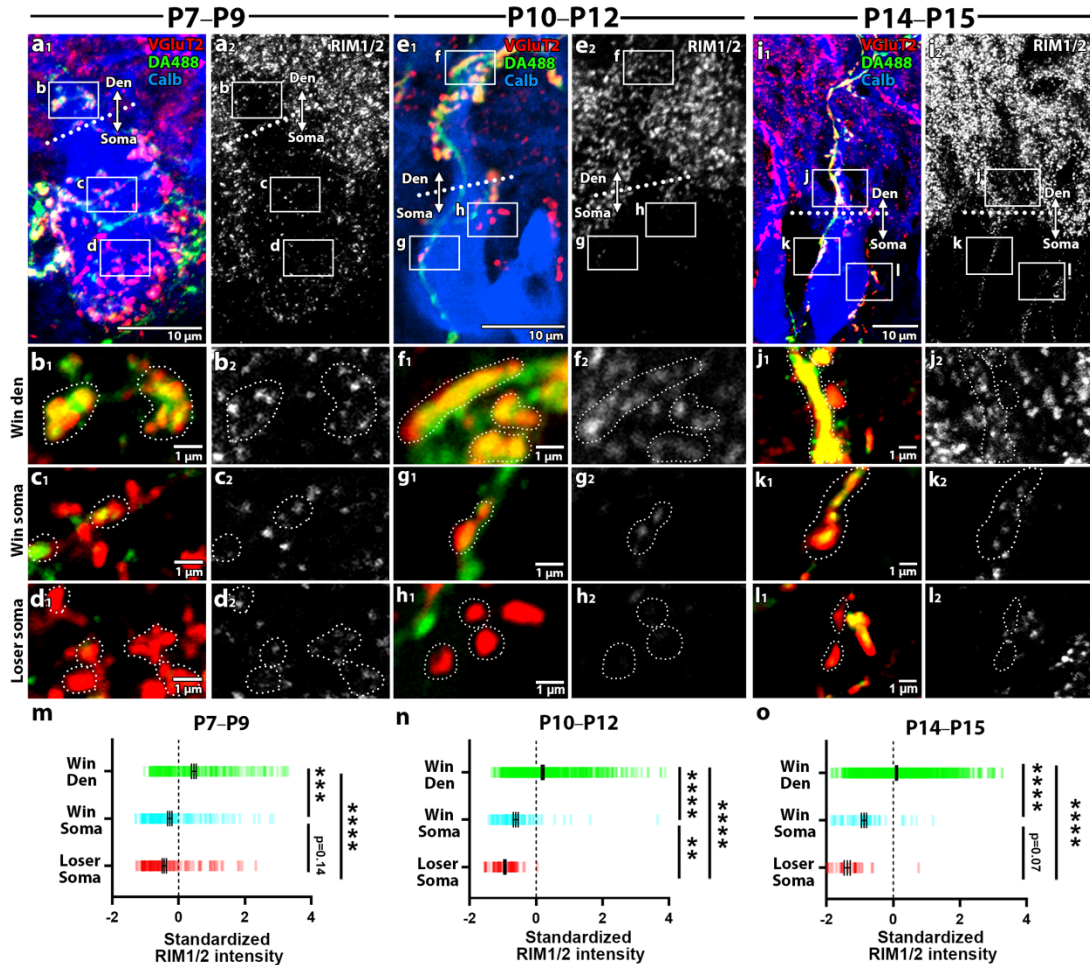


図 14.3 種類の登上線維-プルキンエ細胞シナプスにおける RIM1/2 の発現

VGlut2(赤)、DA488(緑)、calbindin(青)、RIM1/2(白)の四重蛍光免疫染色法により、RIM1/2 の発現量を比較した。P7-P9(a-d)、P10-P12(e-h)、P14-P15(i-l)の 3 段階それぞれにおいて、「勝者」樹状突起シナプス(b, f, j)、「勝者」細胞体シナプス(c, g, k)、そして「敗者」細胞体シナプス(d, h, l)の 3 群間の標準化蛍光強度を比較した。画像内の点線は、プルキンエ細胞樹状突起と細胞体の境界線を示す。結果グラフを、P7-P9 は(m)、P10-P12 は(n)、P14-P15 は(o)にそれぞれ示す(平均値 $\pm$ SEM)。色付き符号(「勝者」樹状突起、緑；「勝者」細胞体、青；「敗者」細胞体、赤)は個々のデータ値を示す。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 、 $****p < 0.0001$ 、Kruskal-Wallis 検定および *post hoc* Dunn 検定。

2.3 PSD タンパク

興奮性シナプス後部の PSD には、多くの種類の足場タンパクが密に集合しており、グルタミン酸受容体と直接的もしくは間接的に結合している(図 15)。PSD の大きさはスパインの大きさや AMPA 受容体の数、シナプス前終末に集簇するシナプス小胞の数などと相関関係があることが知られている (Harris and Stevens, 1988; Nusser et al., 1998; Knott et al., 2006)。本研究のこれまでの結果から、シナプス伝達に関わる AMPA 受容体および RIM1/2 の発現は樹状突起の「勝者」で増加することがわかった。そこで、登上線維-プルキンエ細胞シナプス

後部の足場タンパクにも発現差異が存在するのかについて検証した。まずは予備実験として、P12 の非トレーサー標識マウスを用いて PSD-93、PSD-95、Shank2 の 3 つの PSD タンパクの発現について検証した(図 16)。PSD-93 のシグナルは登上線維終末近傍には認められなかった(図 16a-c)。PSD-95(図 16d-f)と Shank2(図 16g-i)を比較すると、前者の方がより斑状陽性反応の形状が明瞭であり、登上線維終末とよく一致したシグナルが検出された。さらに、PSD-95 陽性反応の局在が VGluT2 領域と最もよく一致していた。よって、本実験では PSD-95 の発現について、「勝者」樹状突起シナプス、「勝者」細胞体シナプス、「敗者」シナプスの 3 群間で比較検討した。

