



## 最近の研究と技術

# 小脳プルキンエ細胞とシナプス構築

## Synaptic Organization of Cerebellar Purkinje Cell

市川 量一<sup>a</sup>, 二宮 孝文<sup>a</sup>, 辰巳 治之<sup>a</sup>,  
渡辺 雅彦<sup>b</sup>

Ryoichi Ichikawa, Takafumi Ninomiya, Haruyuki Tatsumi and  
Masahiko Watanabe

<sup>a</sup>札幌医科大学医学部解剖学第一講座

<sup>b</sup>北海道大学大学院医学研究科解剖発生分野

**要旨** 超微形態像を連続的に観察することにより得たプルキンエ細胞のシナプス構築の再構築像によると、細胞体の近位領域では登上線維のみが、中間領域では登上線維と平行線維の両者が、遠位領域では平行線維のみが、スパイン上に興奮性シナプスを形成し、抑制性線維は全領域のシャフトにシナプスを形成する。形成、保持させる因子として、入力線維およびその電気活動、プルキンエ細胞に発現する特定の分子、などが挙げられている。

**キーワード**：シナプス構築、小脳、プルキンエ細胞、樹状突起、軸索

### 1. はじめに

中枢神経内の神経回路では、一般に、個々の情報は神経細胞と神経細胞との間の化学シナプスにより伝達される。情報の出力元である神経細胞はその軸索の膨化した bouton と呼ばれる部位に形成されたシナプス前部から開口分泌により神経伝達物質をシナプス間隙へと放出し、情報の受け手である神経細胞はその樹状突起に形成されたシナプス後部にある受容体にて情報を受け取る。受け手の細胞は、個々のシナプスで起きた電位変化および spike backpropagation など他の因子を統合して最終的な出力を産出する。そのため、神経細胞が適切な情報処理を遂行するためには、適切なシナプス構築が形成されること、具体的には神経細胞ごとに適切な入力線維が適切な樹状突起上の位置にシナプスを形成することが必要であると想定される。それゆえに、シナプス構築の詳細な解析は神経細胞の情報処理すなわち活動電位産生のメカニズムを解明するに際し有力な手掛りとなると考えられる。同時にシナプス構築の解析は、適切な情報処理をなす神経回路網

の形成機構を解明する上で、重要な情報を供与する。

シナプス構築を解析するにあたっての困難となる問題点は、1) 入力線維の区分、2) 全樹状突起を収容するに足る容積分の超薄切片の作成2点である。しかし、小脳プルキンエ細胞の場合ではその困難度が低下する、というのは、1) 興奮性線維が平行線維(顆粒細胞の軸索)と登上線維(下オリーブ核の神経細胞からの軸索)の2種類に限定される、2) また抑制性線維も星状細胞が樹状突起遠位部~近位部と線維ごとに分節して入力する、3) 樹状突起が二次元の面内にほぼ限局して広がっている、ためである。ただし、プルキンエ細胞には青斑核、縫線核からの線維の入力があるが微量であり解析する上であまり問題にはならない<sup>1-3)</sup>。そのため、シナプス構築の解析はプルキンエ細胞について多くがなされており、それらから得られた知見を以下に紹介する。

### 2. シナプス構築の解析の方法

シナプス構築像を得るためには、シナプスを同定しなければならない。近年では2光子レーザー顕微鏡など分解能の上昇した光学顕微鏡などを用いてシナプスを近似的に同定し解析する方法も開発されつつあるが、現時点では透過電子顕微鏡による連続観察が最も確実な方法である。また、超微形態の連続観察が可能とする走査電子顕微鏡など<sup>4,5)</sup>が開発されており、将来的にシナプス構築像の作製にあたって主流となる可能性も考えられるが、ここでは、筆者らが用いている透過電子顕微鏡によるシナプス構築像の再構築法を簡略に記述する<sup>6)</sup>。①登上線維の標識：マウス小脳のプルキンエ細胞を対象とする。興奮性入力線維の分別を容易にするため順行性の標識物質(例：BDA)をあらかじめ下オリーブ核に注入することで登上線維のみを選択的に標識、DAB 発色させる。それにより標識された登上線維を電子顕微鏡下で high density 像とする(図1, 2)。②連続超薄切片の作成：小脳を矢状断にて50 μm厚で切断し、組織化学反応、オスミウム固定、2%酢酸ウランへの十数時間の浸漬、脱水、エポン樹脂包埋までを行う。エポン樹脂をトリミングし、切片が軟膜と平行な面となるようにエポンロケットに接着剤を用いて付着させる。概ね、切断面が200-400 μm×50-200 μmとなるようにトリミングし、薄切を行う。例として、プルキンエ細胞の樹状突起が矢状断面内にて留まる傾向を示す4/5葉内に分布するプルキンエ細胞をとりあげると、軟膜からプルキンエ細胞の細胞体の下端まで、100 nm厚の超薄切片で概ね1700枚となる。それらを、1×2 mmの単孔メッシュにフォルムボール膜を張り、一個あたり20-40枚単位で乗せる。③観察：連続超薄切片を連続的に透過電子顕微鏡により観察。細胞体より樹状突起の本幹を終端まで追跡、対象物が含まれる画像を保存。保存された画像から、研究目的に応じた方法で、シナプス構築像を3次元再構築する。ちなみに、近位-遠位軸における各興奮性シナプスの分布を解析した際に使用した模式図を例として示す(図4B)。

