

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	伊藤 祥子
論文題目	培養下における小脳顆粒細胞の特異的シナプス形成		
（論文内容の要旨） 脳には莫大な数の神経細胞が存在するが、それぞれ特定の相手と特異的にシナプス結合する。しかしその認識機構は分かっていない。初代神経細胞培養は、観察が容易であるため、神経生物学の研究にしばしば利用されるが、シナプス形成における標的特異性は培養下では再現されないだろうと考えられてきた。本研究では、培養下の神経細胞が、はたしてシナプス結合における特異性を示さないのかどうか、小脳皮質回路を構成する細胞を用いて再検証している。 小脳の顆粒細胞は、生体内で、橋核に由来する苔状線維と特異的にシナプスを形成する。一方、下オリーブ核から小脳へ投射する登上線維とはシナプス形成しない。申請者は、小脳の顆粒細胞を、橋核または下オリーブ核の外植片と共培養を行い、シナプス形成における特異性が再現されるかどうか検証した。生体内でシナプスを形成しない組み合わせとして、顆粒細胞と海馬の軸索の共培養も併せて行った。 申請者は、まず、顆粒細胞と橋核の軸索は、培養下でも生体内の場合と同様な形態的特徴を有するシナプスを形成することを明らかにした。すなわち、顆粒細胞の樹状突起は、その末端部分のみで橋核の軸索とシナプスを形成するが、これが培養下でも再現された。一方、下オリーブ核や海馬の軸索と共培養した場合には、シナプス形成自体は起きたが、橋核との組み合わせで見られた樹状突起の末端特異的なシナプス形成ではなく、樹状突起全体に分散するようにシナプスが形成された。よって、培養下の顆粒細胞は、本来の標的の軸索と出会ったときには生体内と同様な様式でシナプスを形成するが、誤った標的の軸索とはそのようなシナプスを形成できないことが分かった。次に、FM色素を用いて、それぞれの組み合わせにおけるシナプスのリサイクリング活性を調べた。顆粒細胞と橋核軸索と共培養で形成されたシナプスは正常なリサイクリング活性を示したが、誤った組み合わせではシナプス小胞の取り込みは起きるが、排出がうまくいっていないことが示唆された。 以上の結果から、小脳顆粒細胞は、培養下においても、本来の標的の軸索とのみ、正常な形態および生理活性を持ったシナプスを形成することが明らかになった。この結果は、神経細胞は培養下でも正しい標的を認識する機構を保持していることを示している。			

(論文審査の結果の要旨)

脳の神経回路は、発生段階において神経細胞が正しく標的を認識し特異的なシナプス形成を行うことで形成される。しかし培養下では神経細胞は特異的なシナプス形成を行えないだろうと一般的に考えられてきた。本論文では、神経細胞がほんとうに培養下では標的を認識できないのだろうかという疑問を提出し、これを再検証している。

申請者は、本研究のために小脳皮質回路に注目した。小脳の顆粒細胞は橋核などから小脳へ投射する苔状線維とシナプスを形成するが、下オリーブ核から投射される登上線維とはシナプスを形成しない。そこで、申請者は顆粒細胞と橋核または下オリーブ核の外植片を共培養し、それぞれの培養でシナプス形成が起きるかどうかを調べることにより、培養下での特異的なシナプス形成の有無を検討した。また、顆粒細胞と正常では出会うことのない海馬の神経細胞との共培養も行った。これらの実験では、外植片をGFPトランスジェニックマウスから分離して、顆粒細胞由来の軸索と外植片由来の軸索とを厳密に区別することにより解析の精度を高めている。

実験の結果、まず、神経細胞の組み合わせによって軸索と樹状突起の接触の仕方に違いがあることを明らかにしている。橋核の軸索は顆粒細胞の樹状突起を無視して伸長するが、下オリーブ核、海馬の軸索は顆粒細胞の樹状突起に接触し、特に沿い合うものが目立った。次にシナプス形成について調べている。橋核の軸索と顆粒細胞を共培養した場合、生体内と同様、顆粒細胞樹状突起の末端に、特有な形態をもったシナプスが形成された。一方、誤った組み合わせでの共培養では、顆粒細胞はそのようなシナプス形成を行わず、シナプスは樹状突起上に散在するように分布した。さらに、シナプスの生理活性について、FM色素を用いてシナプス小胞リサイクリングを調べ、苔状線維との組み合わせで形成されたシナプスは正常なリサイクリング活性を有するが、誤った組み合わせで形成されたシナプスでは、小胞の取り込みは正常に起きるものの排出に欠陥があることを明らかにしている。

これらの結果から、申請者は、培養系においても、顆粒細胞は苔状線維と出会った時にのみ形態的にも生理的にも正常なシナプスを形成することを明快に示すことに成功している。これにより、培養下でも神経間の認識がおきることが証明された。また、本発見により、特異的なシナプス形成の機構の解明のために培養神経細胞を利用できることが明らかとなり、この分野の発展に大いに寄与するものと期待される。

以上の理由から本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。平成22年1月27日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日