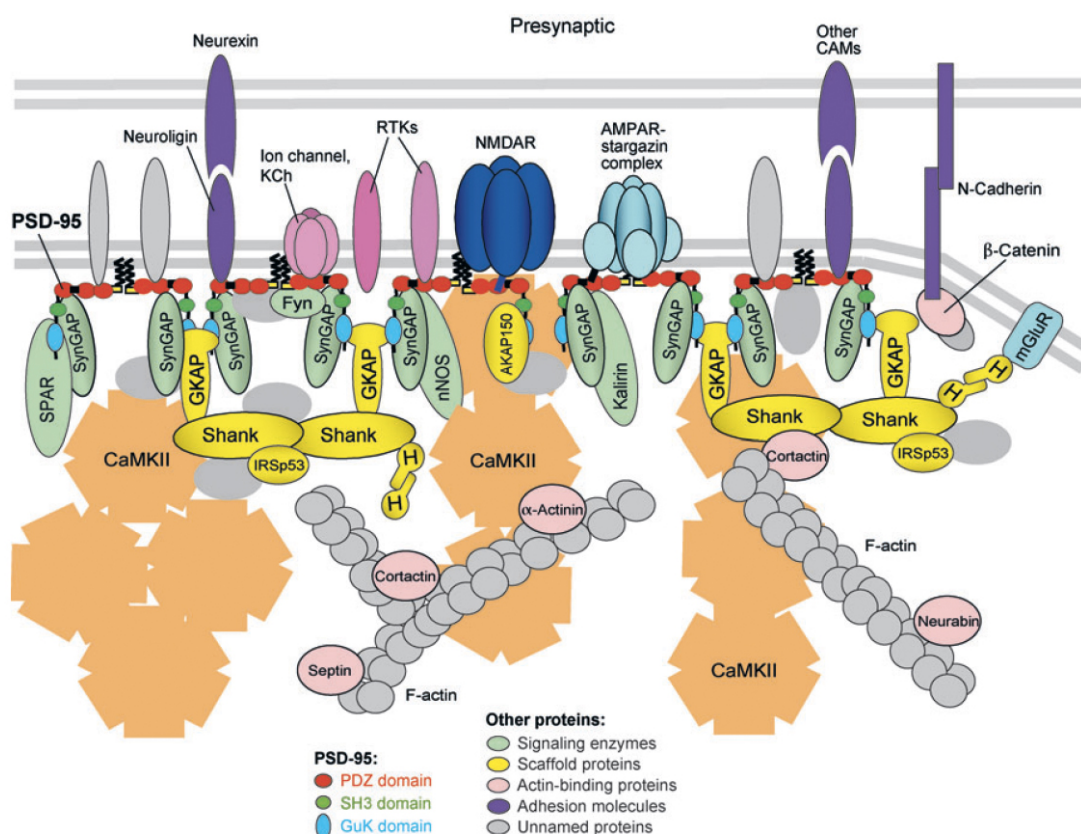


図 15. PSD を構成するタンパクおよびそれぞれの配置

PSD は多種の足場タンパクおよび受容体により構成されている。図は Sheng and Hoogenraad (2007)より引用。

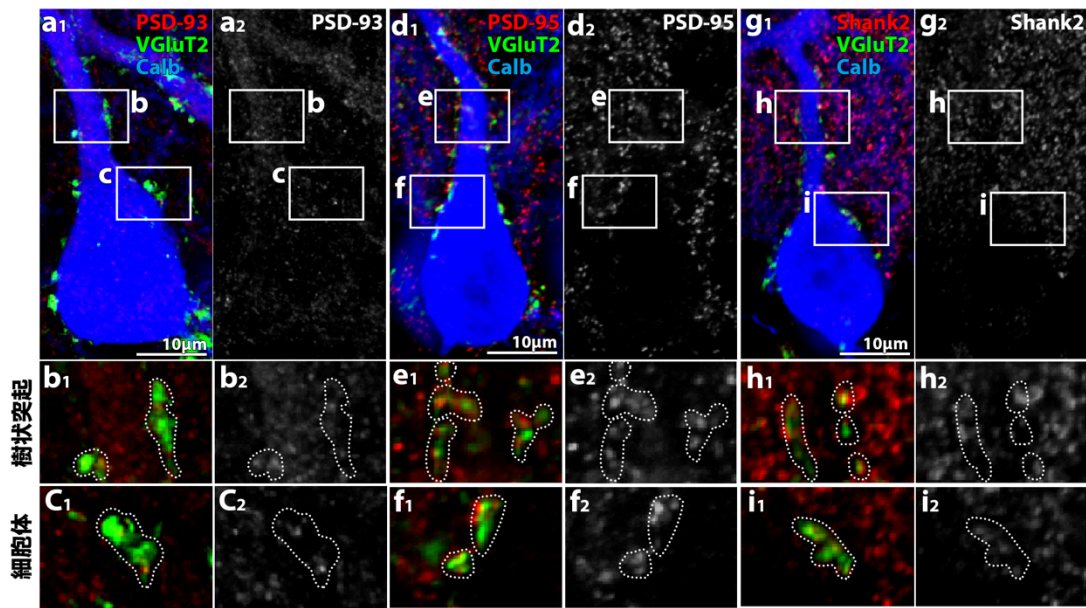


図 16. 登上線維-プルキンエ細胞シナプスにおける各 PSD タンパクの発現

P12(非トレーサー標識)マウスを用いて、各種 PSD タンパク(赤)、VGLUT2(緑)、calbindin(青)の三重蛍光免疫染色法を実施した。(a-c), PSD-93; (d-f), PSD-95; (g-i), Shank2。(a), (d), (g)の画像内に示した四角の領域は、拡大像として(b, c), (e, f), (h, i)にそれぞれ示す。また、PSD タンパクのシグナルを二値化した画像を(a₂-i₂)に示す。

次にトレーサー標識マウスを用いて、calbindin、DA488、PSD-95、VGLUT2 に対する四重蛍光免疫染色により検討を行った(図 17)。P7-P9 では、「勝者」および「敗者」シナプスのどちらも、1つの VGLUT2 陽性領域あたり複数の PSD-95 陽性反応を認め、1つの登上線維終末あたり複数のスパインとシナプスを形成していることが示唆された(図 17a-d)。P10-P12(図 17e-h)および P14-P15(図 17i-l)では、各樹状突起シナプスの PSD-95 陽性反応数はさらに増加していた一方、細胞体シナプスでは減少傾向にあった。

平均 z-score(平均値 ± SEM)を比較した結果、P7-P9 では、「勝者」樹状突起、「勝者」細胞体、「敗者」細胞体シナプスの間で有意差を認めなかった (-0.06 ± 0.08 , 0.06 ± 0.11 , 0.01 ± 0.11 ; $p=0.96$; Kruskal-Wallis 検定; 図 17m)。その後、P10-P12 では「敗者」細胞体シナプスの平均 z-score は -0.30 ± 0.01 と、「勝者」細胞体シナプス (0.02 ± 0.12) と有意差はなかったものの、「勝者」樹状突起(0.04 ± 0.06)より若干減少していた。(「敗者」細胞体 vs. 「勝者」細胞体、 $p=0.10$; vs. 「勝者」樹状突起、 $p<0.05$; Kruskal-Wallis 検定および *post hoc* Dunn 検定; 図 17n)。さらに P14-P15 では「勝者」樹状突起シナプス (0.05 ± 0.05) に比べ、「勝者」細胞体シナプス (-0.60 ± 0.08) と「敗者」細胞体シナプス (-0.51 ± 0.10) で有意に減少していた(「勝者」樹状突起 vs. 「勝者」細胞体、 $p<0.001$; vs. 「敗者」細胞体、 $p<0.01$; Kruskal-Wallis 検定および *post hoc* Dunn 検定; 図 17o)。これらの結果は、「勝者」登上線維終末の大半が樹状突起に移動する頃から、細胞体シナプスでは線維の由来を問わず、PSD-95 の発現が減少することを示唆している。