<sup>a</sup> 〒060-8556 札幌市中央区南1条西17丁目  
TEL: 011-611-2111 内2632; FAX: 011-640-3002  
E-mail: richi@sapmed.ac.jp

<sup>b</sup> 〒060-8638 札幌市北区北16条西7丁目  
2008年8月17日受付

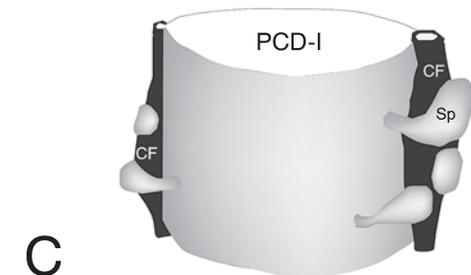
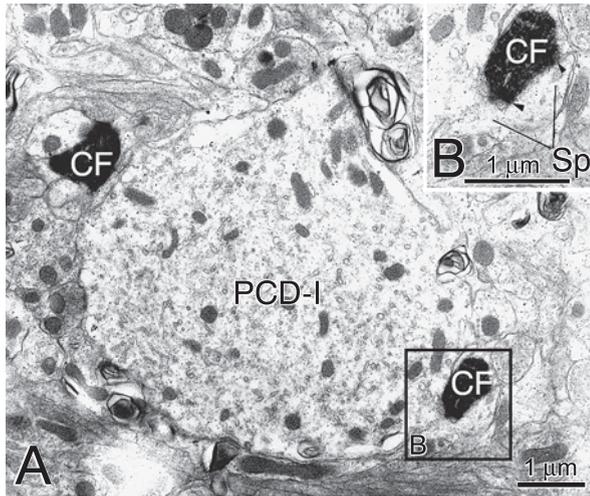


図1 プルキンエ細胞樹状突起の近位型を示す領域 (PCD-I) の水平断像 (A) とスパインの拡大像 (B), および3次元再構築した模式図 (C). BDAにより順行性に標識されDABにより染色された登上線維 (CF) が High density を呈する. Spは樹状突起からのスパインをし, 登上線維と興奮性シナプスを形成 (矢じり間).

### 3. マウスのプルキンエ細胞のシナプス構築

プルキンエ細胞のシナプス構築についての記述を簡便化するために, シナプス前終末を構成する興奮性線維の種類によって樹状突起を以下の3つの領域に区分する<sup>4)</sup>. ①近位型 (type I) 領域: 登上線維のみの入力, ②中間型 (type II) 領域: 登上線維と平行線維の混合入力, ③遠位型 (type III) 領域: 平行線維のみの入力, である. 以下は, これらの各領域のシナプス構築について記述する. なお, 定量化したデータは2ヶ月齢マウス小脳虫部の5/6葉に分布するプルキンエ細胞について計測したものを取り上げた.

