

博士論文

シナプス後 GluD 2 による
シナプス前可塑性制御機構の解析

京都大学大学院 理学研究科

生物科学専攻 生物物理学教室

機能統合学講座 機能構造認識分野

山下愛美

要旨

神経細胞間ではシナプスを介して情報が伝達される。シナプスでは、伝達効率がその活動状況に応じて変わるシナプス可塑性という現象が知られており、記憶や学習の細胞レベルでの基礎過程と考えられている。小脳皮質にはプルキンエ細胞という唯一の出力細胞があり、顆粒細胞の平行線維から興奮性のシナプス入力を受ける。平行線維・プルキンエ細胞間シナプスは、哺乳類の中枢神経系において最多のシナプスであり、そこでのシナプス可塑性の一種である長期抑圧は、小脳依存的運動学習に重要な役割を果たすと考えられている。グルタミン酸受容体関連分子 $\delta 2$ (GluD2) は、この小脳平行線維・プルキンエ細胞間シナプスの後部特異的に発現している。GluD2 はシナプス後部で起こる長期抑圧誘導にかかわると共に、シナプス前終末にある Neurexin と結合することで、シナプス前終末の分化誘導を行う。しかし、GluD2 がどのような分子メカニズムを介してシナプス前終末の機能調節を行うかは不明である。

本研究で私は、シナプス後部にある GluD2 の欠損がシナプス前終末特性に与える影響を、シナプスを 2 回連続刺激した時の応答の大きさの比である paired pulse ratio (PPR) に着目して検討した。PPR は GluD2 欠損マウスで野生型マウスと比べて大きい。シナプス後部のグルタミン酸と受容体の結合の飽和を阻害した状況にしても、GluD2 欠損マウスの PPR は野生型より大きかった。この結果は、シナプス前終末における放出機構の違いにより GluD2 欠損マウスと野生型マウスの PPR に違いが生じていることを示唆した。実験および理論モデルによる解析により、GluD2 欠損マウスではシナプス前終末への Ca^{2+} 流入量が減少しているか、伝達物質放出に必要な Ca^{2+} 濃度が増加している可能性が考えられた。GluD2 はシナプス前終末にある Neurexin との結合を介してシナプス前終末の形成誘導を行い、Neurexin はシナプス前終末に局在する電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介して伝達物質放出の

制御を行う。そこで私は、GluD2 欠損が電位依存性 Ca^{2+} チャネルの機能へ及ぼす影響を調べた。電位依存性 Ca^{2+} チャネルの選択的ブロッカーを用いた実験により、GluD2 欠損マウスでは P/Q、N 型 Ca^{2+} チャネルは正常だが、R 型 Ca^{2+} チャネルが機能していないことがわかった。平行線維・プルキンエ細胞間シナプス前終末においては、シナプス可塑性の一種である長期増強が起こり、それは R 型 Ca^{2+} チャネル依存的であることが報告されていた。私は GluD2 欠損マウスで、このシナプス前性の長期増強が障害されていることも示した。

以上の結果より、GluD2 欠損によりシナプス前終末にある R 型 Ca^{2+} チャネルの機能または発現が障害され、その結果シナプス小胞の放出確率が低下し、シナプス前部変化による長期増強の誘導が阻害されたと考えられる。シナプス後部の GluD2 は、シナプス前部の R 型 Ca^{2+} チャネルを介して、伝達物質放出の制御に関与することが明らかになった。

目次

要旨 3

目次 5

導入 6

材料と方法 . . . 18

結果 23

考察 38

参考文献 45

謝辞 55

導入

シナプス伝達

神経細胞間ではシナプスを介して情報が伝達される。シナプス前部の神経軸索終末より放出される神経伝達物質は、シナプス後部の細胞膜上に存在する各種受容体に結合し(図 1)、細胞内に情報を伝達するほか、シナプス前部の軸索やその終末に存在する受容体にも作用し、伝達物質の放出を調節する。また、シナプスには受容体のほか、イオンチャネル、酵素、細胞接着分子、およびこれらに結合するタンパク質が集積しており、これらも受容体下流の情報伝達を担うとともに、シナプスの形成や受容体の機能と局在を、短期または長期にわたって変化させることによって、神経伝達の調節を行っている。

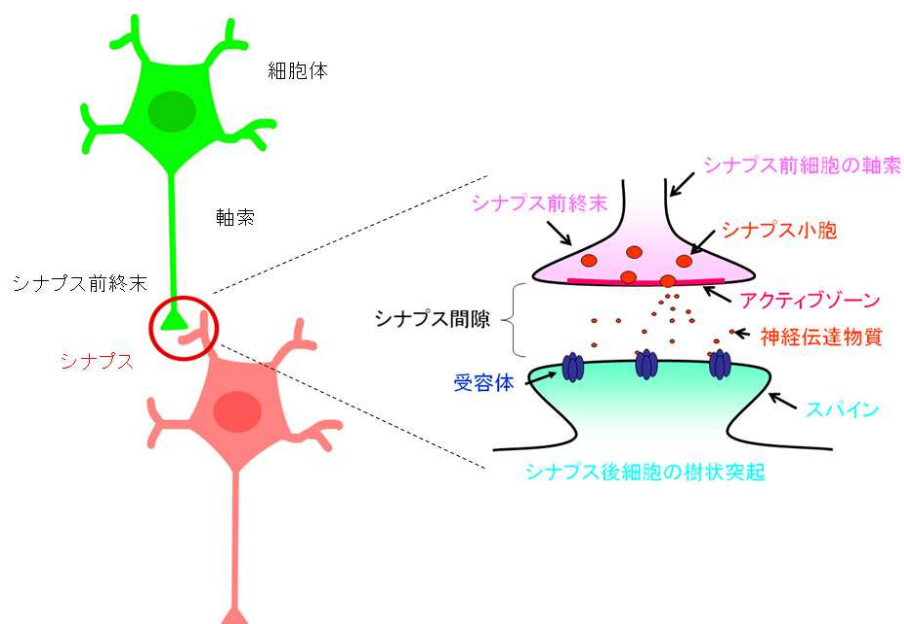


図 1

神経細胞間ではシナプスを介して情報が伝達される。シナプス前終末から神経伝達物質を含むシナプス小胞が放出され、神経伝達物質がシナプス後部にある受容体に結合する。

シナプスには化学シナプスと電気シナプスがあるが、中枢神経系のほとんどのシナプスは化学シナプスである。化学シナプスでは、シナプス前膜と後膜の間にシナプス間隙(約 20 nm)があり、電気信号は直接伝わらない。シナプス前終末に到達した電気信号(活動電位)は神経伝達物質放出という化学信号に変換される。神経伝達物質はシナプス間隙を拡散して

シナプス後膜に達し、特異的受容体に結合し、これを活性化する。受容体にはイオン透過性を上昇させるイオンチャネル型受容体と、GTP 結合タンパク質など細胞内情報伝達系を介してイオンチャネル活性等を調節する代謝型受容体とがある。活動電位を発生しやすくさせるシナプス電位を興奮性シナプス後電位(EPSP)、活動電位の発生を抑えるものを抑制性シナプス後電位(IPSP)と呼ぶ。

神経伝達物質の開口放出

グルタミン酸・アセチルコリン・ γ アミノ酪酸(GABA)などの神経伝達物質は、直径約 50 nm のシナプス小胞に充填され、シナプス小胞はシナプス前末端に集積している。グルタミン酸はシナプス小胞性グルタミン酸輸送体 vglut によりシナプス小胞に充填される。小胞膜がシナプス前部細胞膜と融合し、内部の物質を放出することを開口放出(エキソサイトーシス)と呼ぶ。シナプス小胞の開口放出には Ca^{2+} の細胞外からの流入が必要である。シナプス前末端部へ活動電位が伝わり、シナプス前末端部が脱分極し、開口した P/Q 型・N 型・R 型 Ca^{2+} チャネルより Ca^{2+} が流入する(図 2)。哺乳類聴覚系の大型シナプス前終末(calyx of Held)では、caged Ca^{2+} の uncaging により細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させると、開口放出が生じることが示されている(Schneggenbureger and Neher, 2000)。単位時間あたりの小胞の開口放出数は、細胞内 Ca^{2+} 濃度 $2\text{-}8\mu\text{M}$ の約 4 乗に比例することが知られている(Kochubey et al., 2011)。

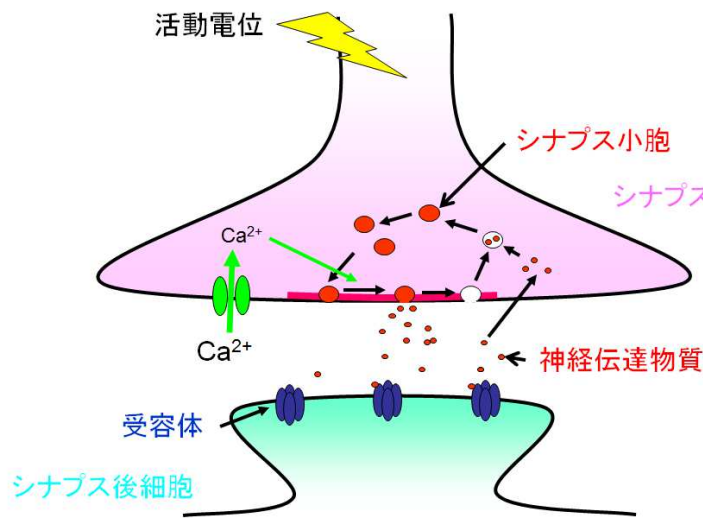


図 2 活動電位が伝わるとシナプス前末端部が脱分極し、電位依存性 Ca^{2+} チャネルより Ca^{2+} が流入し、開口放出が促される。

シナプス前開口放出の経過

シナプス小胞は細胞骨格であるアクチン線維に小胞膜タンパク質である synapsin を介して結合し、貯蔵されている。貯蔵プールにあるシナプス小胞は、活動電位到達時、直ちには利用できないが、リン酸化によって遊離される。遊離したシナプス小胞は、細胞膜近くのアクティブゾーン近傍につなぎとめられる(ドッキング)。RIM、Munc13 等のタンパク質がアクティブゾーンの基質を構成している (Sudhof, 2012)。SNARE(soluble NSF attachment protein receptor)タンパク質である VAMP、syntaxin、SNAP25 もドッキングに関与する。ドッキングした小胞は準備段階(プライミング)を経て、 Ca^{2+} 依存的に開口放出される。ドッキング、プライミング過程にあるシナプス小胞が即時放出可能プールを構成する(Yamaguchi et al., 2002)。VAMP、syntaxin、SNAP25 の三者の結合は強く、SNARE コアコンプレックスを形成し、神経伝達物質の開口放出に寄与している。 Ca^{2+} センサータンパク質の最有力候補である synaptotagmin は、膜融合を Ca^{2+} 流入直前まで抑制するが、 Ca^{2+} 流入により脱抑制され、同期的膜融合を引き起こすと考えられている(Chen and Scheller, 2001)。開口放出後は、細胞膜に融合したシナプス小胞膜はエンドサイトーシスにより細胞膜から回収される(Murthy and Camilli, 2003)。細胞膜に AP2、amphiphysin が結合し、clathrin に被膜された細胞膜が陥入し、陥入部のくびれを dynamin がくびり切る。エンドサイトーシスされたシナプス小胞は、clathrin 被覆の離脱、神経伝達物質の再充填を

経て、再び開口放出に用いられる。

受容体

シナプス後部膜上に存在する神経伝達物質の受容体は、大きくイオンチャネル型と代謝型に分類される。イオンチャネル型受容体は、神経伝達物質が結合することにより立体構造変化が起こり、内在するイオンチャネル部位が開口し、特定のイオンを選択的に透過して速い神経伝達に関与する。一方、代謝型受容体は 7 回膜貫通型の構造を有し、神経伝達物質の結合による立体構造変化により、三量体 G タンパク質を活性化して細胞内シグナル伝達を行い、神経細胞の機能修飾にかかわる。同一の神経伝達物質に対して、イオンチャネル型と代謝型の受容体が存在する例が多い。また、受容体はシナプス前終末側の細胞膜上およびグリア細胞膜上にも存在し、細胞の膜電位の調節や伝達物質の放出の制御等にも関わっている。それぞれの神経伝達物質に対する受容体サブユニットは多種類あり、サブユニットの組み合わせによって機能的多様性が生み出されている。

イオンチャネル型グルタミン酸受容体

イオンチャネル型グルタミン酸受容体は速い興奮性の神経伝達を担うとともに、神経回路形成、シナプス可塑性、記憶・学習などの高次脳機能、脳虚血時の神経細胞死等にかかわる重要な分子である。イオンチャネル型グルタミン酸受容体は、薬理学的に NMDA 型、AMPA 型、Kainate 型に分類され、その機能が解析されてきた(図 3)。遺伝子クローニングにより、イオンチャネル型グルタミン酸受容体は 4 つのサブタイプに分類され、18 種類のサブユニットが含まれることが明らかになった(Hollmann and Heinemann, 1994)(図 3)。アミノ酸配列の相同性に基づき、サブタイプの 1 つとして δ 型が同定されたが、グルタミン酸との結合およびチャネル活性は確認されていない。