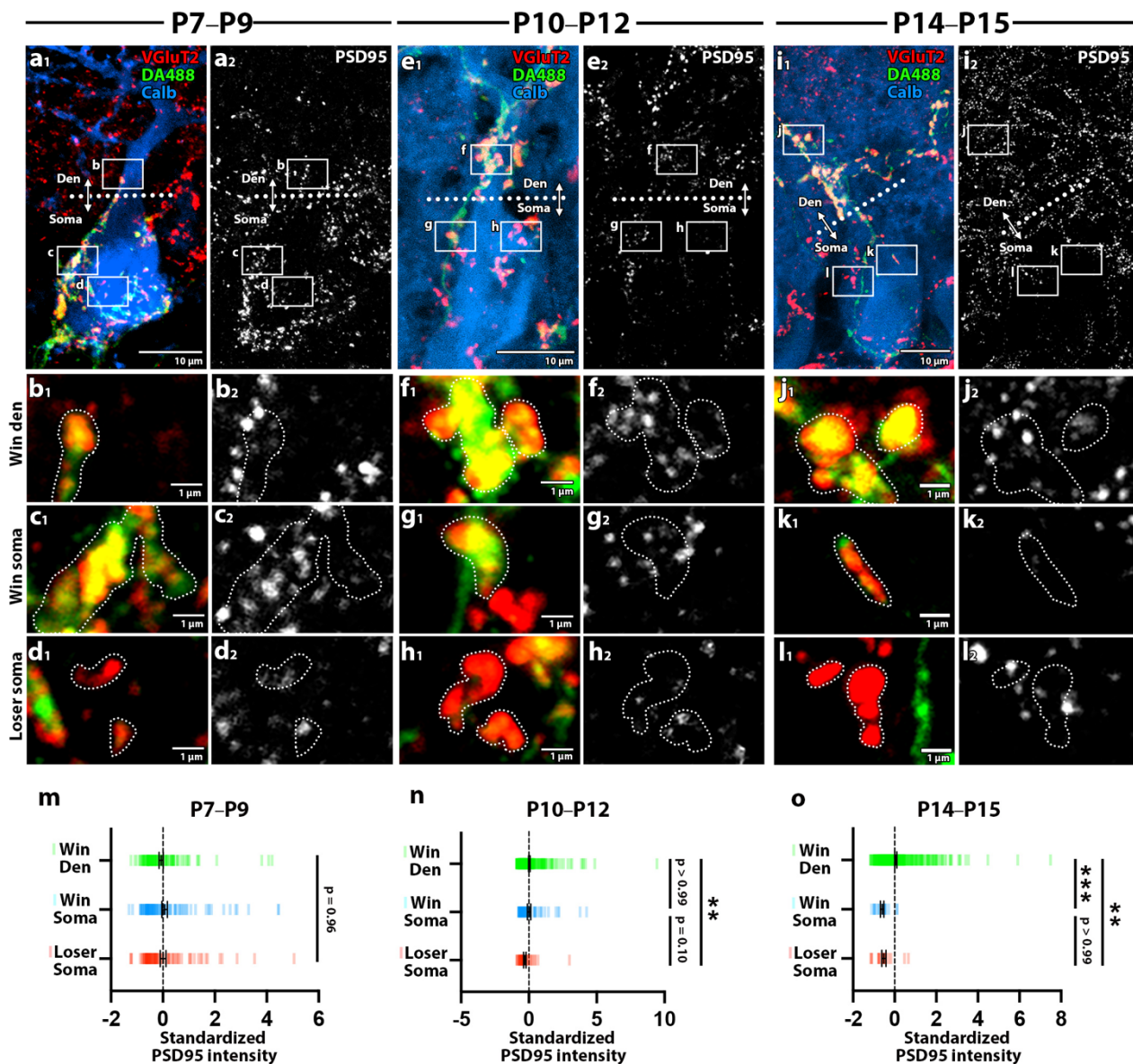


図 17.3 種類の登上線維-プルキンエ細胞シナプスにおける PSD-95 の発現

VGLUT2(赤)、DA488(緑)、calbindin(青)、PSD-95(白)の四重蛍光免疫染色により、PSD-95 の発現量を比較した。P7-P9 (a-d)、P10-P12 (e-h)、P14-P15 (i-l)の3段階それぞれにおいて、「勝者」樹状突起シナプス(b, f, j)、「勝者」細胞体シナプス(c, g, k)、そして「敗者」細胞体シナプス(d, h, l)の3群間の発現量を z-score により比較した。画像内の点線は、プルキンエ細胞樹状突起と細胞体の境界線を示す。結果グラフを、P7-P9 は(m)、P10-P12 は(n)、P14-P15 は(o)にそれぞれ示す(平均値 $\pm$ SEM)。色付き符号(「勝者」樹状突起、緑；「勝者」細胞体、青；「敗者」細胞体、赤)は個々のデータ値を示す。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 、Kruskal-Wallis 検定および *post hoc* Dunn 検定。

3. シナプス微細形態の検討

樹状突起における登上線維シナプス形成が最も盛んで、かつ細胞体シナプスが維持されて

いる時期である P12 を対象に、「勝者」と「敗者」の登上線維シナプスの微細形態に関して連続超薄切片と電子顕微鏡により検討した。VGluT2 に対する金コロイド銀増感により標識された登上線維終末を同定し、3 つのプルキンエ細胞およびそれぞれに対応する登上線維の三次元再構築像を作成した(プルキンエ細胞高さ 16.8 μm)(図 18)。「勝者」および「敗者」の登上線維シナプスはともに 1 つの終末に対し複数のスパインとシナプスを形成していた。この所見は、1 つの VGluT2 陽性終末に複数の PSD-95 陽性反応を認めた観察結果と一致していた(図 17)。多くの「勝者」樹状突起シナプスでは、登上線維終末およびスパインの双方が複雑に分葉化しており、スパインが登上線維終末周囲を「抱き抱える」ように回り込み、大きな PSD を形成していた(図 19a, b)。この傾向は「勝者」細胞体シナプスでも同様であった(図 19c, d)。一方、「敗者」シナプスでは登上線維終末およびスパインの形態はより単純な形態を示し、樹状突起幹からまっすぐ伸びたスパインが、近接する登上線維終末に小さな PSD を形成する傾向にあった。さらに、中には PSD を認めずシナプスを形成していないと判断されるスパインも認められた(図 19e, f)。

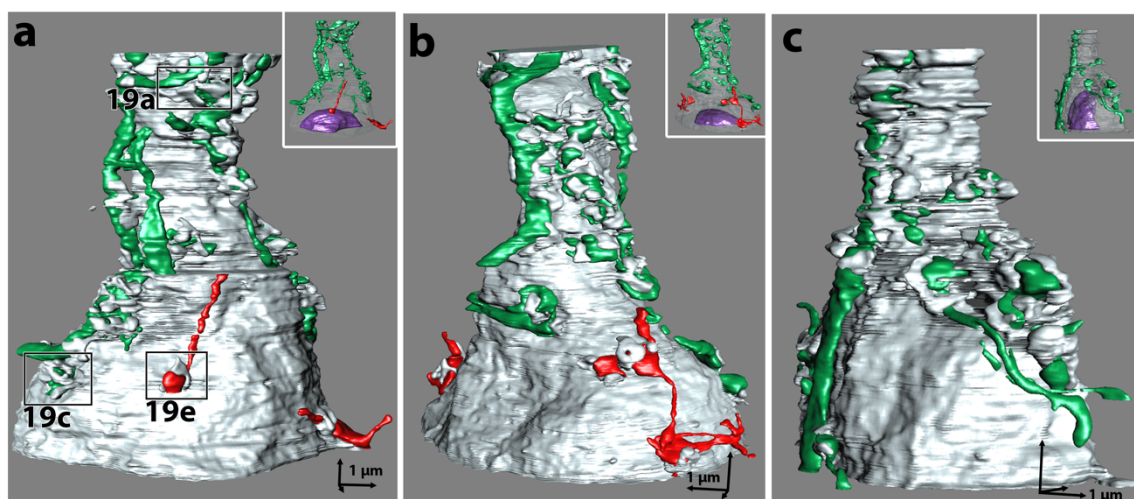


図 18. 連続電顕画像を基に三次元再構築した 3 つのプルキンエ細胞と登上線維

プルキンエ細胞の細胞体上部から近位樹状突起を含む範囲を部分的に再構築している。細胞質および核はそれぞれ灰色と紫色の擬似カラーで示す。「勝者」登上線維は緑色、「敗者」登上線維は赤色によりそれぞれ区別している。(a)において 19a、19c、19e の番号を付した四角は、次の図 19 にてそれぞれの拡大図およびその詳細を示す。