#### 3.1 近位型 (type I) 領域

分布する興奮性シナプス (非対称性シナプス) の前線維は登上線維のみからなる領域であり, それは細胞体から連なり, 1~数回ほど等分岐した後に中間型へと移行するが, 途中で中間型あるいは遠位型を示す分枝を発生する (図4B, C). 超薄切片の枚数から見積もった樹状突起の全高に対する本幹におけるこの領域の高さは  $48.2 \pm 0.9\%$  (mean  $\pm$  SE) であった. 光学顕微鏡の所見によれば, 登上線維は一本の幹より発し, プルキンエ細胞層から軟膜方向に向けて樹状突起に伴走し概ね樹状突起の分岐と並行して分岐し, しばしば樹状突起を取

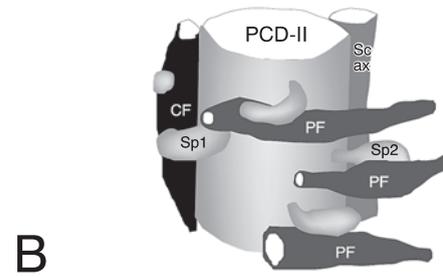
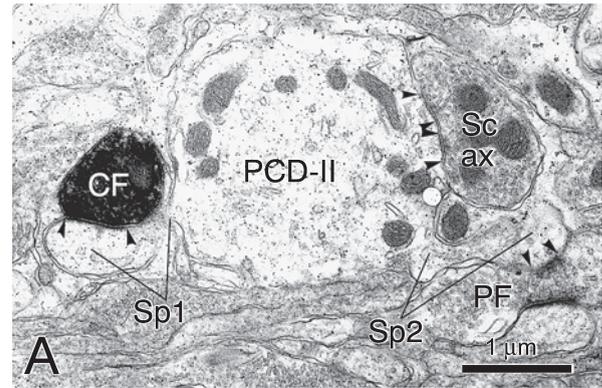


図2 プルキンエ細胞樹状突起の中間型を示す領域 (PCD-II) の水平断像 (A) および3次元再構築した模式図 (B). High density 像は, BDAにより順行性標識された登上線維 (CF). Sp1は登上線維 (CF) とシナプスを形成するスパイン, Sp2は平行線維 (PF) とシナプスを形成するスパイン, それぞれ興奮性シナプスを形成 (矢じり間). Sc-axは星状細胞の軸索であり樹状突起のシャフトとの間に抑制性シナプスを形成 (矢じり間).

り巻くような側枝 (蔦状分枝) を発する<sup>1,2)</sup>, と報告されている. 電子顕微鏡による観察から, 一つのプルキンエ細胞に入力する登上線維シナプスの前線維は全て伴走する一本の登上線維の枝由来であり, そのことは, 電気生理学的方法により得られたデータと一致する. シナプス後部は全てスパイン上に形成され, 逆に, スパインは全て登上線維シナプスを形成し, シナプスを形成しないスパインは見られない (図1, 4). 一方, 抑制性シナプス (対称性シナプス) は, 樹状突起のシャフト (スパイン以外の領域) に形成されており, 前線維は大部分が星状細胞由来であると考えられているが, 一部は籠細胞由来である可能性もある<sup>1,2)</sup>. 樹状突起上のスパイン密度および登上線維シナプスの密度 (高さあたりのシナプス数) は,  $1.47 \pm 0.11/\mu\text{m}$  であった.

#### 3.2 中間型 (type II) 領域

登上線維または平行線維の両者がシナプス前線維となる領域である. それは近位型領域より連なり, 本幹は1~数回ほど等分岐した後に遠位型へと移行するが, 途中で遠位型の側枝を分枝する (図4B, C). なお, 樹状突起の全高に対する中間型領域の高さは  $22.9 \pm 0.6\%$  であった. 登上線維シナプスの前線維は近位型と同様に全て伴走する登上線維の分枝である. 一方, 平行線維シナプスの前線維は多数の平行線維からなり, 一つのプルキンエ細胞が一本の平行線維から受け取るシナプス入力は一箇所のみである. 両者のシナプス後部は

全てスパイン上に形成され、スパインは全てどちらかの線維と興奮性シナプスを形成する(図2)。また、星状細胞の軸索により抑制性シナプスは樹状突起のシャフトに形成される(図2)。なお、樹状突起上のスパイン密度は、 $5.62 \pm 0.47/\mu\text{m}$ であり近位型領域に比べ約3倍増加している。その内、約1/3が登上線維シナプスを形成し、約2/3が平行線維シナプスを形成している。そのことは、中間型領域では、登上線維シナプスの密度は近位型とほぼ一致し、平行線維シナプスが新たに加わることにより、スパイン密度が増加したことを示している。