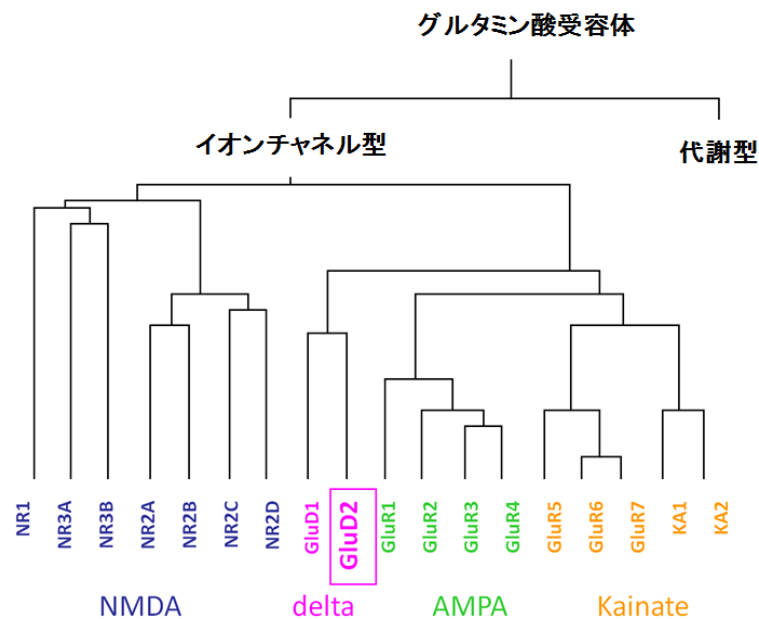


図 3 グルタミン酸受容体はイオンチャネル型と代謝型に分類される。イオンチャネル型グルタミン酸受容体は、さらに NMDA 型、delta 型、AMPA 型、Kainate 型に分類される。

シナプス可塑性

脳の中の多くの部位において、シナプスの伝達効率は一定に固定されたものではなく、その活動状況等に応じて変わることが知られており、シナプス可塑性と呼ばれている。神経細胞は外界からの刺激に応じてその機能や構造を可塑的に変化させ、さらにそれが長時間持続することで、学習や記憶などの高次脳機能を実現していると考えられる。シナプス後部の受容体数または機能の変化によるシナプス後性の可塑性と、シナプス前終末からの伝達物質の放出量または放出確率の変化によるシナプス前性の可塑性が知られている (Citri and Malenka, 2008)。

シナプス形成

神経細胞から伸長した軸索の末端は、軸索誘導によりその標的細胞近辺に到達する。シナプス形成は、軸索とその標的の間にシナプスができる神経回路形成における重要なプロセスである。シナプス形成に際しては、シナプス前部とシナプス後部の標的細胞が正しく結合することが必要である。シナプス前部と後部が対面し、シナプス前部ではシナプス小胞の蓄積・ Ca^{2+} チャネルの集積が起こり、シナプス後部では神経伝達物質受容体が集積する。

シナプス形成時には、シナプス前部とシナプス後部の間で、Neurexin、Neurologin 等、様々な分子の相互作用が起こる。

小脳

小脳は姿勢と運動の制御を行う他、運動プランニング・認知・情動・言語などの非運動性機能にも関わっている。

小脳皮質は規則正しい層構造をしており、神経回路も詳しく調べられている (Neuroscience 3rd, 2004 年参照)。小脳皮質は表層側から分子層・プルキンエ細胞層・顆粒細胞層の三層で構成される。小脳皮質には、プルキンエ細胞・顆粒細胞・ゴルジ細胞・バスケット細胞・星状細胞という 5 種類の神経細胞があり、秩序だった配置を示す(図 4)。小脳皮質唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞は GABA を伝達物質とする抑制性出力ニューロンで、その軸索は小脳核または前庭小脳核に投射している。プルキンエ細胞の細胞周囲には、バークマングリアとよばれる特殊な星状膠細胞が配列し、プルキンエ細胞の細胞体・樹状突起・シナプスを取り囲み、神経細胞のはたらきを支えている。プルキンエ細胞は延髄にある下オリーブ核から登上線維を介して、また顆粒細胞から平行線維を介してグルタミン酸を伝達物質とする興奮性のシナプス入力を受ける。また、バスケット細胞・星状細胞から GABA を伝達物質とする抑制性のシナプス入力を受ける。ゴルジ細胞は、顆粒細胞へ GABA を伝達物質とする抑制性の出力を送っている。

小脳皮質での主要な情報の流れは、苔状線維から顆粒細胞・プルキンエ細胞を通り、小脳核への出力と考えられている。この間に抑制性介在神経細胞によって皮質内の調節を、また登上線維からの入力によって皮質外からの調節を受ける。

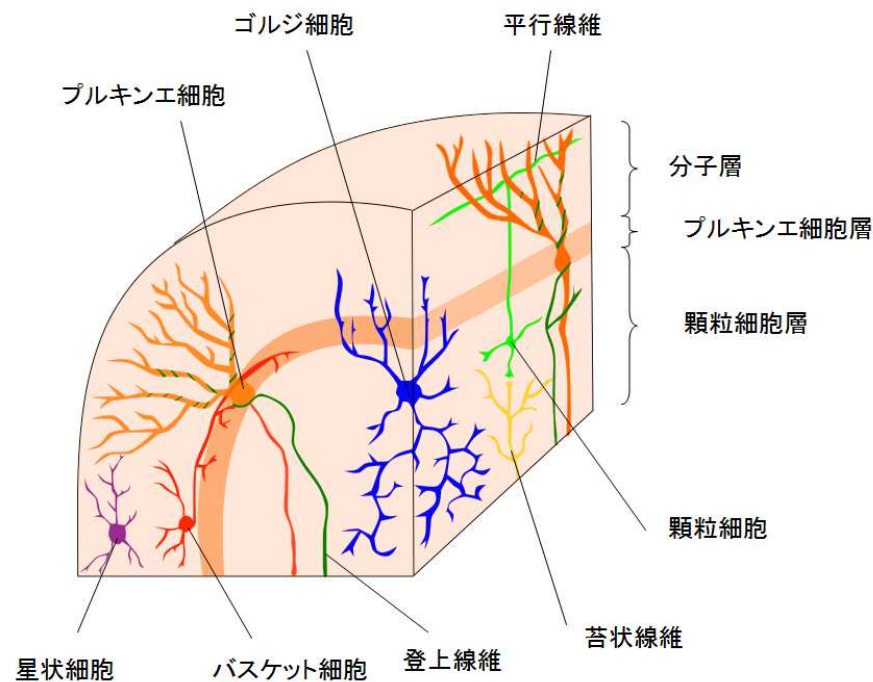


図 4 小脳皮質は秩序だった三層構造をもつ。小脳皮質唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞は、平行線維と登上線維から興奮性入力を受ける。

小脳と運動学習

小脳は大腦皮質から実行すべき運動プランを、脊髄から実行中の運動情報を受け取り、求める運動とのずれを修正することで運動を制御する (Raymond and Lisberger, 1996; Ito, 2002; Boyden et al., 2004)。この機能は経験により変化するため、小脳は運動学習の中核と言われる。具体的な小脳依存的運動学習の例として、頭部のゆっくりした動きに伴う網膜像のずれを、視覚情報により補正する視機性眼球運動の適応現象、および前庭器官からの情報を用いて頭部の回転を補償するように動眼筋を動かして、視野の安定を図る前庭動眼反射の適応現象が知られている (Robinson, 1981)。

長期抑圧

長期抑圧はシナプス可塑性の一種で、シナプス伝達効率が長期的に減弱する現象であり、小脳においてよく知られているシナプス可塑性である。そして小脳の長期抑圧は運動学習の基盤となる現象と考えられている (Ito, 2001)。この長期抑圧は、プルキンエ細胞において、主要な情報を担う平行線維からの入力と、もう 1 つの興奮性入力である登上線維から

の入力が同期して繰り返された時に、それ以降の平行線維からの入力に対するプルキンエ細胞の応答が小さくなる現象である (Ito, 1989)。主要情報に誤りがあった時に、登上線維を介して誤差信号が入り、誤った情報経路の伝達を弱め修正する機構と考えられる (Marr, 1969; Albus, 1971)。

長期増強

長期増強はシナプス可塑性の一種で、シナプス伝達効率が長期的に増強する現象である。平行線維-プルキンエ細胞間シナプスでは、シナプス前細胞からのグルタミン酸の放出増加によって起こる長期増強 (Hirano, 1990, 1991; Salin et al., 1996; Chavis et al., 1998) と、シナプス後細胞のグルタミン酸に対する応答性が上昇することによって起こる長期増強 (Lev-Ram et al., 2002, 2003; Coesmans et al., 2004; Kakegawa and Yuzaki, 2005) の 2 種類が知られている。

グルタミン酸受容体関連分子 GluD2

グルタミン酸受容体関連分子 $\delta 2$ (GluD2) は、そのアミノ酸配列の相同性からイオンチャネル型グルタミン酸受容体に分類されるが、グルタミン酸との結合およびチャネル活性は認められていない (Hirano, 2006; Mandolesi et al., 2009 参照)。GluD2 は小脳プルキンエ細胞特異的に発現しており、さらに細胞内では平行線維とのシナプス部位に局在しており、登上線維とのシナプス部位には存在しない (Araki et al., 1993; Landsend et al., 1997)。アンチセンスヌクレオチドを用いた実験および GluD2 欠損マウスを用いた実験から、長期抑圧発現に必須であることがわかっている (Hirano et al., 1994; Kashiwabuchi et al., 1995)。GluD2 欠損マウスでは長期抑圧が起こらず、小脳疾患でしばしば観察されるような顕著な運動失調と不随意性眼振が認められる (Kashiwabuchi et al., 1995; Funabiki et al., 1995; Yoshida et al., 2004)。組織レベルでは、平行線維-プルキンエ細胞間シナプスが半減する

(Kurihara et al., 1997)。また、発生過程で生じる過剰な登上線維終末が除去されることなく残り、プルキンエ細胞は登上線維の多重投射を受ける (Kashiwabuchi et al., 1995; Hashimoto et al., 2001)。

GluD2 は細胞外 N 末端に LIVBP ドメイン・LAOBP ドメインがあり、また 3 つの膜貫通部位と 1 つの膜内ループを有し、C 末端は細胞内にある。細胞内は細胞膜側から A サイト・Ep サイト・Ec サイト・S サイト・T サイトの 5 つの部位にわけられる。GluD2 の各部位に様々な分子が結合することで GluD2 の機能が調節されると考えられている(図 5)。

GluD2 は、細胞外 LIVBP ドメインで分泌たんぱく質である cbln と結合し、cbln はシナプス前終末にあるニューレキシンと結合する。この三者の結合を介してシナプス前終末の形成誘導および維持を行っている(Uemura et al., 2010; Matsuda et al., 2010)。一方、細胞内 A サイトは小胞体からの GluD2 の輸送をコントロールする (Matsuda et al., 2004)。Ep サイトは、長期抑圧時に AMPA 受容体と結合することで AMPA 受容体を細胞内に取り込む PICK1 (Yawata et al., 2006)と結合する。Ec サイトは GluD2 のエンドサイトーシスに関与する。S サイトには足場タンパクである Shank1-2 が結合し、GluD2 は Shank を介して細胞骨格・AMPA 受容体・mGluR と間接的に結合する (Uemura et al., 2004)。また S サイトにはアダプタータンパク質である AP-4 も結合する (Yap et al., 2003)。C 末端 T サイトには PSD-93 (Roche et al., 1999)、S-SCAM (Yap et al., 2003)、Delphilin (Miyagi et al., 2002)、spectrin (Hirai and Matsuda, 1999)、PTPMEG (Hironaka et al., 2000)、nPIST (Yue et al., 2002)が結合する。T サイトを欠損させたトランスジェニックマウスが作成されており、長期抑圧不全を示す (Uemura et al., 2007)。しかし、GluD2 欠損マウスで見られるような平行線維-プルキンエ細胞間シナプスが半減するといった異常は観察されない。このことから、GluD2 サブユニットの T サイトは Ep サイトとともに、シナプス後部で起こる長期抑圧誘導に重要な役割を果たしていると考えられる。また、GluD2 欠損マウスでは、PPR が野生型マウスに比べて大きいことが報告されており (Kashiwabuchi et al., 1995)、

GluD2 のシナプス前終末機能制御への関与が考えられた。

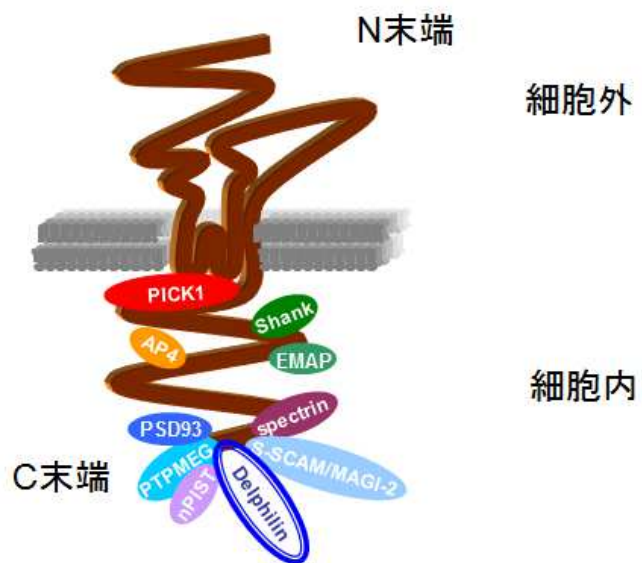


図 5 グルタミン酸受容体関連分子
GluD2(茶色)は、細胞外 N 末でシナプ
ス形成を誘導し、細胞内 C 末領域で
長期抑圧に関与する。

本研究の目的

本研究の目的は、小脳の平行線維・プルキンエ細胞間シナプスにおいて、シナプス後部の GluD2 がシナプス前部からの伝達物質放出に及ぼす影響を明らかにすることである。