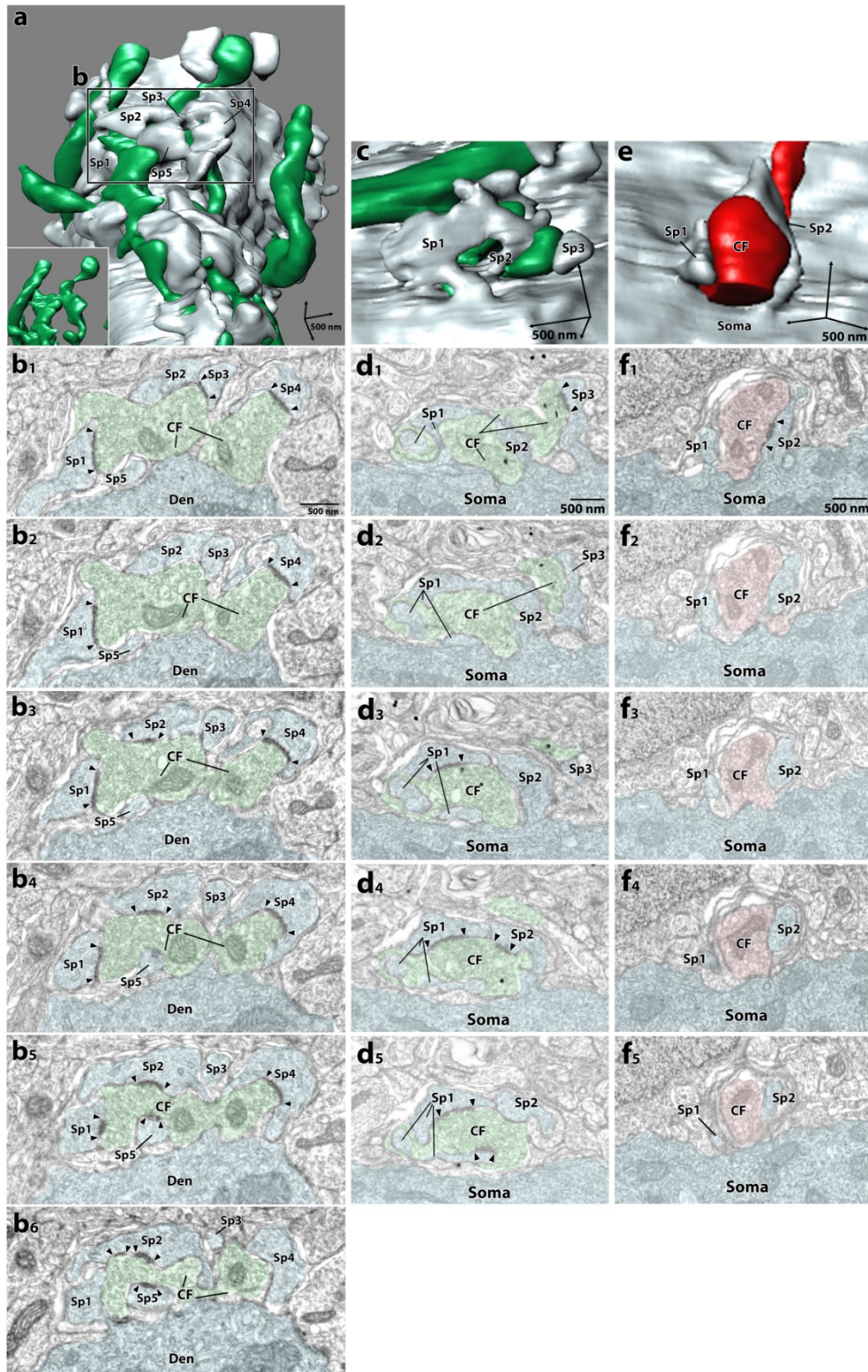


図 19. 「勝者」と「敗者」シナプスの微細形態の差異

図 18 に示した「勝者」樹状突起シナプス(a)、「勝者」細胞体シナプス(c)、「敗者」細胞体シナプス(e)の拡大図。(b), (d), (f)はそれぞれ(a), (c), (e)に一致した終末およびスパインの連続電子顕微鏡像を示す。プルキンエ細胞は水色、「勝者」登上線維は緑、「敗者」登上線維は赤にそれぞれ擬似カラー表示している。表示している「勝者」樹状突起終末 (a, b)では 5 個のスパイン (Sp1-5)が、「勝者」細胞体終末 (c, d)では 3 個のスパイン (Sp1-Sp3)、「敗者」細胞

体終末(e, f)では2個のスパイン (Sp1, 2)が1つの終末に接している。多くのスパインは PSD (2つの矢頭の間を示した電子密度の高い構造)を認めることから、登上線維との間にシナプスを形成していることがわかる。「勝者」樹状突起および細胞体シナプスでは、登上線維終末とスパイン双方の形が分葉状であり、スパインは大きな PSD を有している。一方、「敗者」細胞体では登上線維終末とスパインの形態は比較的単純であり、スパインはより小さな PSD を有する。中には、明らかな PSD を持たず、登上線維とシナプスを形成していないと考えられるスパイン (Sp1, f)も認められる。

次にシナプスの形態に関する定量解析を行った。PSD 面積の平均値 $\pm$ SEM (μm^2)は、「勝者」樹状突起シナプスで $0.14 \pm 0.01 \mu\text{m}^2$ 、「勝者」細胞体シナプスで $0.11 \pm 0.01 \mu\text{m}^2$ 、「敗者」細胞体シナプスで $0.07 \pm 0.01 \mu\text{m}^2$ であり、前二者は後者より PSD 面積が有意に大きいことがわかった(「勝者」樹状突起シナプス vs.「敗者」細胞体シナプス、 $p < 0.001$ ；「勝者」細胞体シナプス vs.「敗者」細胞体シナプス、 $p < 0.05$ ；Kruskal-Wallis 検定および *post hoc* Dunn 検定)(図 20a)。一方、スパイン体積 (μm^3)および1つのスパインあたりに形成するシナプスの数は、3群間で有意差を認めなかった(以下「勝者」樹状突起シナプス、「勝者」細胞体シナプス、「敗者」細胞体シナプスの順にスパイン体積の平均が $0.30 \pm 0.01 \mu\text{m}^3$, $0.26 \pm 0.03 \mu\text{m}^3$, $0.23 \pm 0.04 \mu\text{m}^3$, $p = 0.17$ ；スパイン1つ当たりのシナプス数の平均は 1.35 ± 0.10 , 1.39 ± 0.14 , 1.17 ± 0.17 ; $p = 0.63$ ；Kruskal-Wallis 検定)(図 20b, c)。

また、各スパインについて、体積(X軸)と合計 PSD 面積(Y軸)の関係をプロットした散布図を解析したところ、全ての群で正の相関を認めた。しかし、単回帰直線の傾きを比較したところ、「敗者」細胞体シナプスは有意に傾きが小さく、「勝者」樹状突起および細胞体シナプスよりも小さい PSD を作る傾向にあることが示唆された($p < 0.05$, ANCOVA, $F = 5.16$, $DFn = 1$, $DFd = 95$; 図 20d, e)。