### 3.3 遠位型 (type III) 領域

分布する興奮性シナプスの前線維が全て平行線維である領域である、それは中間型領域より移行するか、近位型領域よりの分枝であるかのどちらかである(図4B, C)。樹状突起の全高に対する遠位型領域の高さは $28.9 \pm 1.2\%$ であり、中間型領域と概ね一致する。平行線維シナプスの前線維は中間型と同様に多数の平行線維からなり、シナプス後部は全てスパイン上に形成される。なお、スパインは全て平行線維とシナプスを形成する(図3, 4)。一方、シャフトには星状細胞の軸索との間に形成された抑制性シナプスがみられる。樹状突起上のスパインと平行線維シナプスの密度は、 $6.57 \pm 0.21/\mu\text{m}$ であり、中間型領域と比べさらに密度が増加する。この領域の樹状突起は、径が細くなる一方で突出するスパイン数が増加するため、spiny branchlet と呼ばれることが多い。

### 4. プルキンエ細胞のシナプス構築を形成、維持する機構

プルキンエ細胞のシナプス構築の形成、保持に関する機構についてさまざまな研究がなされており、現在までに明らかになった事柄について簡略に述べる。①発達期からの平行線維数の減少(発生期に線維の源である顆粒細胞数の産生を抑制):プルキンエ細胞の樹状突起の発育が障害され、登上線維が遠位部にまで進出、加えて自由スパイン(シナプスを形成しないスパイン)の出現<sup>3)</sup>。②成体での平行線維の減少

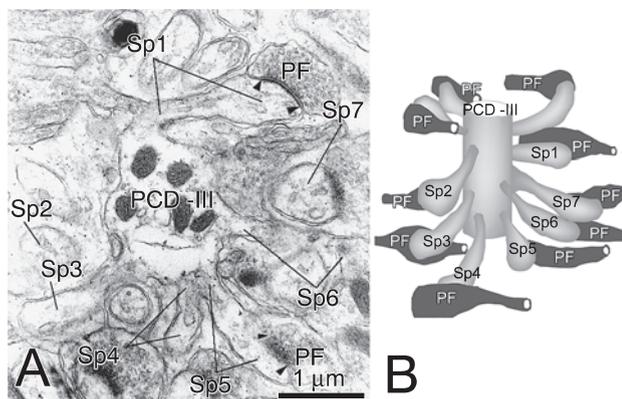


図3 プルキンエ細胞樹状突起の遠位型を示す領域(PDC-III)の水平断像(A)とその3次元再構築した模式図(B)。Sp1-7は樹状突起からのスパインを示し、平行線維との間に興奮性シナプス(矢じり間)を形成。

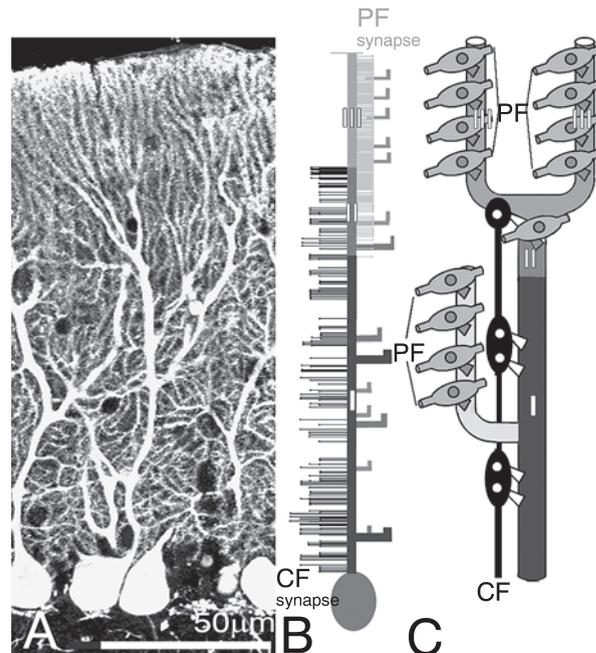


図4 プルキンエ細胞の光学顕微鏡像(A)、Calbindinを抗原とした免疫染色により標識。樹状突起上での基部から末端部までの興奮性シナプスの分布(B)、登上線維シナプスを黒にて樹状突起の左側に、平行線維シナプスを淡灰色にて右側に描画。シナプス構築からみたプルキンエ細胞の模式図(C)。近位部(I)では登上線維からシナプス入力を受け、中間部(II)では登上線維と平行線維の両者から入力を受け、遠位部(III)では平行線維のみから入力を受ける。