平行線維・プルキンエ細胞間シナプスは、中枢神経系において最も数が多いシナプスである(Ito, 2006)。このシナプス後部では、グルタミン酸受容体関連分子である GluD2 が特異的に発現している(Takayama et al., 1995)。GluD2 はアミノ酸配列の相同性からイオン透過型グルタミン酸受容体ファミリーに分類されたが、グルタミン酸との結合およびチャネル活性は確認されていないタンパク質である(Araki et al., 1993; Lomeli et al., 1993; Schmid et al., 2009; Mandolesi et al., 2009; Yuzaki, 2009; Hirano, 2012)。GluD2 欠損マウスでは、シナプス後部における長期抑圧不全、運動学習障害、平行線維・プルキンエ細胞間シナプス数の減少が報告されている(Kashiwabuchi et al., 1995)。GluD2 は、細胞内 C 末領域で長期抑圧を(Yawata et al., 2006; Kohda et al., 2007; Uemura et al., 2007; Torashima et al., 2009)、細胞外 N 末領域で平行線維シナプス前終末の分化に関与している(Kuroyanagi et al., 2009; Uemura et al., 2010; Matsuda et al., 2010)。GluD2 は N 末 flap loop で平行線維終末から分泌される cerebellin precursor protein (cbln) と結合し(Kuroyanagi and Hirano, 2010)、cbln はシナプス前終末にある Neurexin と結合する(Uemura et al., 2010; Matsuda and Yuzaki, 2011)。GluD2-cbln-Neurexin の結合は、平行線維・プルキンエ細胞間シナプスの形成・成熟・維持に寄与している。

GluD2 は cbln を介したシナプス前部分子の Neurexin 結合により、平行線維終末におけるシナプス小胞の放出を制御していると考えられる。なぜなら、2 回連続刺激時の興奮性シナプス後電流(EPSC)の大きさの比である paired pulse ratio (PPR)が、GluD2 欠損マウスで大きいことが報告されているからである(Kashiwabuchi et al., 1995; Kuroyanagi et al., 2009)。PPR は一般的に、シナプス前終末におけるシナプス小胞の放出確率に関連して変化すると考えられてきた(Debanne et al., 1996; Hashimoto and Kano, 1998)。シナプス前終

末に局在する Neurexin は、電位依存性 Ca^{2+} チャネルに作用して放出確率を制御することが知られており (Missler et al., 2003; Zhang et al., 2005)、平行線維終末では P/Q 型、N 型、R 型 Ca^{2+} チャネルが働いている (Mintz et al., 1995; Myoga and Regehr, 2011)。以上から GluD2 は、Neurexin との結合を介して電位依存性 Ca^{2+} チャネルを制御して、シナプス小胞の放出確率に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、本研究では、シナプス後部の GluD2 がシナプス前部の機能を制御するメカニズムを Ca^{2+} チャネル機能に着目して検証した。

PPR は、シナプス後部におけるグルタミン酸と受容体結合の飽和度によっても影響され得るので (Wadiche and Jahr, 2001; Foster et al., 2005)、私は GluD2 欠損マウスで PPR が大きくなっている要因を、シナプス前部か後部依存性かを検討することから研究を始め、その後シナプス前部に関する解析を行った。上述したように、GluD2 で電位依存性 Ca^{2+} チャネルが変化している可能性が考えられたが、私はまずシナプス伝達効率と PPR に影響を及ぼす要因を理論計算を用いて一般的に検討した。その結果、GluD2 欠損マウスでは、シナプス前終末での Ca^{2+} 流入が減少しているか、伝達物質放出により多くの Ca^{2+} 濃度上昇が必要となっていることが示唆された。そこで、次に Ca^{2+} 流入機構に焦点を絞った解析を行い、R 型 Ca^{2+} チャネルが GluD2 欠損マウスではたっていないことを見出した。最近、平行線維・プルキンエ細胞間シナプス前部ではシナプス前部変化による長期増強が起こり、それは R 型 Ca^{2+} チャネルに依存することが報告された (Myoga and Regehr, 2011)。そこで私は、GluD2 欠損マウスにおいて、シナプス前性の長期増強が変化していないかも調べた。一連の研究により、GluD2 はシナプス前部の R 型 Ca^{2+} チャネルが働くことを促し、シナプス前性の長期増強発現にも寄与することが判明した。

材料と方法

動物

実験には、ICR 系統の GluD2 遺伝子欠損マウスと野生型マウスを用いた。

小脳切片作成

生後 14 日齢から 18 日齢のマウスをジエチルエーテル麻酔した後、解剖用鉗で脳を取り出し、O₂ 95%, CO₂ 5%の混合ガスを発砲し、氷冷した Krebs 溶液 (124 mM NaCl, 1.8 mM KCl, 1.24 mM KH₂PO₄, 1.3 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 10 mM Glucose)に入れて 3~5 分間冷却した。小脳を取り出し、切片作成皿上に接着剤 (アロンアルファ)で固定し、冷却した RDS 溶液 (130 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 33 mM Glucose, 5 mM HEPES, pH7.4)で満たした後、マイクロスライサー (堂阪イーエム)で矢状断面で切り出した。厚さは 250 μ m にした。

作成した小脳切片は、O₂ 95%, CO₂ 5%の混合ガスを発泡した Krebs 溶液に浸し、室温 (22-24°C)で 1 時間以上保存してから実験に使用した。

パッチクランプ法

小脳スライス標本はナイロン繊維グリッドで固定した。小脳スライス標本からの電気記録には、ステージ固定式正立顕微鏡 (OLYMPUS)とマイクロマニピレータ (SUTTER INSTRUMENT COMPANY)、パッチクランプ用増幅器として HEKA 社の EPC10/2 を用いた。記録データの解析には Patch Master (HEKA)を用いた。灌流外液には上述の混合ガスを発泡した Krebs 溶液を用い、液面の高さが一定に保たれるように灌流した。灌流外液には GABA_A 受容体阻害剤である Bicucullin (20 μ M)を投与し、抑制性シナプス伝達を阻

害し、興奮性シナプス後電流(EPSC)を測定した。電極内液には、K-Gluconate 内液 (120 mM K-Gluconate, 9 mM KCl, 3.48 mM MgCl₂, 4 mM NaCl, 10 mM HEPES, 4 mM Mg-ATP, 0.4 mM Na-GTP, 17.5 mM sucrose, KOH, pH7.3)を用いた。記録電極には 2.5-4 MΩ のガラス管を用い、実験は室温 (22-24℃)で行った。ガラス管刺激電極は、分子層に置き平行線維を刺激して、2 回刺激による Paired Pulse Facilitation (PPF, 1 回目の刺激応答に対する 2 回目の刺激応答が大きくなる現象)を確認した。EPSC の記録は、0.1 Hz または 0.2 Hz で行った。

理論計算

PPR の数理モデルは、連続的なシナプス活性化時の増強・減弱について以前に報告されているモデル(Dittman et al., 2000; Lee et al., 2009)を簡略化する形で作成した。mEPSC の大きさの平均値(α)、放出部位の総数(N)、放出可能な小胞がある放出部位の割合(R)、放出可能な小胞の放出確率(P)を用いて EPSC の大きさを表すと次式(1)になる。

$$EPSC = \alpha \cdot N \cdot R \cdot P \quad (1)$$

シナプス後部におけるグルタミン酸と受容体の結合の飽和効果を除いて考えると、最初の刺激による EPSC の応答を EPSC1、2 度目の刺激による EPSC の応答を EPSC2 とおくと、PPR は次式(2)で表せる。

$$PPR = \frac{EPSC2}{EPSC1} = \frac{R_2 P_2}{R_1 P_1} \quad (2)$$

活動電位により定常状態の Ca²⁺濃度(Ca_{base})から上昇する Ca²⁺濃度(Ca_{inc})を用いて、シナプス前終末での Ca²⁺濃度上昇([Ca²⁺]_{i_1st})は次式(3)で表せる。

$$[Ca^{2+}]_{i_{1st}} = Ca_{base} + Ca_{inc} \quad (3)$$

シナプス小胞の放出機構は Ca²⁺濃度の 4 乗に比例すると仮定すると、1 度目の活動電位による放出確率 P₁ は次式(4)で表せる。

$$P_1 = \frac{1}{1 + \left(\frac{K_{Ca}}{Ca_{base} + Ca_{inc}} \right)^4} \quad (4)$$

ここで K_{Ca} は放出可能なシナプス小胞の放出確率が 50% になるときの細胞内 Ca^{2+} 濃度である。

Ca^{2+} 濃度上昇が単純に指数関数的に定常状態まで減弱するとして、その時定数を τ_0 とすると、時間 t における細胞内 Ca^{2+} 濃度は次式(5)で表せる。

$$[Ca^{2+}]_i(t) = Ca_{base} + Ca_{inc} \cdot e^{\frac{-t}{\tau_0}} \quad (5)$$

時間 t における 2 度目の活動電位による細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_{i_2nd}(t)$) は、次式(6)で表せる。

$$[Ca^{2+}]_{i_2nd}(t) = Ca_{base} + Ca_{inc} \left(1 + e^{\frac{-t}{\tau_0}} \right) \quad (6)$$

上記の式では、2 度目の活動電位による Ca^{2+} 濃度上昇 Ca_{inc} は 1 度目の活動電位による濃度上昇と同じであると仮定しているが、2 度目の活動電位による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は残存 Ca^{2+} 濃度に依存することが報告されている(Mochida, 2011)。また、 K_{Ca} がメカニズムは不明であるが、 Ca^{2+} 濃度により変化することもわかっている。しかしながらここでは、簡略化のためこのような効果は考慮に入れずにモデルを構築した。そうすると、2 度目の活動電位による放出確率 P_2 は次式(7)で表される。

$$P_2(t) = \frac{1}{1 + \left(\frac{K_{Ca}}{Ca_{base} + Ca_{inc} \left(1 + e^{\frac{-t}{\tau_0}} \right)} \right)^4} \quad (7)$$

放出可能なシナプス小胞の割合 R の初期値は 1 とした(式 8)。

$$R_1 = 1 \quad (8)$$

1 回目の放出直後の R は $1 - P_1$ になる。以前のシナプス前終末における小胞放出機構のモデルでは、細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存して放出可能小胞の補填が行われることが示唆されている (Dittman et al., 2000; Lee et al., 2009)。本研究におけるモデルの使用目的は、野生型と GluD2 欠損型マウスでの PPR の違いの要因を推測することなので、新たなシナプス小胞の補填は Ca^{2+} 濃度に非依存적であり、補填は指数関数的に行われることとし、そのときの時定数を τ_1 とした。2 回目の活動電位到達時 t における放出可能なシナプス小胞の割合を $R_2(t)$ で表すと、次式(9)のようになる。

$$R_2(t) = 1 - P_1 \cdot e^{\frac{-t}{\tau_1}} \quad (9)$$

式(2), (4), (7), (8), (9)より、PPR は Ca_{base} 、 Ca_{inc} 、 K_{Ca} 、 τ_0 、 τ_1 、5 つのパラメータを用いて次式(10)で表せる。

$$PPR(t) = \frac{1 + \left(\frac{K_{\text{Ca}}}{\text{Ca}_{\text{inc}} + \text{Ca}_{\text{base}}} \right)^4 - e^{\frac{-t}{\tau_1}}}{1 + \left(\frac{K_{\text{Ca}}}{\text{Ca}_{\text{base}} + \text{Ca}_{\text{inc}} (1 + e^{\frac{-t}{\tau_0}})} \right)^4} \quad (10)$$

上記モデルは、古典的な残存 Ca^{2+} 仮説に基づくものであり (Katz and Miledi, 1968)、この考え方は最近のモデルを用いた研究でも用いられている (Lee et al., 2009)。本モデルにおいては、シナプス前終末には区画が 1 つだけであると仮定し、放出は Ca^{2+} 上昇時にのみ起こるとしている。以上述べてきたように、今回のモデルは様々な現象を簡略化した一次近似である。PPR の統計的な計算は、マイクロソフト社のエクセルを用いた。定常状態の細胞内 Ca^{2+} 濃度 Ca_{base} を $0.05 \mu\text{M}$ 、小胞放出が 50% になる Ca^{2+} 濃度 K_{Ca} を $5 \mu\text{M}$ とした (van den Bogaart et al., 2012)。そして、野生型マウスの実験データに最小二乗法を用いて他の

パラメータの値を決定した。

統計

すべての値は $\text{mean} \pm \text{SEM}$ で表している。特筆しない場合、統計解析として two-way ANOVA、Dunnett test、Student's t-test を適用した。 $p < 0.05$ のときに有意差ありとした。