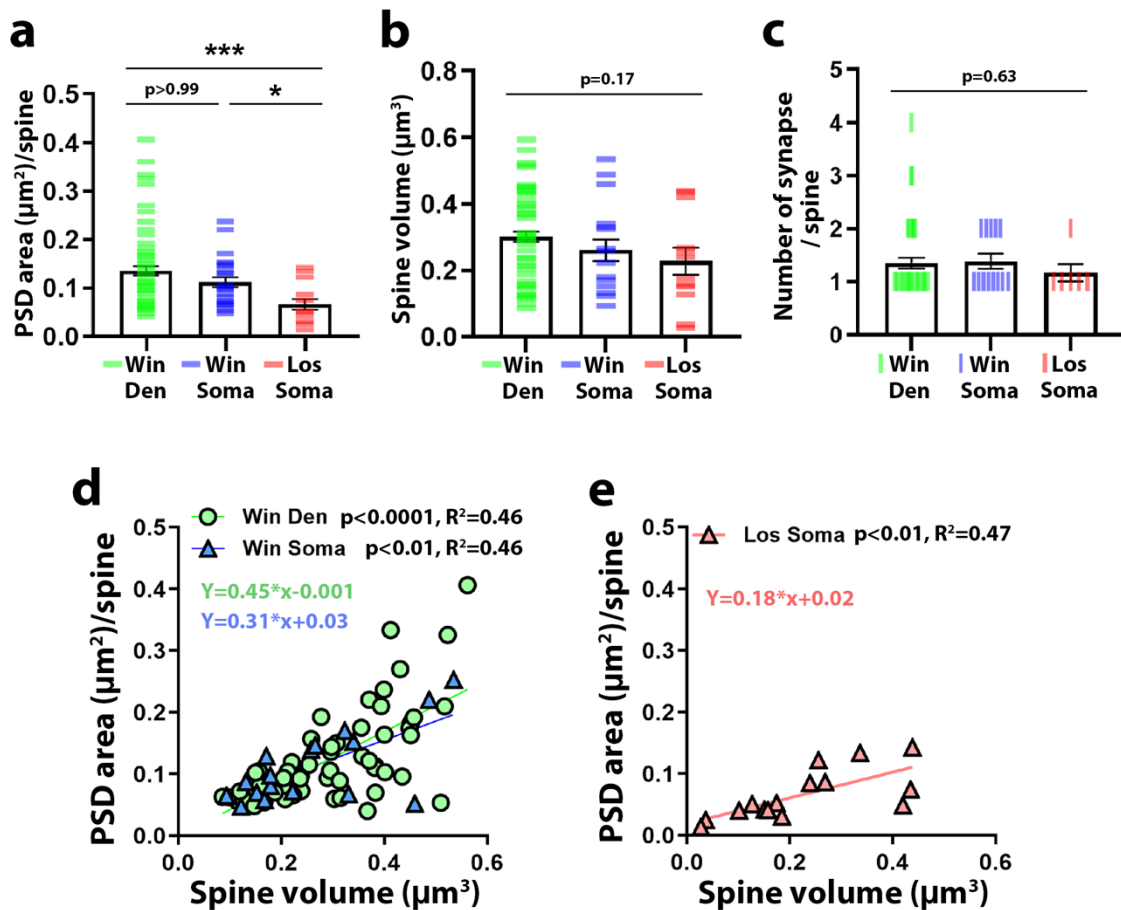


図 20. 「勝者」と「敗者」シナプスの形態学的差異に関する定量解析

(a-c) 3 群間での PSD 面積(a)、スパイン体積(b)、スパインあたりの PSD 数(c)を比較した結果のグラフ(平均値 $\pm$ SEM)。色付き符号(「勝者」樹状突起、緑;「勝者」細胞体、青;「敗者」細胞体、赤)は個々のデータ値を示す。 $*p < 0.05$ 、 $***p < 0.001$ 、Kruskal-Wallis 検定および *post hoc* Dunn 検定。

(d-e)「勝者」樹状突起シナプス(緑、d)、「勝者」細胞体シナプス(青、d)、「敗者」細胞体シナプス(赤、e)それぞれにおける、スパインあたりの PSD 面積(Y 軸)と体積(X 軸)の関係性を示す散布図。各データはグラフ(a)、(b)で用いたデータを使用した。散布図より算出した単回帰直線および回帰式、決定係数(R^2)、 p 値はいずれもグラフ内に示している。

これらの電子顕微鏡解析の結果をまとめると、「勝者」樹状突起および細胞体シナプスでは、「敗者」細胞体シナプスと比較してより複雑な構造を呈しており、かつ有意に大きな PSD 領域を形成していることがわかった。

考察

本研究では、P7 以降の「勝者」の登上線維シナプスで、分子発現の増加や PSD の増大、シナプス構造の分葉化などを伴う解剖学的な強化が生じていることを明らかにした。中でも、樹状突起へ移動しシナプス形成が進んだ後の「勝者」登上線維の樹状突起シナプスでは、特に顕著な強化が生じていた(図 21)。

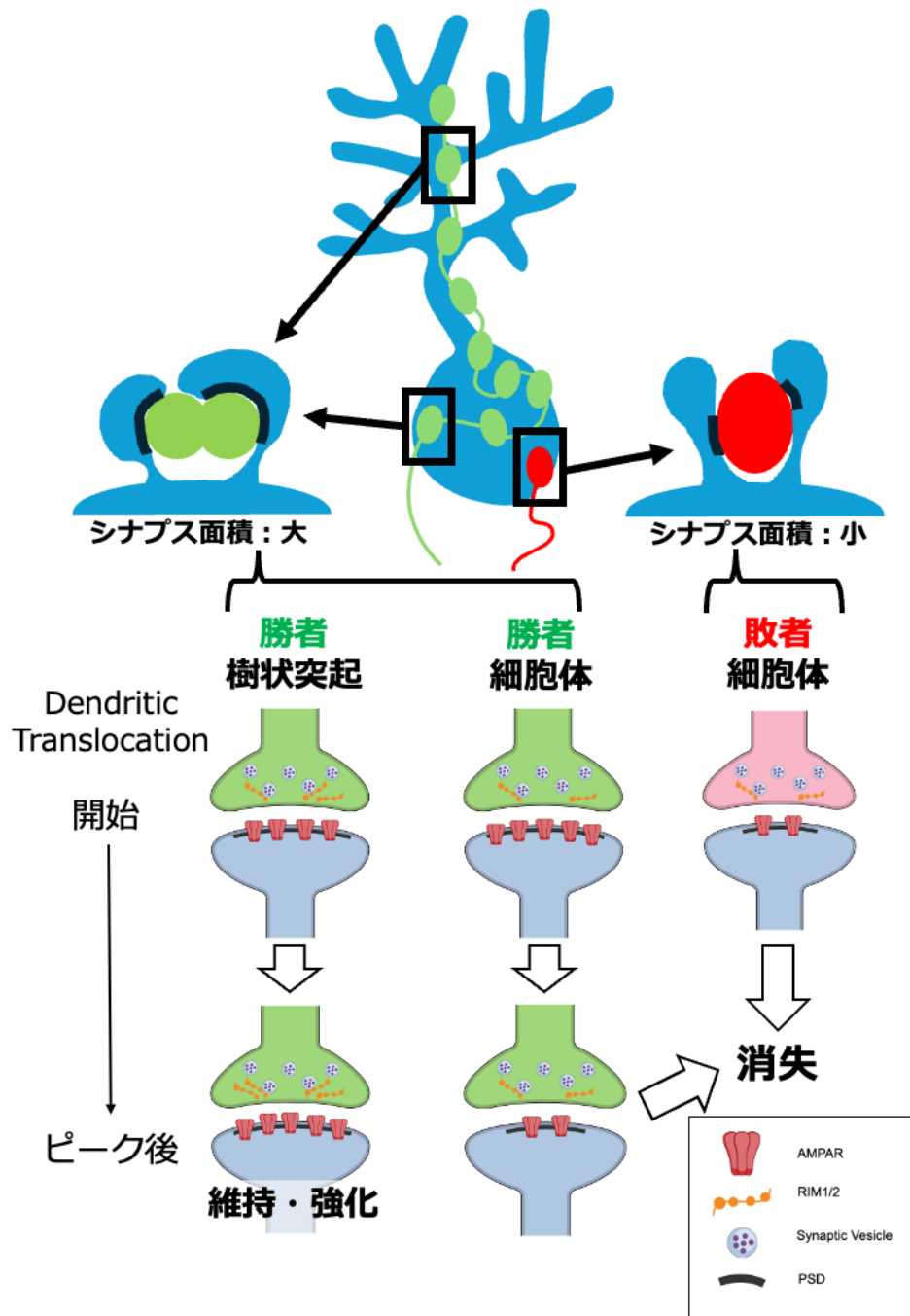


図 21. 「勝者」と「敗者」登上線維シナプスの分子発現と形態の分化過程の模式図

マウスを用いた電気生理解析からは、P3–P7 にかけて 1 本の登上線維のシナプス応答が選択的に大きくなり「優勢」な登上線維が出現することがわかっている (Hashimoto and Kano, 2003; Kawamura et al., 2013)。しかし、その時点では放出確率などのシナプス機能が成熟しておらず、「優勢」な線維とそれ以外の「劣勢」な線維の性質は似通っている (Hashimoto and Kano, 2003)。また Wilson ら (2019) による P3 および P7 マウスの電子顕微鏡解析によると、将来「勝者」となる可能性の高い「優勢」な登上線維と、それ以外の「劣勢」な登上線維シナプスの PSD の面積に明らかな差はなかった。これらの知見から、P7 までの時期における登上線維間の強弱は、各線維が形成するシナプスの「数」によって決定されており、線維間に明確な質的差異は認められないと考えられている。本研究では、P7 以降の「勝者」と「敗者」の登上線維シナプスでの AMPA 受容体の発現は「勝者」細胞体シナプスで最も高く、「敗者」細胞体シナプスで最も低いことを示した(図 10m)。このことは、P7 よりも後の発達段階では AMPA 受容体の発現に差異が生じるなどの分化が進み、シナプス後部の構造的分化を含めた質的变化を通じて、「勝者」登上線維シナプスのさらなる強化が進むことを示している。