(半数以上を部分切除):一過性の自由スパインの出現、その後短時間でシナプス構築は回復。①~②よりプルキンエ細胞樹状突起の発育とシナプス構築形成には無傷の平行線維が必要であるが、成体期では一定量のみ平行線維の生存でシナプス構築の回復が可能であることを示している<sup>7)</sup>。③幼若期から登上線維を除去:樹状突起の発育にはほとんど影響を与えない。但し、近位型であるべき樹状突起領域に自由スパインと平行線維シナプスが出現<sup>8)</sup>。④成体期に登上線維を除去:近位型であるべき領域に自由スパインと平行線維シナプスが出現。残存する登上線維の側枝の再入力により自由スパインと平行線維シナプスの数は減少<sup>9)</sup>。⑤プルキンエ細胞への入力線維(主に登上線維)の電気活動を遮断:電気活動を再開した際も含め④と同様の結果がみられる<sup>10)</sup>。③~⑤より登上線維の電気活動は、近位型のシナプス構築の形成、維持に必要なものであるが、樹状突起の形成と遠位型シナプス構築の形成には影響を及ぼさない、ことを示している。また、一方の興奮性線維が欠失し残りの線維が支配領域を拡大しても、自由スパインは残存する。そのことは、遠位部には平行線維シナプスを、近位部には登上線維シナプスをそれぞれ特異的に安定化し維持させる分子機構が発現することを示唆する。平行線維シナプスの維持に働くものとして、プルキンエ細胞側にグルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット<sup>6)</sup>、平行線維側にCB1n1分子<sup>11)</sup>が発現し、登上線維シナプスの維持にはプル

キンエ細胞側にP/Q型カルシウムチャンネル $\alpha 1A$ サブユニット<sup>12)</sup>が発現することが、それぞれ報告されている。

シナプス構築の3次元再構築法による解析は、電気生理学的手法および神経数理科学的手法と連携することにより、神経細胞の活動電位発生のメカニズム解明に寄与すると考えられ、今後、プルキンエ細胞以外の神経細胞にその方法を適応できるよう模索していく必要がある。また、シナプス構築の形成については、電気活動依存性の機構とは別に、初期発生期には形成を誘引し成熟期には安定化させる分子機構がそれぞれ存在することが明らかとなった。今後は、シナプス構築を形成する分子機構の詳細を明らかにするとともに、他の系での同様な分子機構を明らかにすることが望まれる。

#### 文 献

- 1) Ramo'n y Cajal, S.: Histologie du syste'me nerveux de l'homme et des verte'bres, vol II., Maloine, Paris, 1911
- 2) Palay, S. and Chan-Palay, V.: Cerebellar cortex. Cytology and organization, Springer-Verlag, New York, 1974
- 3) Altman, J. and Bayer, S.A.: Development of the cerebellar system: in relation to its evolution, structure, and functions, CRC Press, Boca Raton, 1997
- 4) Knott, G., Marchaman, H., Wall, D. and Lich, B.: *J. Neurosci.*, **28**, 2959 (2008)
- 5) Briggman, K.L. and Denk, W.: *COIN.*, **16**, 562 (2006)
- 6) Ichikawa, R., Miyazaki, T., Kano, M., Hashikawa, T., Sakimura, K., Mishina, M., Inoue, Y. and Watanabe, M.: *J. Neurosci.*, **22**, 8487 (2002)
- 7) Chen, S. and Hillman, D.E.: *Brain Res.*, **333**, 369 (1985)
- 8) Sotelo, C. and Arsenio-Nunes, M.L.: *Brain Res.*, **111**, 289 (1976)
- 9) Rossi, F., van der Want, J.J., Wiklund, L. and Strata, P.: *J. Comp. Neurol.*, **308**, 536 (1991)
- 10) Morando, L., Cesa, R., Rasetti, R., Harvey, R. and Strata, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9954 (2001)
- 11) Hirai, H., Pang, Z., Bao, D., Miyazaki, T., Li, L., Miura, E., Parris, J., Rong, Y., Watanabe, M., Yuzaki, M. and Morgan, J.I.: *Nat. Neurosci.*, **8**, 1534 (2005)
- 12) Miyazaki, T., Hashimoto, K., Shin, H.S., Kano, M. and Watanabe, M.: *J. Neurosci.*, **24**, 1734 (2004)