結果

シナプス後部におけるグルタミン酸と AMPA 受容体の結合飽和の PPR への影響

まず、ICR 系統の GluD2 欠損マウスにおいて、以前報告されていた C57/B6 系統のマウスでと同様に、野生型マウスと比べて PPR が大きくなっていることを確認した。平行線維を 10、20、50、100、200 ms の間隔で 2 回連続刺激して EPSC を記録し、1 回目の興奮性シナプス応答 (EPSC) の大きさに対する 2 回目の EPSC の大きさの比 (Paired Pulse Ratio ; PPR) を求めた。PPR は、野生型に比べて GluD2 欠損マウスで有意に大きくなっていた ($p < 0.001$, ANOVA)。刺激間隔が 50 ms の時の PPR は、野生型で 1.69 ± 0.03 ($n = 58$)、GluD2 欠損型で 2.04 ± 0.05 ($n = 65$)であった。

シナプス前終末からの神経伝達物質の放出機構のみならず、シナプス後部における受容体の結合状況が PPR に影響を与えることが知られている(Wadiche and Jahr, 2001; Foster et al., 2005)。最近、免疫組織染色実験により、GluD2 欠損マウスでは平行線維-プルキンエ細胞間シナプス後部において、AMPA 受容体が増えているということが報告された(Yamasaki et al., 2011)。したがって、GluD2 欠損マウスと野生型マウスではシナプス後部での受容体の状況が異なり、それが原因で両者の PPR が異なる可能性が考えられる。飽和度が高い方が PPR は小さくなると推定される。そこで、シナプス後部におけるグルタミン酸と受容体の結合の飽和度が異なるか否かを調べることにした。

グルタミン酸と受容体結合の飽和を緩和するために、DGG という低親和性の AMPA 受容体の競合阻害剤を用いた(Wadiche and Jahr, 2001)。DGG を 2mM 投与すると、野生型マウス(40.0 ± 1.8 %, $n = 5$, $p = 0.009$, Student's t-test) および GluD2 欠損マウスにおいて(35.8 ± 3.0 %, $n = 5$, $p < 0.001$)EPSC の大きさは有意に減少した(図 6a)。EPSC 抑制は GluD2 欠損マウスにおいて、わずかに強かった($p = 0.045$, Student's t-test)。これは GluD2 欠損マウスにおいて、シナプス後部におけるグルタミン酸と受容体結合の飽和度が低いことを示唆しており、この飽和度の違いでは PPR の差は説明できない。DGG はまた、野生

型マウスでも GluD2 欠損型マウスでも PPR を有意に大きくした(+/, $p < 0.001$; -/, $p = 0.002$, Dunnett test) (図 6b-d)。DGG 存在下における PPR (50 ms 間隔) は野生型で 2.06 ± 0.12 ($n = 9$)、GluD2 欠損型で 2.54 ± 0.12 ($n = 9$)であった。重要な点は、DGG 存在下であっても PPR は野生型に比べ、GluD2 欠損型で有意に大きかったことである($p < 0.001$, ANOVA)。このことは、シナプス後部におけるグルタミン酸と AMPA 受容体の結合の飽和度の違いのみでは、PPR の差を説明できないことを意味している。これらの結果より、GluD2 欠損マウスではシナプス小胞の放出機能が変化していることが示唆された。

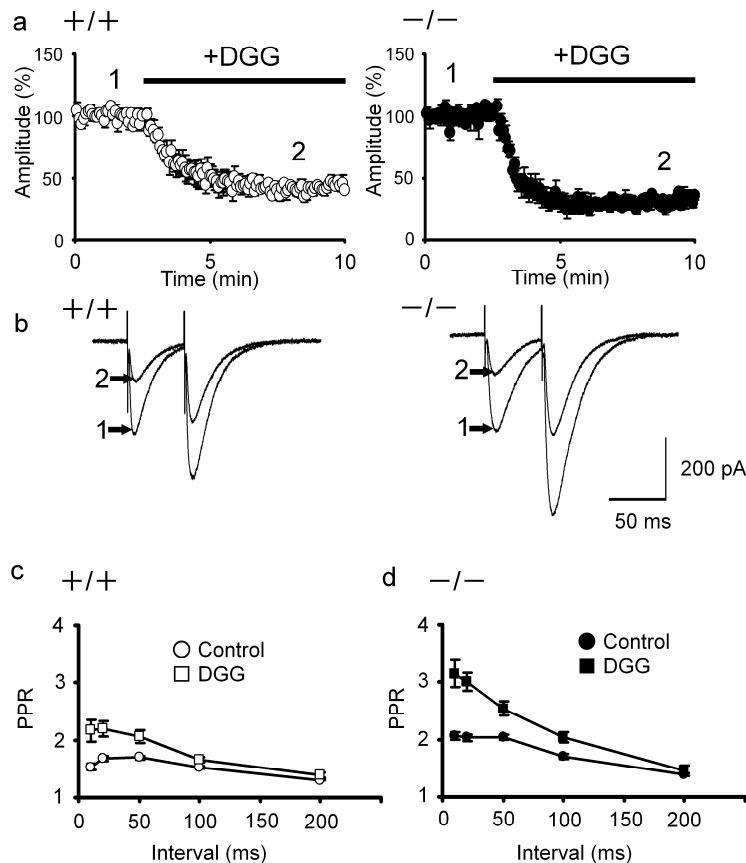


図 6
シナプス後部におけるグルタミン酸と受容体結合飽和が PPR に与える影響。結合の飽和を DGG で抑制した。(a)DGG 投与による EPSC 抑制効果。左、野生型(+/, $n = 5$)、右、GluD2 欠損型(-/, $n = 5$)。(b)DGG 投与前(1)、後(2)の 2 回連続刺激時の EPSC の応答。(c,d)様々な刺激間隔における PPR。円は DGG 非存在下、四角は DGG 存在下での記録。(c)野生型(+/, $n = 9$)。(d)GluD2 欠損型(-/, $n = 9$)。

PPR に影響を及ぼすシナプス前部要因の理論的検討

次に、シナプス前部におけるいかなる要因が PPR に影響し得るのかを、理論的に検討した。

PPR に影響し得る要因として 4 つの要素が考えられる。それらは、シナプス前終末への Ca^{2+}

の流入量、シナプス小胞放出機構の Ca^{2+} 依存性、2 回連続刺激時において、1 度目の活動電位により上昇したシナプス前終末における Ca^{2+} 濃度が定常状態に戻るまでの時定数、そしてシナプス小胞が放出された後、新しいシナプス小胞が放出部位に再充填されるまでの時定数である。以前に報告された連続刺激時の EPSC 変化のモデル(Lee et al., 2009)の簡略化版を方法の章で記したように作成した。ここでは、要点のみを簡潔に説明する。GluD2 欠損型マウスにおいて、どの要因が変化しているのかを検討するために、これらの要因を以下のパラメータで表現した。(1) シナプス前終末への Ca^{2+} の流入量(Ca_{inc})、(2)放出可能な部位にあるシナプス小胞の半数が放出される細胞内 Ca^{2+} 濃度(K_{Ca})、(3)細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇回復の時定数(τ_0)、(4)放出部位に新たなシナプス小胞が補填される時定数(τ_1) (図 7a)。EPSC の素量の大きさと放出部位数は一回目の刺激により変化しないと仮定すると、刺激間隔 t における PPR は前述した式(2)により

$$\text{PPR}(t) = \frac{\text{EPSC2}(t)}{\text{EPSC1}} = \frac{R_2(t)P_2(t)}{R_1P_1} \quad (2)$$

と表せる。

ここで P_1 と $P_2(t)$ を一回目と二回目の刺激に応じた放出確率とし、 R_1 と $R_2(t)$ を放出可能なシナプス小胞の割合とすると、PPR(t) は上記パラメータを用いて式(10)で表せる。

$$\text{PPR}(t) = \frac{1 + \left(\frac{K_{\text{Ca}}}{\text{Ca}_{\text{inc}} + \text{Ca}_{\text{base}}} \right)^4 - e^{\frac{-t}{\tau_1}}}{1 + \left(\frac{K_{\text{Ca}}}{\text{Ca}_{\text{base}} + \text{Ca}_{\text{inc}}(1 + e^{\frac{-t}{\tau_0}})} \right)^4} \quad (10)$$

Ca_{base} を $0.05 \mu\text{M}$ 、 K_{Ca} を $5 \mu\text{M}$ (van den Bogaart et al., 2012)とし、最小二乗法を用いて、他のパラメータを野生型マウスの PPR のデータに合うようフィッティングして求めた (図 7c-f. 理論値、黒実線; 実験データ、黒破線)。そうしたところ、 $\text{Ca}_{\text{inc}} = 4.35 \mu\text{M}$ 、 $\tau_0 = 97.0 \text{ ms}$ 、 $\tau_1 = 87.1 \text{ ms}$ という値が得られた。これらの値は以前に報告されている平行線維-プル

キンエ細胞間シナプスにおけるモデルで使用された値に近いものになった (Lee et al., 2009)。

次に、GluD2 欠損型マウスにおける PPR 増大の要因となりうる要素を、各パラメータを変化させて探索した (図 7b)。Ca_{inc} を 4.35 から 4.01 μM に、K_{Ca} を 5.0 から 5.42 μM に、または τ_1 を 87.1 から 14.6 ms にすると比較的良く GluD2 欠損型のデータを近似できた (図 7c,d,f)。 τ_0 に関しては、97 ms から 137 ms にすると最も良く適合したが、短い刺激間隔において PPR の時間経過は、実験データと大きく異なっていた (図 7e)。これらの結果から GluD2 欠損による PPR の増大は放出確率の低下か、放出部位へのシナプス小胞の補填が早くなったためだと考えられる。

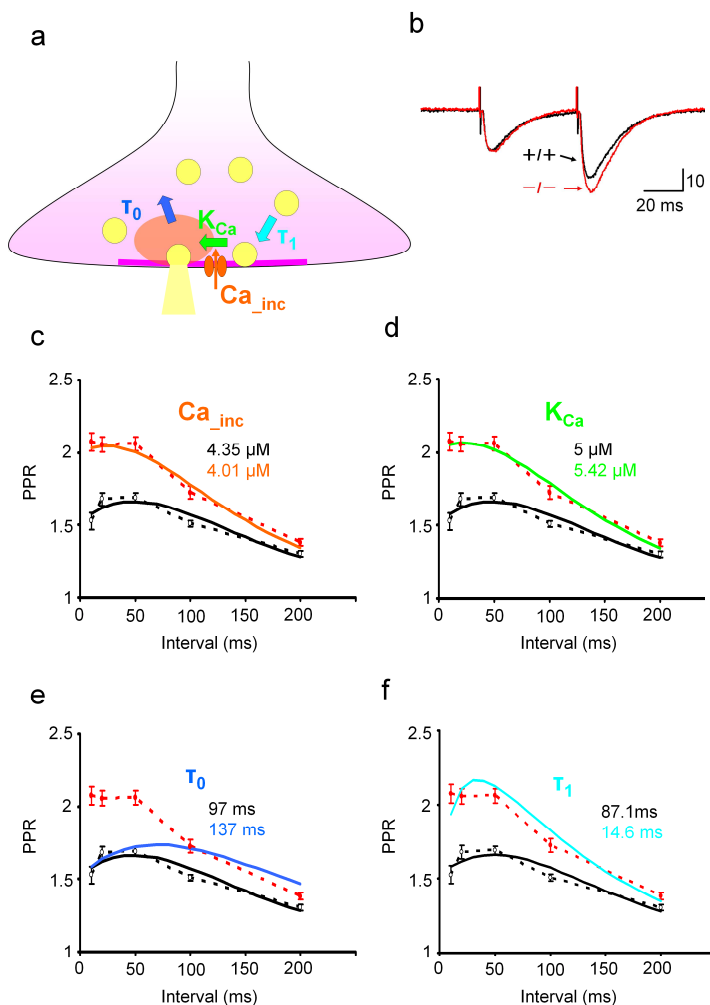


図 7

PPR に影響し得るシナプス前終末における要因。(a) PPR に関与する要因の概略図。Ca²⁺流入量(Ca_{inc})、細胞内 Ca²⁺濃度上昇が定常状態に戻るまでの時定数(τ_0)、シナプス小胞放出に必要な Ca²⁺濃度 (K_{Ca})、放出部位に新たな小胞が補填される時定数(τ_1)。(b) 連続刺激時の EPSC トレース。黒は野生型(+/-)、赤は GluD2 欠損型(-/-)。(c-f) 野生型(黒・破線)と GluD2 欠損型(赤・破線)の PPR 実験データおよび野生型(黒・実線)と GluD2 欠損型(色つき実線)の理論式を用いて計算した PPR 値。実験により求めた PPR データ(破線)は、図 6c,d で示したデータと同じものを用いた。式(10)の Ca_{inc} (c)、K_{Ca} (d)、 τ_0 (e)、 τ_1 (f)、各々の値を GluD2 欠損型 PPR データに合うように設定して、理論値曲線(赤、緑、青、水色の実線)を描いた。

次に、GluD2 欠損マウスで Ca_{inc} 、 K_{Ca} 、 τ_1 のいずれが変わっているかを推測することを試みた。まず、式(10)を用いて、様々な刺激間隔の PPR を異なる Ca_{inc} で計算した(図 8a)。そうしたところ、PPR の変化は、中程度の Ca_{inc} で大きく、初期値($4.35 \mu M$)の 0.3 倍、0.4 倍といった低 Ca_{inc} および 1.3 倍、1.4 倍といった高 Ca_{inc} で小さかった。この検討より、遺伝子型が異なるマウス間の PPR の差は、 Ca_{inc} に依存することが示唆された。