LTP を始めとするシナプス機能の強化は、PSD の増大といった構造的な強化につながるものが広く知られている (Matsuzaki et al., 2004; Holtmaat and Svoboda, 2009)。登上線維—プルキンエ細胞シナプスでは、生後第 1 週の限られた時期(P5–P9)にプルキンエ細胞の発火と同期した「優勢」な登上線維入力で LTP が生じる (Bosman et al., 2008; Ohtsuki and Hirano, 2008; Kawamura et al., 2013)。また、これは細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇や VDCC の活性化を必要とする現象である (Bosman et al., 2008; Kawamura et al., 2013)。樹状突起では VDCC の密度が高く (Usowicz et al., 1992; Llano et al., 1994)、かつ体積に比べて表面積が大きいいため、細胞体よりも Ca^{2+} 濃度が上昇しやすい環境である (Eilers et al., 1995)。このことは樹状突起に少しでも早く到達できた「優勢」な登上線維では効率よく LTP が生じる可能性を示唆する。したがって「優勢」な登上線維では LTP により PSD の増大などの形態学的な強化につながり、「劣勢」な登上線維に対してさらなる競合優位性が生じると考えられる。

樹状突起シナプスが最も盛んに形成される P12 では、「勝者」の樹状突起および細胞体シナプスでは、登上線維終末もスパインの形態もどちらも複雑に分葉化しており、形成する PSD 面積が有意に大きいことがわかった(図 19a–d, 図 20a)。これに対し、「敗者」の細胞体シナプスの PSD では縮小あるいは断片化が観察された(図 19e–f, 図 20a)。単一のスパインが形成するシナプスの数は、3 つのシナプス群間で同等であったことから(図 20c)、個々のスパインあたりの PSD 面積の違いが主な要因であると考えられる。一般的に、PSD サイズと AMPA 受容体やシナプス小胞の数は相関することが知られており (Harris and Stevens, 1988; Nusser et al., 1998; Knott et al., 2006)、この形態変化は「勝者」登上線維シナプスが、高いシナプス強度を実現するための解剖学的基盤となると考えられる。生体マウスを用いた観察研究でも、樹状突起でのシナプス形成が進んだ時期になると「勝者」と「敗者」の登上線維の形勢が非可逆的となる (Carrillo et al., 2013) ことが知られており、こうした機能的および構造的な強化は「勝者」の競合的優位性の確立に寄与している可能性が示唆される。

PSD-95 は興奮性シナプス後部の PSD を構成する主要な足場タンパクである。細胞体シナプスにおける PSD-95 の発現変化は緩徐であり、「勝者」登上線維終末の大部分が樹状突起に移動してから、ようやく減少した(図 17)。このゆるやかな減少は PSD-95 の遅いターンオーバー (Kuriu et al., 2006)を反映しているのかもしれない。また、この時期にはプルキンエ細胞の細胞体において登上線維シナプスが減少し、代わりに抑制性のバスケット細胞シナプスが劇的に増加する。この置換過程で、登上線維との接続を失ったスパインが一過性に残存し、そこに PSD 構造や PSD-95 が検出されることが分かっている(Ichikawa et al., 2011)。本研究結果と照らし合わせると、細胞体にとどまる登上線維シナプスの刈り込みの過程では、先に AMPA 受容体発現の低下による機能的弱화가生じ、その後で PSD-95 を含むシナプス後部構造の変性がゆっくりと進行する可能性が示唆される。さらにこの結果は「勝者」樹状突起シナプスにおける AMPA 受容体の発現増加が、PSD-95 以外の関連分子の発現増加に依存している可能性も示唆している。有力な候補の 1 つに、AMPA 受容体のシナプス面への発現と機能を制御する補助サブユニット stargazin/TARPy2 が挙げられる(Yamazaki et al., 2010; Kawata et al., 2014; Yamasaki et al., 2016)。今後、「勝者」登上線維シナプスでの AMPA 受容体の発現増加における TARPy2 の役割についても明らかにする必要がある。

シナプス前終末のアクティブゾーンに発現する RIM は神経伝達物質放出効率の制御において中心的な役割を果たす(Mittelstaedt et al., 2010; Kaeser and Regehr, 2014)。特にシナプス前膜の VDCC をアクティブゾーンに配置させ(Kaeser et al., 2011; Han et al., 2011)、チャネル開口時間を制御することで(Kiyonaka et al., 2007)、神経伝達物質放出を促進する点が重要である。本研究では RIM1/2 の発現は樹状突起に移動した「勝者」シナプスで選択的に増加することを明らかにした(図 14m-o)。成熟が進んだ登上線維ではシナプス小胞の放出確率や放出部位からの同期放出が増加することが知られており(Silver et al., 1998; Wadiche and Jahr, 2001; Hashimoto and Kano, 2003)、樹状突起に移動した「勝者」登上線維終末における RIM1/2 の選択的な発現増加は、この放出機能の成熟に寄与している可能性がある。例えば、シナプス後部の AMPA 受容体の活動は、シナプス前終末からの放出機能の維持に不可欠であり、シナプス後部からシナプス前部に対する逆行性のシグナルの存在も示唆されている(Kakizawa et al., 2005)。したがって「勝者」登上線維シナプスでの AMPA 受容体の発現増加は、未知の逆行性シグナルを介して、シナプス前終末の機能成熟に関わる分子発現を増加させるのかもしれない。現在までにいくつかの逆行性シグナル分子機構が同定されている。例えば semaphorin 3A-plexin A4 (Uesaka et al., 2014)や progranulin-Sort1 (Uesaka et al., 2018)は「勝者」登上線維の生存・維持に寄与し、反対に semaphorin 7A-plexin C1 (Uesaka et al., 2014)や BDNF-TrkB (Choo et al., 2017)は「敗者」登上線維刈り込みに関わるとされる。しかしながら、本研究で観察されたような形態学的なシナプス強化に関わる逆行性シグナル分子機構は同定されておらず、今後の研究の課題の一つであるといえる。

結論

本研究から得られた新知見は以下の通りである

- ・樹状突起へ移動した「勝者」登上線維シナプスでは、シナプス形成領域の拡大とともに、PSD 面積の増大と個々のシナプス後部での AMPA 受容体とシナプス前部での RIM1/2 の発現増加という解剖学的な強化が生じている。
- ・樹状突起に移動できなかった「敗者」登上線維シナプスでは、分子発現および構造が強化されることがないまま弱化され、やがて除去される。
- ・同じ「勝者」登上線維由来でも細胞体にとどまる登上線維シナプスでは、微細構造や AMPA 受容体の発現が一旦強化される。しかし、線維全体の樹状突起への移動が進むにつれて、シナプス分子の発現が低下することから、「敗者」登上線維シナプスと同様にやがて形態も弱化され、除去される。

以上の知見から、樹状突起への移動を確立した登上線維シナプスは、分子発現と形態の両方が選択的に強化され、細胞体シナプスに対する競合優位性を保つことを示した。この結果は強い入力により個々のシナプスの強化および神経支配領域の拡大を促進することで、他の弱い入力を打ち負かすことができるという解剖学的基盤を提供できると考える。