この理論予測を実験的に検討するため、細胞外液の Ca^{2+} 濃度を変え (1 mM または 4 mM)、PPR を測定した。 $1 \text{ mM } Ca^{2+}$ を含む細胞外液中では、 50 ms 間隔での PPR は野生型で 2.64 ± 0.10 ($n = 9$)、GluD2 欠損型で 2.57 ± 0.16 ($n = 6$)であった(図 8c)。PPR は $2.5 \text{ mM } [Ca^{2+}]_o$ のときと比べて、野生型でも ($p < 0.001$, Dunnett test) GluD2 欠損型マウスでも ($p = 0.009$) 有意に大きくなっていたが、遺伝子型が異なるマウス間では差が検出されなかった ($p = 0.87$, ANOVA)。 $4 \text{ mM } [Ca^{2+}]_o$ においては、PPR は野生型で 1.22 ± 0.04 ($n = 9$)、GluD2 欠損型で 1.27 ± 0.08 ($n = 6$)だった(図 8d)。PPR は $2.5 \text{ mM } [Ca^{2+}]_o$ に比べて野生型でも ($p < 0.001$, Dunnett test) GluD2 欠損型でも ($p < 0.001$) 有意に小さくなっていた。また、両遺伝子型での PPR の違いは検出されなかった ($p = 0.40$, ANOVA)。すなわち、両遺伝子型間での PPR の違いは、中濃度の Ca^{2+} 濃度でのみ検出された(図 8b)。

次に、 Ca_{inc} 、 K_{Ca} 、 τ_1 のうちいずれが GluD2 欠損による変化を説明できるかを、PPR の Ca^{2+} 濃度依存性に着目して調べた。前述したように、 $2.5 \text{ mM } [Ca^{2+}]_o$ での野生型の PPR は、 $K_{Ca} = 5 \mu M$ 、 $\tau_0 = 97 \text{ ms}$ 、 $\tau_1 = 87.1 \text{ ms}$ で最もよく近似できた。パラメータを 1 つだけ変化させて、GluD2 欠損型の PPR の理論値($PPR_{-/-}$)を計算して、GluD2 欠損型の実験データに適合させることを試みた。各パラメータを $K_{Ca} = 5.42 \mu M$ 、 $\tau_0 = 14.6 \text{ ms}$ 、 $\tau_1 = 137 \text{ ms}$ にした時に、 $2.5 \text{ mM } [Ca^{2+}]_o$ における GluD2 欠損マウスのデータの最も良い近似が得られていたので、これらの値を用いて $PPR_{-/-}/PPR_{+/+}$ を各 Ca_{inc} で計算して、その値をプロットした(図 8f-h)。 Ca_{inc} に関しては、値を 4.35 mM から 4.01 mM にすると GluD2 欠損型の $2.5 \text{ mM } [Ca^{2+}]_o$ の実験データの最適近似が得られていたので、 Ca_{inc} を野生型の

4.01/4.35 倍にセットした上で、様々な野生型 Ca_{inc} における $PPR_{-/-}/PPR_{+/+}$ を計算してプロットした(図 8e)。そうしたところ、GluD2 欠損型で Ca_{inc} または K_{Ca} を変えた場合には、中濃度の Ca_{inc} で最大値をとる放射線状カーブが得られた(図 8e,f)。これらの結果は、実験データ(図 8b)と似た傾向となった。一方、 τ_0 を変化させた場合は、 $PPR_{-/-}/PPR_{+/+}$ は Ca_{inc} が小さいときは差が大きく、大きいと差が小さくなる傾向があった(図 8g)。また、 τ_1 を 87.1 から 14.6 ms にして $PPR_{-/-}/PPR_{+/+}$ を計算した場合は、 Ca_{inc} が小さいときは差が小さく、大きいと差が大きくなる傾向があった(図 8h)。これらの理論曲線(図 8g,h)は、実験データ(図 8b)と異なっていた。以上の結果を合わせて考えると、GluD2 欠損マウスでは Ca_{inc} が減少するか K_{Ca} が大きくなることにより、シナプス前終末でのシナプス小胞の放出確率が低下していると考えられる。

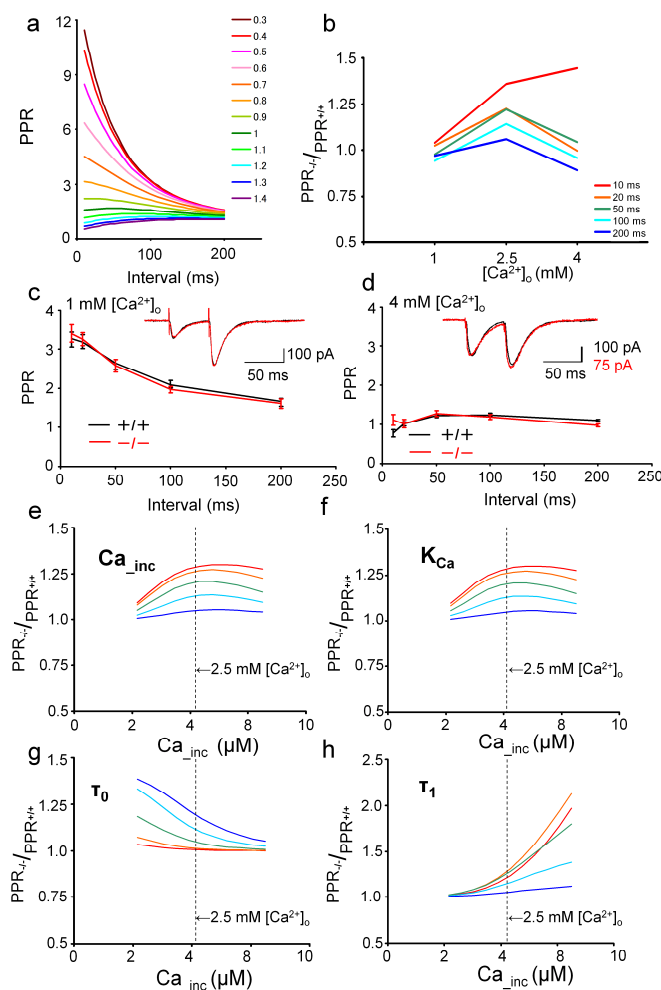


図 8

細胞外液中の Ca^{2+} 濃度が PPR に与える影響。(a)式(10)を用いて、 Ca_{inc} を変化させて、PPR の理論値を計算した。右の数字は、 Ca_{inc} を $4.35 \mu M$ の何倍にして PPR を計算したかを示している。(b) 両遺伝子型間での PPR の比。外液の Ca^{2+} 濃度を変化させたときの GluD2 欠損型での PPR 値を野生型の PPR 値で割った値を示している。(c,d)外液の Ca^{2+} 濃度を 1 mM(c)または 4 mM(d)にして測定した PPR。野生型(+/, 黒)および GluD2 欠損型(-/-, 赤)。2 回連続刺激時の EPSC トレースも示した。(e-h) Ca_{inc} 依存的な PPR 比変化を、式(10)を用いて計算した。外液 Ca^{2+} 濃度が 2.5 mM に相当する Ca_{inc} は $4.35 \mu M$ (点線)とした。e では GluD2 欠損マウスの Ca_{inc} を野生型の 4.01/4.35 倍にした上で、野生型における各 Ca_{inc} での PPR 比を計算した。f-h では GluD2 欠損型の K_{Ca} , τ_0 , τ_1 を、外液 2.5mM におけるデータを最も良く近似するように定めて PPR 比を計算した。

GluD2 欠損型マウスでは R 型 Ca^{2+} チャンネルが機能していない

上述した結果は、GluD2 欠損マウスでは Ca^{2+} 流入が変化しているか、伝達物質放出に、より高濃度の Ca^{2+} が必要になっていることを示唆した。そこで次に、シナプス前終末において、シナプス小胞の放出確率を下げている分子を明らかにすることを試みた。GluD2 はシナプス前終末にある Neurexin と分泌タンパク質である cbln を介して平行線維-プルキンエ間シナプス形成を誘導することが報告されている(Uemura et al., 2010)。また、Neurexin はシナプス前終末にある電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介してシナプス小胞の放出を制御していることも報告されている(Missler et al., 2003; Zhang et al., 2005)。これらの報告とこれまでの結果を考え合わせると、GluD2 欠損により、シナプス前終末にある電位依存性 Ca^{2+} チャンネルに何らかの変化がある可能性が考えられた。平行線維終末には、P/Q、N、R 型の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが存在している(Mintz et al., 1995; Myoga and Regehr, 2011)。そこで、これらの Ca^{2+} チャンネルが GluD2 欠損マウスで変化しているのではないかと推測し、各 Ca^{2+} チャンネルの特異的な阻害剤を用いて、そのシナプス伝達への作用を検討することにした。

P/Q 型 Ca^{2+} チャンネルの阻害剤である ω -agatoxin IVA (AgTx) は、EPSC の大きさを顕著に減少させ (+/+, $9.2 \pm 1.7 \%$, $n = 5$, $p < 0.001$; -/-, $9.6 \pm 2.8 \%$, $n = 5$, $p < 0.001$, Student's t-test)、また PPR を増加させた(+/, 2.14 ± 0.10 at 50 ms, $n = 9$, $p < 0.001$; -/-, 2.45 ± 0.19 , $n = 9$, $p = 0.017$, Dunnett test) (図 9)。この結果より、P/Q 型 Ca^{2+} チャンネルは平行線維終末において伝達物質放出への寄与度が大きいという以前の報告(Mintz et al., 1995; Myoga and Regehr, 2011)を確認でき、また P/Q 型 Ca^{2+} チャンネルは GluD2 欠損マウスでも伝達物質放出に大きな寄与をしていることがわかった。ところで、P/Q 型 Ca^{2+} チャンネル阻害後の PPR の大きさは、野生型と GluD2 欠損マウス間で差がなかった($p = 0.34$, ANOVA)。これ

らの結果は、P/Q 型 Ca^{2+} チャネルの違いが遺伝子型間での PPR の違いを生じたということ
を意味してはいない。それは、細胞外 Ca^{2+} 濃度を低くした場合(1 mM [Ca^{2+}])と同様に、
AgTx による P/Q 型 Ca^{2+} チャネル阻害が Ca^{2+} 流入量を大きく減少させ、その結果 PPR の
差が検出できなくなったと考えられるからである。

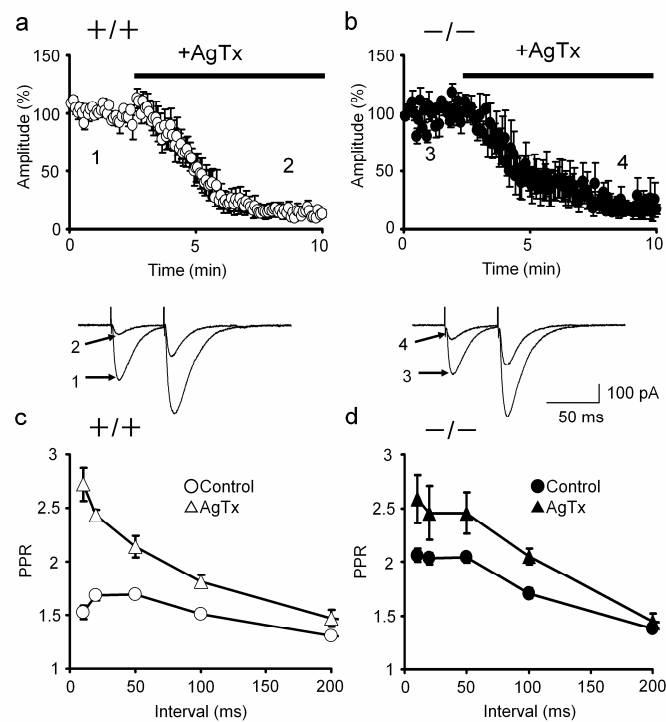


図 9

AgTx が EPSC および PPR に与える影響。(a, b) AgTx (200 nM) が EPSC に与える影響。野生型(+/, n = 5) (a) および GluD2 欠損型(-/-, n = 5) (b)。連続刺激時の EPSC トレースも示している。(c, d) AgTx 存在下(三角)および非存在下(円)での PPR。野生型(+/, n = 9) (c) および欠損型(-/-, n = 9) (d)。AgTx 非存在下でのデータは図 6c,d と同じものであるが、比較のために再掲載した。

一方、N 型 Ca^{2+} チャネルのブロッカーである ω -conotoxin GVIA (CgTx) は両遺伝子型において、EPSC の大きさをわずかに減少させ(+/, 78.5 ± 2.2 %, n = 6, p = 0.047; -/-, 78.7 ± 2.9 %, n = 4, p = 0.034, Student's t-test)、PPR を増大させた(+/, 2.04 ± 0.11 at 50 ms, n = 9, p = 0.001; -/-, 2.31 ± 0.11 , n = 9, p = 0.048, Dunnett test) (図 10)。PPR は CgTx 存在下においても、GluD2 欠損型マウスにおいて有意に大きかった。(p = 0.012, ANOVA)。N 型 Ca^{2+} チャネルは両遺伝子型において、伝達物質放出への寄与度は比較的低かった。

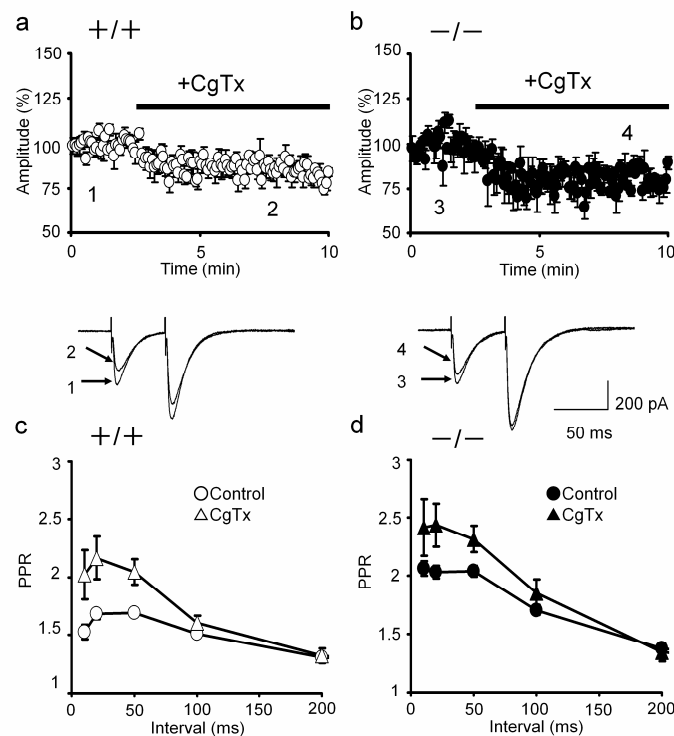


図 10

CgTx が EPSC および PPR に与える影響。(a, b)CgTx(500nM)が EPSC に与える影響。野生型(+/, n = 6) (a)および GluD2 欠損型(-/-, n = 4) (b)。連続刺激時の EPSC トレースも示した。(c, d)CgTx 存在下(三角)と非存在下(円)での PPR。野生型(+/, n = 9)および(c)欠損型(-/-, n = 9)。(d)CgTx 非存在下でのデータ(円)は図 6c,d と同じであるが、比較のために再掲載した。

一方、R 型 Ca^{2+} チャネル阻害は、両遺伝子型のマウスの EPSC および PPR に異なる影響を及ぼした。外液に Ni^{2+} を投与して、R 型 Ca^{2+} チャネルを阻害したところ、野生型では EPSC が減少し($77.6 \pm 4.7 \%$, $n = 5$, $p = 0.045$, Student's t-test)、PPR が増大した(1.88 ± 0.06 at 50 ms, $n = 12$, $p = 0.039$, Dunnett test)(図 11a,c)。一方、GluD2 欠損型においては、 Ni^{2+} は EPSC の大きさにも($104.4 \pm 11.9 \%$, $n = 5$, $p = 0.85$)、PPR にも (2.04 ± 0.11 , $n = 10$, $p = 0.99$) 影響を与えなかった(図 11b,d)。 Ni^{2+} は遺伝子型間の PPR の差をなくした($p = 0.14$, ANOVA)。そして、これらの結果は、GluD2 欠損マウスで R 型 Ca^{2+} チャネルが機能していないことを示唆する。

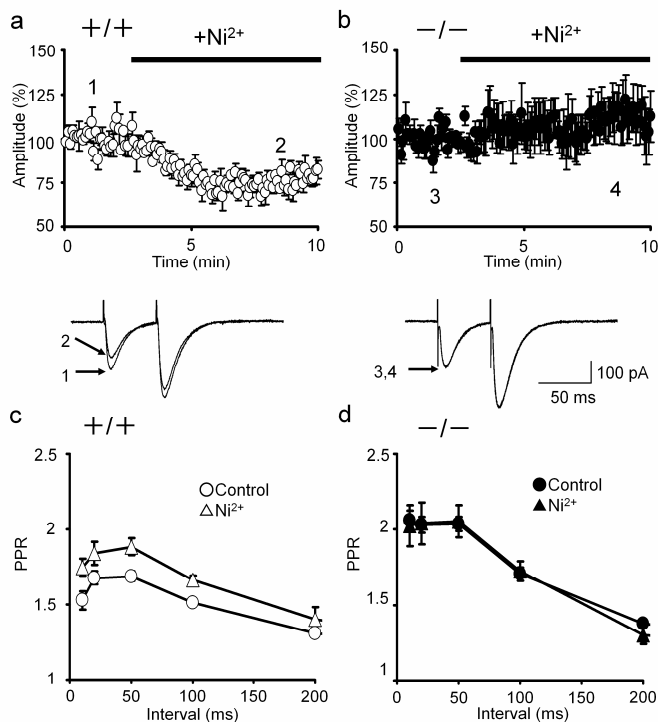


図 11

Ni^{2+} が EPSC および PPR に与える影響。(a, b) Ni^{2+} (500 μM)が EPSC に与える影響。野生型(+/, n = 5) (a) および GluD2 欠損型(-/-, n = 5) (b)。連続刺激時の EPSC トレースも示した。(c, d) Ni^{2+} 存在下(三角)と非存在下(円)での PPR。野生型(+/, n = 12) (c) および欠損型(-/-, n = 10) (d)。 Ni^{2+} 非存在下でのデータ(円)は図 6c,d と同じであるが、比較のために再掲載した。

しかしながら、 Ni^{2+} 存在下においても 100 ms 間隔以下では野生型の PPR が GluD2 欠損マウスの PPR よりわずかに小さかった ($p = 0.022$, ANOVA)。この違いには、グルタミン酸の受容体への結合飽和度の差が寄与した可能性がある。そこで、 Ni^{2+} に加えて DGG も外液に投与した。その結果、PPR の両遺伝子型マウス間の違いはなくなった($p = 0.060$; +/, n = 9, 2.24 ± 0.10 at 50 ms; -/-, n = 9, 2.38 ± 0.10) (図 12)。上述した結果より、R 型 Ca^{2+} チャネルが野生型マウスでは機能しているが、GluD2 欠損型マウスでは機能せず、その結果 PPR の差を生じたと考えた。

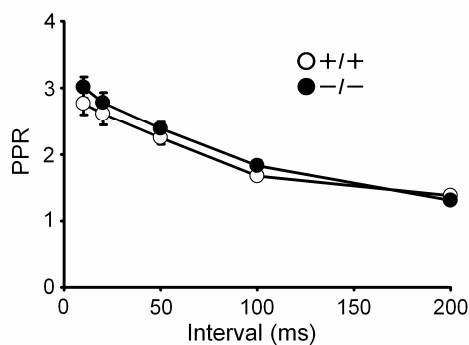


図 12

Ni^{2+} と DGG 同時投与時の PPR。野生型(+/, 白, n = 9)および GluD2 欠損型(-/-, 黒, n = 9)。

次に、R 型 Ca^{2+} チャネルのより選択的な阻害剤である SNX-482 (SNX)を用いて同様の実験を行った。しかしながら SNX の阻害効果は弱いことが知られており、両遺伝子型マウスにおいて EPSC にも PPR にも影響が認められなかった(data not shown)。Myoga and Regehr(2011)はアデノシン A1 受容体、GABA_B受容体、カンナビノイド CB1 受容体の阻害剤存在下で、SNX が EPSC、PPR に影響を与えることを報告している。そこで私は Myoga and Regehr と同様の状況で SNX の効果を検討することにした。まず、これらの阻害剤自体が EPSC に与える影響を調べたところ、両遺伝子型マウスにおいて、EPSC が有意に増大し (+/+, $144.8 \pm 10.0 \%$, $n = 5$, $p = 0.013$; -/-, $130.7 \pm 12.0 \%$, $n = 5$, $p = 0.048$, Student's t-test) (図 13)、PPR が小さくなることを野生型(1.44 ± 0.04 at 50 ms, $n = 6$, $p < 0.001$, Student's t-test)および GluD2 欠損型マウスで(1.72 ± 0.08 , $n = 9$, $p < 0.001$)確認した。これらの効果は、adenosine、GABA、cannabinoid にはシナプス前終末における伝達物質放出の抑制効果があり、それらが阻害剤により抑えられたためと考えられる(Wall and Dale, 2007; Dittman and Regehr, 1996; Kreitzer and Regehr, 2001)。両遺伝子型マウス間の PPR の差はこれらの阻害剤存在下においても認められた($p < 0.001$, ANOVA)。そこで、次にこれらの阻害剤存在下で SNX 投与実験を行ったところ、SNX は野生型マウスの EPSC の大きさを減少させ($78.6 \pm 1.6 \%$, $n = 5$, $p = 0.006$, Student's t-test)、PPR を増大させた ($p = 0.002$, $n = 6$, 1.59 ± 0.05 at 50 ms, ANOVA)(図 14a,c)。一方、GluD2 欠損型マウスにおいては、SNX は EPSC にも ($107.6 \pm 6.7 \%$, $n = 4$, $p = 0.64$) PPR にも ($p = 0.51$, $n = 9$, 1.65 ± 0.08)影響を与えなかった(図 14b,d)。また、SNX は両遺伝子型間の PPR の差を減少させた($p = 0.30$, ANOVA)。これらの結果は、野生型マウスでは R 型 Ca^{2+} チャネルが機能して、伝達物質放出に寄与しているが、GluD2 欠損型マウスでは R 型 Ca^{2+} チャネルが機能していないか、あるいは平行線維終末に発現しておらず、その結果放出確率の低下および PPR の減少を引き起こしたことを示している。

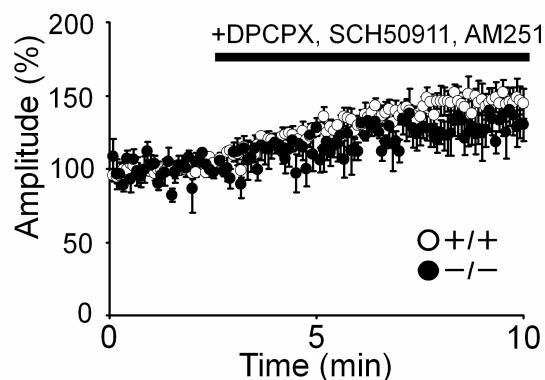


図 13

A1R、GABA_BR、CB1R のアンタゴニスト同時投与が EPSC に与える影響。野生型(+/, 白, n = 5)および GluD2 欠損型(-/-, 黒, n = 5)。

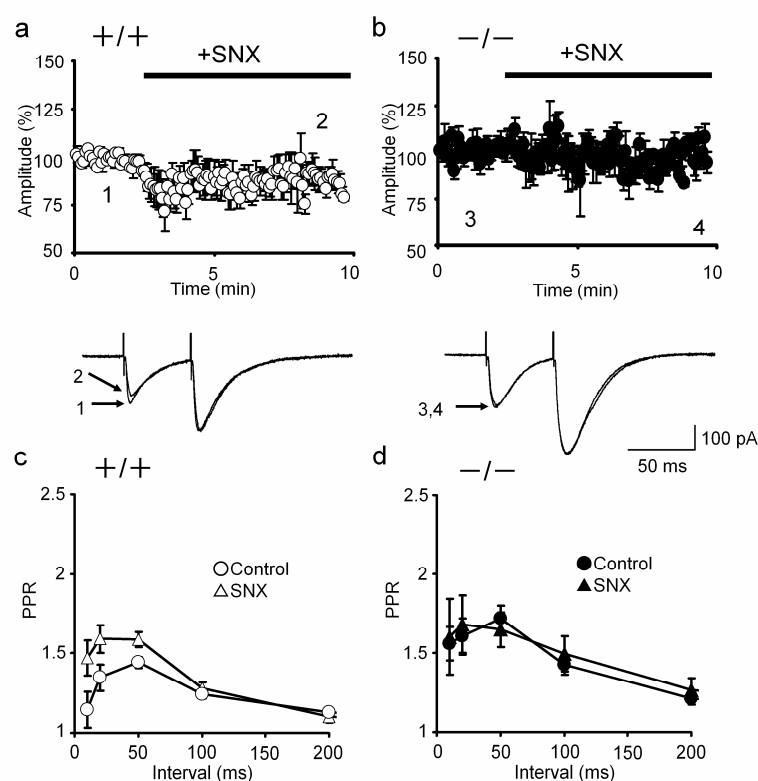


図 14

SNX が EPSC および PPR に与える影響。(a, b)SNX(500 nM)が EPSC に与える影響。野生型(+/, n = 5) (a)および GluD2 欠損型 (-/-, n = 4) (b)。連続刺激時の EPSC トレースも示した。(c, d)SNX 存在下(三角)と非存在下(円)での PPR。野生型(+/, n = 6) (c)および欠損型(-/-, n = 9)。A1、GABA_B、CB1 受容体のアンタゴニストの存在下で実験を行った。

GluD2 欠損マウスでは R 型 Ca²⁺チャネル依存的なシナプス前性 LTP が誘導されない

平行線維-プルキンエ細胞間シナプス前部における長期増強 (Long-Term Potentiation; LTP) に R 型 Ca²⁺チャネルが関与していることが報告されている(Myoga and Regehr, 2011)。この情報と上述した GluD2 欠損型マウスでは R 型 Ca²⁺チャネルが機能していない