今後は、「勝者」登上線維シナプス後部からの逆行性シグナル分子機構の探索や、AMPA 受容体発現および機能を制御する stargazin/TARPy2、 Ca^{2+} 放出に関わるシナプス前 VDCC の発現変化を検討することで、「勝者」登上線維シナプスが選択的に強化される分子基盤の理解がさらに深まると考える。また、登上線維の伸長・退縮のメカニズムやこれを制御するシグナル分子については全く不明であり、「勝者」登上線維の支配領域拡大に関するメカニズム研究が全容解明の端緒となることが期待される。

近年、様々な中枢神経系疾患の原因として、神経回路の精緻化過程の異常が注目されている(Penzes et al., 2011)。例えば自閉スペクトラム症では幼少期に過剰に形成されたシナプスの刈り込み不全が、また、反対に統合失調症では思春期またはその前後の過剰なシナプス刈り込みが症状の出現につながる可能性が示唆されている。したがって登上線維—プルキンエ細胞投射系をモデルとする神経経路精緻化過程の研究は、これらの疾患への治療戦略の開発基盤となることも期待される。

謝 辞

本研究の機会を与えてくださり、ご指導並びに激励を賜りました北海道大学大学院医学研究院 解剖発生学教室教授 渡辺 雅彦 先生に謹んで感謝の意を表します。

日々の研究生活におきまして、懇切丁寧なご指導ならびにご鞭撻を賜りました同教室准教授 山崎 美和子 先生に心より感謝の意を表します。

研究に関し多大なるご指導をいただきました同教室助教 今野 幸太郎 先生ならびに保健科学研究院 リハビリテーション科学分野 准教授 宮崎 太輔 先生、ならびにご協力を賜りました皆様には深く感謝いたします。

また、自身が札幌医科大学医学部 麻酔科学講座の所属であるにも関わらず、他大学への大学院進学をご快諾いただき、研究環境の提供をサポートしていただきました札幌医科大学医学部 麻酔科学講座教授 山蔭 道明 先生、はじめ同講座の皆様に深く御礼申し上げます。

最後に、自身の大学院生活を一貫して支え続けてくれた夫と娘に心より感謝いたします。

利益相反

開示すべき利益相反情報はない

引用文献

- Altman J and Bayer SA (1997) Development of the Cerebellar System: In Relation to Its Evolution, Structure and Functions (CRC Press, Boca Raton, FL)
- Bosman LW, Takechi H, Hartmann J, Eilers J and Konnerth A (2008) Homosynaptic long-term synaptic potentiation of the “winner” climbing fiber synapse in developing Purkinje cells. *J Neurosci* 28, 798–807.
- Carrillo J, Nishiyama N, and Nishiyama H (2013) Dendritic translocation establishes the winner in cerebellar climbing fiber synapse elimination. *J Neurosci* 33, 7641–7653.
- Cardona A, Saalfeld S, Schindelin J, Arganda-Carreras I, Preibisch S, Longair M, Tomancak P, Hartenstein V, and Douglas RJ (2012) TrakEM2 software for neural circuit reconstruction. *PLoS One* 7, e38011.
- Chen C, Kano M, Abeliovich A, Chen L, Bao S, Kim JJ, Hashimoto K, Thompson RF, and Tonegawa S (1995) Impaired motor coordination correlates with persistent multiple climbing fiber innervation in PKC γ mutant mice. *Cell* 83, 1233–1242.
- Chedotal A and Sotelo C (1992) Early development of olivocerebellar projections in the fetal rat using CGRP immunocytochemistry. *Eur J Neurosci* 4, 1159–1179.
- Choo M, Miyazaki T, Yamazaki M, Kawamura M, Nakazawa T, Zhang J, Tanimura A, Uesaka N, Watanabe M, Sakimura K, et al (2017) Retrograde BDNF to TrkB signaling promotes synapse elimination in the developing cerebellum. *Nat Commun* 8, 195.
- Crepel F (1982) Regression of functional synapses in the immature mammalian cerebellum. *Trends in neurosciences* 5, 266–269.
- Eilers J, Augustine GJ, and Konnerth A (1995) Subthreshold synaptic Ca²⁺ signalling in fine dendrites and spines of cerebellar Purkinje neurons. *Nature* 373, 155–158.
- Fukaya M and Watanabe M (2000) 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, 572–586.
- Fukaya M, Tsujita M, Yamazaki M, Kushiya E, Abe M, Akashi K, Natsume R, Kano M, Kamiya H,

- Watanabe M, et al (2006) Abundant distribution of TARP γ -8 in synaptic and extrasynaptic surface of hippocampal neurons and its major role in AMPA receptor expression on spines and dendrites. *Eur J Neurosci* 24, 2177–2190.
- Han Y, Kaeser PS, Südhof TC, and Schneggenburger R (2011) RIM determines Ca^{2+} channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone. *Neuron* 69, 304–316.
- Harris CR, McKinley ET, Roland JT, Liu Q, Shrubsole MJ, Lau KS, Coffey RJ, Wrobel J, and Vandekar SN (2022) Quantifying and correcting slide-to-slide variation in multiplexed immunofluorescence images. *Bioinformatics* 38, 1700–1707.
- Harris KM and Stevens JK (1988) Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 8, 4455–4469.
- Hashimoto K and Kano M (2003) Functional differentiation of multiple climbing fiber inputs during synapse elimination in the developing cerebellum. *Neuron* 38, 785–796.
- Hashimoto K and Kano M (2005) Postnatal development and synapse elimination of climbing fiber to Purkinje cell projection in the cerebellum. *Neurosci Res* 53, 221–228.
- Hashimoto K, Ichikawa R, Kitamura K, Watanabe M, and Kano M (2009a) Translocation of a “winner” climbing fiber to the Purkinje cell dendrite and subsequent elimination of “losers” from the soma in developing cerebellum. *Neuron* 63, 106–118.
- Hashimoto K, Yoshida T, Sakimura K, Mishina M, Watanabe M, Kano M (2009b) Influence of parallel fiber–Purkinje cell synapse formation on postnatal development of climbing fiber–Purkinje cell synapses in the cerebellum. *Neuroscience* 162, 601–611.
- Hensch TK (2004) Critical period regulation. *Annu Rev Neurosci*, 27, 549–579.
- Holtmaat A and Svoboda K (2009) Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci* 10, 647–658.
- Ichikawa R, Yamasaki M, Miyazaki T, Konno K, Hashimoto K, Tatsumi H, Inoue Y, Kano M, and Watanabe M (2011) Developmental switching of perisomatic innervation from climbing fibers to basket cell fibers in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 31, 16916–16927.
- Ichikawa R, Hashimoto K, Miyazaki T, Uchigashima M, Yamasaki M, Aiba A, Kano M, and Watanabe

- M (2016) Territories of heterologous inputs onto Purkinje cell dendrites are segregated by mGluR1-dependent parallel fiber synapse elimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 2282–2287.
- Kaesler PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, and Südhof TC (2011) RIM proteins tether Ca^{2+} channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* 144, 282–295.
- Kaesler PS and Regehr WG (2014) Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release. *Annu Rev Physiol* 76, 333–363.
- Kakizawa S, Miyazaki T, Yanagihara D, Iino M, Watanabe M, and Kano M (2005) Maintenance of presynaptic function by AMPA receptor-mediated excitatory postsynaptic activity in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19180–19185.
- Kano M, Hashimoto K, Watanabe M, Kurihara H, Offermanns S, Jiang H, Wu Y, Jun K, Shin HS, Inoue Y, et al (1998) Phospholipase C β 4 is specifically involved in climbing fiber synapse elimination in the developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15724–15729.
- Kano M, Watanabe T, Uesaka N, and Watanabe M (2018) Multiple phases of climbing fiber synapse elimination in the developing cerebellum. *Cerebellum* 17, 722–734.
- Katz LC and Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274, 1133–1138.
- Kawamura Y, Nakayama H, Hashimoto K, Sakimura K, Kitamura K, and Kano M (2013) Spike timing-dependent selective strengthening of single climbing fibre inputs to Purkinje cells during cerebellar development. *Nat Commun* 4, 2732.
- Kawata S, Miyazaki T, Yamazaki M, Mikuni T, Yamasaki M, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, and Kano M (2014) Global scaling down of excitatory postsynaptic responses in cerebellar Purkinje cells impairs developmental synapse elimination. *Cell Rep* 8, 1119–1129.
- Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, Bito H, Beedle AM, Mori E, Hara Y, De Waard M, et al (2007) RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca^{2+} channels. *Nat Neurosci* 10, 691–701.
- Knott GW, Holtmaat A, Wilbrecht L, Welker E, and Svoboda K (2006) Spine growth precedes synapse

formation in the adult neocortex *in vivo*. *Nat Neurosci* 9, 1117–1124.