ことを考え合わせ、GluD2 欠損型マウスではシナプス前性の LTP に何らかの影響があるのではないかと推察した。そこで、平行線維刺激(4 Hz, 120 回)により、シナプス前性 LTP が GluD2 欠損型マウスにおいて誘導されるか否かを調べた。LTP 誘導刺激は野生型マウスの EPSC を増大させた(at 30 min, $163.3 \pm 17.1 \%$, $n = 5$, $p = 0.021$, Student's t-test) (図 15a)。また 50 ms 間隔の PPR が誘導刺激後小さくなっていることを確認した(before 1.70 ± 0.04 , after 26-30 min 1.47 ± 0.07 , Student's t-test, $p = 0.023$) (図 15b)。この結果は、誘導された LTP がシナプス前終末からの伝達物質放出増加によることを示唆している。一方、この LTP 誘導刺激は GluD2 欠損型マウスにおいて EPSC 増大を引き起こさなかった ($108.2 \pm 8.5 \%$, $n = 5$, $p = 0.39$) (図 15a)。また、PPR にも変化を引き起こさなかった (before 1.96 ± 0.02 , after 2.02 ± 0.15 , $p = 0.59$) (図 15b)。これらの結果は、R 型 Ca^{2+} チャンネルからの Ca^{2+} 流入量がなくなったことにより LTP が誘導されなかったことを示唆している。

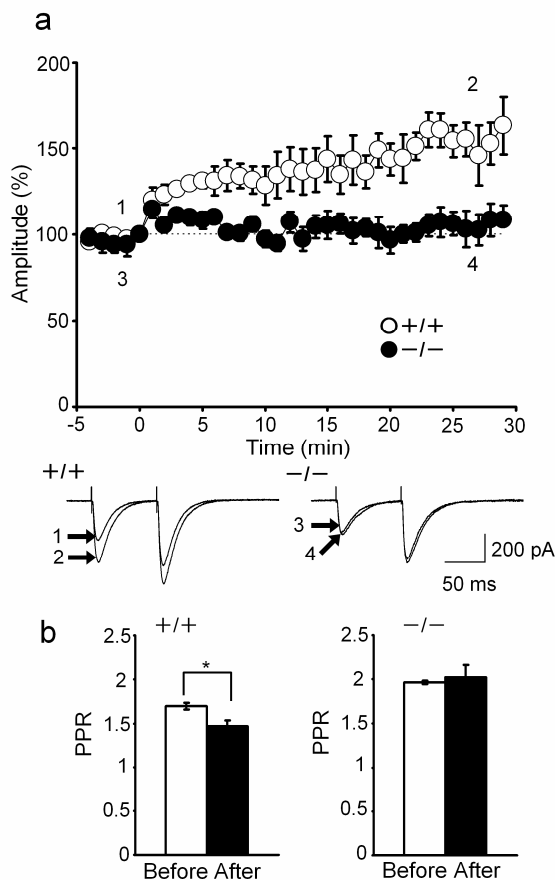


図 15

GluD2 欠損マウスではシナプス前性の LTP が障害されている。(a)0 分に平行線維に 4Hz・30 秒間の誘導刺激を行った。野生型 (+/+, 白, $n = 5$)および GluD2 欠損型 (-/-, 黒, $n = 5$)。連続刺激による EPSC トレースも示した。(b)誘導刺激前後の 50 ms 間隔刺激時の PPR(*, $p < 0.05$)。

しかしながら、GluD2 欠損マウスにおいて経路に関係なく、 Ca^{2+} の流入量が減ったことにより、LTP 誘導が阻害された可能性も考えられる。この可能性を検討するため、GluD2 欠損マウスで細胞外液の Ca^{2+} 濃度を高くすることでシナプス前終末への Ca^{2+} 流入量を増やし、その条件下で LTP が誘導できるようになるか否かを調べた。細胞外液の Ca^{2+} 濃度を 3 mM にしても、GluD2 欠損マウスでは LTP は誘導されなかった($98.4 \pm 7.0 \%$, $n = 4$, $p = 0.83$, Student's t-test)。同じ条件下において、野生型マウスでは LTP が誘導された($143.7 \pm 9.9 \%$, $n = 4$, $p = 0.021$)(図 16a)。そこで、さらに細胞外液の Ca^{2+} 濃度を上げ、4 mM にして同様の実験を行ったところ、野生型マウスにおいても GluD2 欠損型マウスにおいても LTP は誘導されなかった ($+/+$, $105.6 \pm 14.3 \%$, $n = 5$, $p = 0.70$; $-/-$, $90.3 \pm 7.5 \%$, $n = 5$, $p = 0.46$)(図 16b)。細胞外液の Ca^{2+} 濃度を 4 mM にした条件下では、シナプス前終末におけるシナプス小胞の放出機構がほぼすべて使われている状態となり、さらなる放出増加の余地がなかったためと推察される。すなわち、細胞外液の Ca^{2+} 濃度を高くすることによってシナプス前終末への Ca^{2+} 流入量を増やしても、GluD2 欠損型マウスにおいては LTP を回復できないことがわかった。このことは、R 型 Ca^{2+} チャネル周辺の細胞内マイクロドメインにおける Ca^{2+} 濃度上昇が、シナプス前性の LTP に重要であることを示唆している。

最後に、GluD2 欠損マウスにおいて R 型 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入の下流に位置するシグナル経路に変化が認められるか検討した。adenylyl cyclase の活性化剤である forskolin は、平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにおいて、平行線維刺激による EPSC を増大させることが報告されている(Myoga and Regehr, 2011; Salin et al., 1996)。forskolin はシナプス前細胞での Ca^{2+} 流入量に影響を与えず、微小 EPSC の大きさは変えずに頻度のみを増加させる(Chen and Regehr, 1997)。すなわち forskolin は主にシナプス前終末におけるシナプス伝達に影響し、LTP 誘導経路の Ca^{2+} の下流で cAMP が働く可能性を示している。そこで、私は forskolin の EPSC への作用を調べることにした。forskolin 投与により、両遺伝子型マウスにおいて EPSC は大きくなり(9-10 min, $+/+$, $137.7 \pm 13.8 \%$,

n = 5, p = 0.038; $-/-$, $143.3 \pm 17.6\%$, n = 6, p = 0.044, Student's t-test)、50 ms 間隔における PPR が小さくなった ($+/+$, before 1.62 ± 0.11 , after 9-10 min 1.29 ± 0.06 , p = 0.038; $-/-$, before 1.96 ± 0.08 , after 1.42 ± 0.08 , p < 0.001, Student's t-test)(図 16c)。EPSC の増大についても(p = 0.81)、PPR の減少についても(p = 0.26, Student's t-test)、両遺伝子型間で差は認められなかった。これらの結果より、GluD2 欠損は cAMP の下流のシグナル経路に影響を及ぼしていないと考えられる。

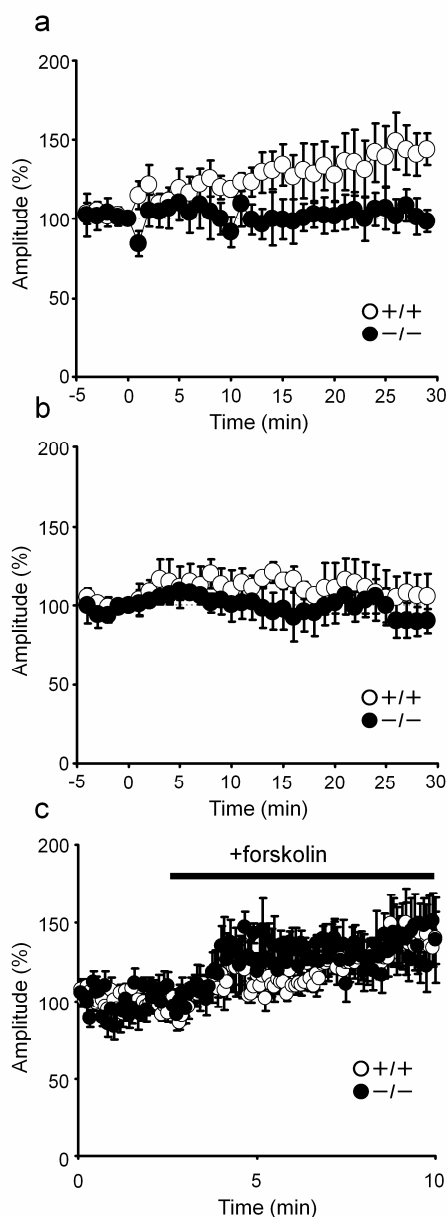


図 16

(a, b) 4 Hz・30 秒間の平行線維刺激による EPSC の変化。野生型(+/-, 白)および GluD2 欠損型 (-/-, 黒)。3 mM(+/-, n = 4; -/-, n = 4)(a)および 4 mM $[Ca^{2+}]_i$ (+/-, n = 5; -/-, n = 5) (b)。(c) forskolin (50 μ M)投与による EPSC の変化。野生型(+/-, 白, n = 5)および欠損型(-/-, 黒, n = 6)。

考察

本研究では、シナプス後細胞にある GluD2 が平行線維シナプス前終末の機能をいかに調節しているかを調べた。DGG によりグルタミン酸と受容体の結合飽和を阻害した状態でも、PPR に差があることから、GluD2 欠損マウスでは野生型マウスと比較して伝達物質放出確率が低下していることが示唆された。各電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの阻害剤を用いた実験により、GluD2 欠損マウスでは P/Q、N 型チャンネルは正常に機能しているが、R 型 Ca^{2+} チャンネルが機能していないことがわかった。さらに GluD2 欠損マウスでは、R 型 Ca^{2+} チャンネル依存的なシナプス前性の LTP が誘導されないことがわかった。これらの結果より、シナプス後部にある GluD2 の欠損により、シナプス前終末にある R 型 Ca^{2+} チャンネルの機能が阻害され、その結果シナプス小胞の放出量が減り、PPR が大きくなり、シナプス前性の LTP が阻害されていることが示唆された。

GluD2 によるシナプス前部および後部の調節

GluD2 は小脳平行線維-プルキンエ細胞間シナプス後部特異的に発現しており、小脳長期抑圧に必須の分子である (Kashiwabuchi et al., 1995; Hirano et al., 1994)。長期抑圧は運動学習に重要な役割を果たすと考えられ (Boyden et al., 2004; Ito, 2001)、シナプス後部にある AMPA 受容体の数が減ることにより引き起こされる (Linden, 2001)。また、GluD2 はシナプス前終末にある Neurexin と分泌たんぱく質である cbln を介して結合することによって、シナプス形成にも関与している (Uemura et al., 2010; Matsuda et al., 2010)。GluD2 は細胞外ドメインを介してシナプス前終末誘導を、細胞内ドメインによりシナプス後部可塑性である長期抑圧を制御している (Yuzaki, 2009; Hirano, 2012)。

PPR には、シナプス前部および後部のメカニズムが関与し得ると考えられるが、主要因はシナプス前部にあると考えられてきた (Hashimoto and Kano, 1998; Atluri and Regehr, 1996; Zucker and Regehr, 2002)。GluD2 欠損マウスでは、平行線維-プルキンエ

細胞間シナプス後部にある AMPA 受容体の数が増えていることが報告されており (Yamasaki et al., 2011)、シナプス後部で起こるグルタミン酸と受容体結合の飽和度の違いが GluD2 欠損マウスと野生型マウス間での PPR の差に関与している可能性があると考えた。そこで、DGG を用いて、グルタミン酸と AMPA 受容体の結合飽和を緩和して、シナプス後部受容体の違いにより、GluD2 の PPR 値の異常が説明できるか検討した。そうしたところ、DGG 存在下でも PPR は GluD2 欠損マウスで明らかに大きく、GluD2 の高 PPR 値はシナプス後部変化だけでは説明できないので、GluD2 欠損マウスのシナプス前部で何らかの変化が起こり、PPR が変わったと考えた。

GluD2 欠損によるシナプス前部における変化

GluD2 欠損により PPR を変化させるシナプス前終末における変化要因として、活動電位により引き起こされる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇 (Ca_{inc})、シナプス小胞の放出機構の Ca^{2+} 感受性 (K_{Ca})、活動電位による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が定常状態に戻るまでの時定数 (τ_0)、小胞が放出された後で、シナプス小胞が新たに放出部位に補填されるまでの時定数 (τ_1) の 4 要素が考えられる。細胞外 Ca^{2+} 濃度を変え PPR を測定した実験データと式(10)を用いた理論値を比較することで、GluD2 欠損により Ca_{inc} または K_{Ca} が変化し、放出を低下させていることが示唆された。ここで用いた理論モデルは、2 回目の EPSC が大きくなる paired pulse facilitation (PPF) は、細胞内に残った Ca^{2+} 濃度により引き起こされるというオリジナルモデルを基にしたものであり (Katz and Miledi, 1968)、この基本的な考え方は他の報告でも採用されている (Dittman et al., 2000; Lee et al., 2009)。本研究では、これらのモデルを簡略化して GluD2 欠損マウスで PPR が大きくなっていることの原因を検討するために使用した。連発刺激への応答について、より様々な要素を考慮した伝達物質放出の制御モデルも作られている (Markram et al., 1998; Dittman et al., 2000; Lee et al., 2009)。以前の報告では、放出部位近辺における一過的な大きな Ca^{2+} イオン濃度上昇 (100 μM 程度) が同期した放