Konno K, Yamasaki M, Miyazaki T, and Watanabe M (2023) Glyoxal fixation: an approach to solve immunohistochemical problem in neuroscience research. *Sci Adv* 9, eadf7084.

Kuriu T, Inoue A, Bito H, Sobue K, and Okabe S (2006) Differential control of postsynaptic density scaffolds via actin-dependent and -independent mechanisms. *J Neurosci* 26, 7693–7706.

Lichtman JW and Colman H (2000) Synapse elimination and indelible memory. *Neuron* 25, 269–278.

Llano I, DiPolo R, and Marty A (1994) Calcium-induced calcium release in cerebellar Purkinje cells. *Neuron* 12, 663–673.

Lohof AM, Delhay-Bouchaud N, and Mariani J (1996) Synapse elimination in the central nervous system: functional significance and cellular mechanisms. *Rev Neurosci* 7, 85–101.

Lüscher C, Nicoll RA, Malenka RC, and Muller D (2000) Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci* 3, 545–550.

Matsuda K, Miura E, Miyazaki T, Kakegawa W, Emi K, Narumi S, Fukazawa Y, Itoh-Ishida A, Kondo T, Shigemoto R, et al. (2010) Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor $\delta 2$, a bidirectional synapse organizer. *Science* 328, 363–368.

Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC and Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761–766.

Meek GA (1976) Practical Electron Microscopy for Biologists (Wiley, New York)

Mittelstaedt T, Alvaréz-Baron E, and Schoch S (2010) RIM proteins and their role in synapse function. *Biol Chem* 391, 599–606.

Miyazaki T, Fukaya M, Shimizu H, and Watanabe M (2003) Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre–Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* 17, 2563–2572.

Miyazaki T, Yamasaki M, Hashimoto K, Yamazaki M, Abe M, Usui H, Kano M, Sakimura K, and Watanabe M (2012) $\text{Ca}_v2.1$ in cerebellar Purkinje cells regulates competitive excitatory synaptic wiring, cell survival, and cerebellar biochemical compartmentalization. *J Neurosci* 32, 1311–

1328.

- Miyazaki T and Watanabe M (2011) Development of an anatomical technique for visualizing the mode of climbing fiber innervation in Purkinje cells and its application to mutant mice lacking GluR δ 2 and Ca $_v$ 2.1. *Anat Sci Int* 86, 10–18.
- Nakagawa S, Watanabe M, Isobe T, Kondo H, and Inoue Y (1998) Cytological compartmentalization in the staggerer cerebellum, as revealed by calbindin immunohistochemistry for Purkinje cells. *J Comp Neurol* 395, 112–120.
- Nakayama H, Miyazaki T, Kitamura K, Hashimoto K, Yanagawa Y, Obata K, Sakimura K, Watanabe M, and Kano M (2012) GABAergic inhibition regulates developmental synapse elimination in the cerebellum. *Neuron* 74, 384–396.
- Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, and Somogyi P (1998) Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21, 545–559.
- Offermanns S, Hashimoto K, Watanabe M, Sun W, Kurihara H, Thompson RF, Inoue Y, Kano M, and Simon MI (1997) Impaired motor coordination and persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking G α_q . *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14089–14094.
- Ohtsuki G and Hirano T (2008) Bidirectional plasticity at developing climbing fiber–Purkinje neuron synapses. *Eur J Neurosci* 28, 2393–2400.
- Palay SL and Chan-Palay V (1974) Cerebellar Cortex: Cytology and Organization (Springer-Verlag, New York)
- Pätz C, Brachtendorf S, and Eilers J (2018) The transgenic mouse line *Igsf9-eGFP* allows targeted stimulation of inferior olive efferents. *J Neurosci Methods* 296, 84–92.
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, and Woolfrey KM (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 14, 285–293.
- Purves D and Lichtman JW (1980) Elimination of synapses in the developing nervous system. *Science* 210, 153–157.

- Richter KN, Revelo NH, Seitz KJ, Helm MS, Sarkar D, Saleeb RS, D'Este E, Eberle J, Wagner E, Vogl C, et al (2018) Glyoxal as an alternative fixative to formaldehyde in immunostaining and super-resolution microscopy. *EMBO J* 37, 139–159.
- Sheng M and Hoogenraad CC (2007) The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* 76, 823–847.
- Silver RA, Momiyama A, and Cull-Candy SG (1998) Locus of frequency-dependent depression identified with multiple-probability fluctuation analysis at rat climbing fibre–Purkinje cell synapses. *J Physiol* 510, 881–902.
- Sugihara I (2005) Microzonal projection and climbing fiber remodeling in single olivocerebellar axons of newborn rats at postnatal days 4–7. *J Comp Neurol* 487, 93–106.
- Takasaki C, Yamasaki M, Uchigashima M, Konno K, Yanagawa Y, and Watanabe M (2010) Cytochemical and cytological properties of perineuronal oligodendrocytes in the mouse cortex. *Eur J Neurosci* 32, 1326–1336.
- Uchigashima M, Ohtsuka T, Kobayashi K, and Watanabe M (2016) Dopamine synapse is a neuroligin-2-mediated contact between dopaminergic presynaptic and GABAergic postsynaptic structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 4206–4211.
- Uesaka N, Uchigashima M, Mikuni T, Nakazawa T, Nakao H, Hirai H, Aiba A, Watanabe M, and Kano M (2014) Retrograde semaphorin signaling regulates synapse elimination in the developing mouse brain. *Science* 344, 1020–1023.
- Uesaka N, Abe M, Konno K, Yamazaki M, Sakoori K, Watanabe T, Kao TH, Mikuni T, Watanabe M, Sakimura K, et al (2018) Retrograde signaling from progranulin to Sort1 counteracts synapse elimination in the developing cerebellum. *Neuron* 97, 796–805.
- Usowicz MM, Sugimori M, Cherksey B, and Llinás R (1992) P-type calcium channels in the somata and dendrites of adult cerebellar Purkinje cells. *Neuron* 9, 1185–1199.
- Wadiche JI and Jahr CE (2001) Multivesicular release at climbing fiber–Purkinje cell synapses. *Neuron* 32, 301–313.
- Wilson AM, Schalek R, Suissa-Peleg A, Jones TR, Knowles-Barley S, Pfister H, and Lichtman JW (2019) Developmental rewiring between cerebellar climbing fibers and Purkinje cells begins

with positive feedback synapse addition. *Cell Rep* 29, 2849–2861.

Yamasaki M, Fukaya M, Yamazaki M, Azechi H, Natsume R, Abe M, Sakimura K, and Watanabe M (2016) TARP γ -2 and γ -8 differentially control AMPAR density across Schaffer collateral/commissural synapses in the hippocampal CA1 area. *J Neurosci* 36, 4296–4312.

Yamazaki M, Fukaya M, Hashimoto K, Yamasaki M, Tsujita M, Itakura M, Abe M, Natsume R, Takahashi M, Kano M, et al (2010) TARPs γ -2 and γ -7 are essential for AMPA receptor expression in the cerebellum. *Eur J Neurosci* 31, 2204–2220.