出に必要であり、それはシナプス前終末内広範囲の Ca^{2+} イオン濃度とは明らかに異なっていると考えられてきた(Zucker and Regehr, 2002; Oheim et al., 2006)。しかし、最近の報告では、 Ca^{2+} が synaptotagmin に結合することでシナプス小胞の放出が引き起こされ、それは $10\ \mu\text{M}$ 以下という低 Ca^{2+} 濃度上昇でも引き起こされることが報告された(Kochubey et al., 2011; van den Bogaart et al., 2012)。今回はこうした情報に基づき、低濃度の K_{Ca} と Ca_{inc} の値を用いているが、高濃度の値を用いて計算しても結果は定性的には同様のものとなった。本研究では、 Ca^{2+} 濃度上昇の減衰および放出部位への新たなシナプス小胞の補填が指数関数的に起こると仮定する等の簡略化を行ったモデルを用いたが、各 Ca^{2+} 濃度での両遺伝子型マウス間の PPR 値の違いを説明できる要因として、GluD2 欠損マウスでは Ca_{inc} が減少しているか、 K_{Ca} が大きくなっている可能性が高いことを示唆できた。そして、本研究ではその予想を基にして、シナプス前終末にある電位依存性 Ca^{2+} チャネルの PPR への影響を調べることにした。

GluD2 欠損によるシナプス前終末にある電位依存性 Ca^{2+} チャネルへの影響

様々な分子が直接あるいは間接的にシナプス前終末にある電位依存性 Ca^{2+} チャネルの機能を調節している(Catterall, 2000; Tedford and Zamponi, 2006)。P/Q、N、R 型 Ca^{2+} チャネルは中枢神経系内のシナプス伝達に関与しており、異なるチャネル開閉特性および挙動を示す(Catterall, 2000; Li et al., 2007)。たとえば、cannabinoid は N、P/Q、R 型 Ca^{2+} チャネルを抑制するが、チャネルの種類によりその抑制の程度は異なる (Brown et al., 2004)。ラットの平行線維終末では P/Q 型 Ca^{2+} チャネルがシナプス伝達に最も大きな寄与をし、N、R 型 Ca^{2+} チャネルの寄与は小さい(Myoga and Regehr, 2011)。今回の研究で、野生型マウスにおいて、N および R 型 Ca^{2+} チャネルのシナプス伝達への寄与度が同程度であることを確認し、R 型 Ca^{2+} チャネルが GluD2 欠損マウスで機能していないことを示した。これらの結果は、GluD2 欠損マウスで、P/Q および N 型 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入および Ca^{2+}

チャネルの伝達物質放出機構への寄与に異常がないこと、R 型 Ca^{2+} チャネルのみ機能阻害されていることを示唆した。シナプス前終末にある電位依存性 Ca^{2+} チャネルに関しては、「スロット仮説」が提唱されている。スロット仮説とは、シナプス前終末に複数種の Ca^{2+} チャネルスロットが存在しているというものであり(Cao et al., 2004; Cao and Tsien, 2010)、P/Q 型 Ca^{2+} チャネル選択的、N 型 Ca^{2+} チャネル選択的スロットがあることが報告されている。平行線維終末には R 型 Ca^{2+} チャネル選択的スロットが存在しており、GluD2 欠損によりそのスロットが特異的に障害された可能性が考えられる(図 18)。

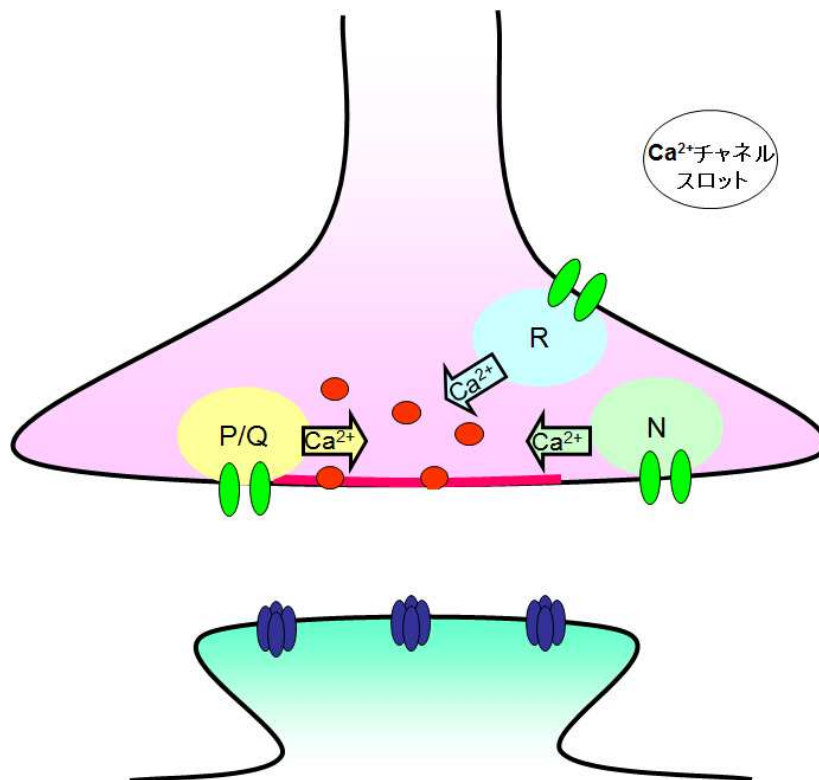


図 18
 Ca^{2+} スロット仮説。
 GluD2 欠損マウスでは R 型 Ca^{2+} チャネルスロットが特異的に障害されている可能性が考えられる。

P/Q、N 型 Ca^{2+} チャネルではなく、R 型 Ca^{2+} チャネルの近くにあるマイクロドメインが平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにおいて、シナプス前部変化による LTP に関与していることが知られている(Myoga and Regehr, 2011)。そこで私は、平行線維終末にある R 型 Ca^{2+} チャネルの機能が阻害されていることより、シナプス前性 LTP が障害されているのではないかと考えた。予想通り、GluD2 欠損マウスではシナプス前性 LTP が誘導されないことがわかった。経路に関係なく、細胞内への Ca^{2+} 流入量が減ったことにより LTP が阻害さ

れた可能性も考えられたので、細胞外 Ca^{2+} 濃度を上げることにより、細胞内への Ca^{2+} 流入を増やして LTP を回復できるかも調べた。そうしたところ、細胞外 Ca^{2+} 濃度を高くしても、GluD2 欠損マウスでは LTP は誘導されなかった。こうした結果は、LTP にはシナプス前終末での Ca^{2+} 濃度上昇ではなく、R 型 Ca^{2+} チャネル周辺のマイクロドメインにおける Ca^{2+} 濃度上昇が必須であることを意味している。R 型 Ca^{2+} チャネル選択的スロットが平行線維終末にあり、シナプス前性 LTP に関与するシグナル分子がその近くに局在していると考えられる。

本研究ではシナプス前終末への Ca^{2+} 流入後の下流のシグナル経路が GluD2 欠損による影響を受けているかも調べた。forskolin を用いて adenylyl cyclase を活性化させ、細胞内 cAMP 濃度を上昇させる実験を行った。forskolin は、平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにおける伝達物質放出量を増加させ、さらなる LTP 誘導を阻害することが報告されている (Myoga and Regehr, 2011; Salin et al., 1996)。forskolin による cAMP 増加は LTP 誘導時の Ca^{2+} 流入以降のシグナル経路の候補である。forskolin 投与実験により、cAMP の下流経路に障害がないことが示された。これらの結果より、GluD2 欠損は、シナプス後部における長期抑圧のみならず、シナプス前性の LTP にも関与し、それはシナプス前終末における R 型 Ca^{2+} チャネルの機能または発現調節を介していると考えられる。

シナプス前終末特性の逆行性制御

シナプス前終末とシナプス後部の形成・維持には、シナプスの両サイドにある膜タンパク質の結合等が関わる。シナプス前終末と後部構造と機能の相関は、小脳と海馬のグルタミン酸性シナプスで異なっている (Miyawaki and Hirano, 2011)。また、シナプス後部分子がシナプス前終末の特性を決定するという報告もある。たとえば、小脳皮質において、顆粒細胞はプルキンエ細胞および抑制性介在細胞に平行線維を投射しているが、これらのシナプスは異なるグルタミン酸放出特性および短期可塑性を示す (Delaney and Jahr, 2002;

Bao et al., 2010)。シナプス接着分子がシナプス前終末と後部をつなぐことで、シナプス前終末にある伝達物質放出装置とシナプス後部の受容体集積部位との相互作用を生み出す。シナプス後部にある Neuroligin および LRRTM(leucine-rich repeat transmembrane protein)は、シナプス前終末にある Neurexin と結合し、これらの分子の相互作用によりシナプス前・後部の分化が誘導される(Craig and Kang, 2007; Sudhof, 2008; Linhoff et al., 2009; Ko et al., 2011)。異なるシナプス接着分子、たとえば Neuroligin と Neurexin の異なるスプライシング変異体の組み合わせにより、興奮性シナプスまたは抑制性シナプスの作り分け、および異なるシナプス特性がもたらされると考えられる(Chubykin et al., 2007)。GluD2 は平行線維とプルキンエ細胞間シナプス形成に、シナプス前終末にある Neurexin と cbln を介して結合する(Uemura et al., 2010)。GluD2 がなくても平行線維-プルキンエ細胞間シナプスは Neuroligin-Neurexin の結合などによりシナプス形成され得る。Cbln と GluD2 の親和性は $K_d = 16.5$ nM であり、cbln と Neurexin1 β (+4)の親和性 $K_d = 0.17$ nM である。これらの親和性は Neuroligin と Neurexin の親和性($K_d = 200-600$ nM)よりも高い(Uemura et al., 2010; Comoletti et al., 2003; Koehnke et al., 2008)。Neurexin1 β (+4)は平行線維終末に発現しており、GluD2 は Neuroligin より cbln に結合しやすい。一方、GluD2 欠損状態で、Neurexin は GluD2 ではなく Neuroligin に結合すると考えられる。Neurexin が GluD2 に結合するか、それとも Neuroligin に結合するかで、シナプス前終末の特性が決定されるのではないだろうか。上述したように、平行線維終末の特性はシナプス後部細胞により異なる。すなわち GluD2 のあるプルキンエ細胞か、GluD2 のない抑制性介在細胞に投射するかにより、シナプス前終末の特性が異なり得ると考えられる。Neurexin は、シナプス前終末にある電位依存性 Ca^{2+} チャネルに作用することによりシナプス前終末からの伝達物質放出確率を制御していることが報告されている(Missler et al., 2003; Zhang et al., 2005)。

以上から、シナプス後部にある GluD2 は cbln、Neurexin を介してシナプス前終末にあ

る R 型 Ca^{2+} チャンネルの発現/機能を制御することにより、R 型 Ca^{2+} チャンネル周辺の Ca^{2+} マイクロドメインの形成およびシナプス前性 LTP 誘導に寄与すると考えられる(図 19)。

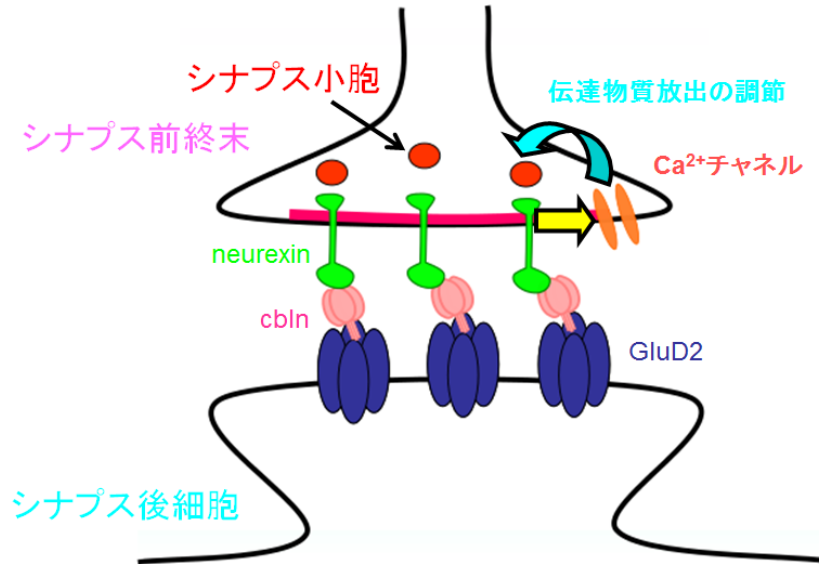


図 19

GluD2-cbln-Neurexin 相互作用により平行線維-プルキンエ細胞間シナプス形成が誘導される。Neurexin はシナプス前終末にある Ca^{2+} チャンネルに作用して伝達物質放出の調節をしている。

参考文献

論文

Albus JS (1971) A theory of cerebellar function. *Math. Biosci.* 10: 25-61

Araki K, Meguro H, Kushiya E, Takayama C, Inoue Y, Mishina M (1993) Selective expression of the glutamate receptor channel $\delta 2$ subunit in cerebellar Purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun* 197:1267-1276.

Atluri PP, Regehr WG (1996) Determinants of the time course of facilitation at the granule cell to Purkinje cell synapse. *J Neurosci* 16:5661-5671.

Bao J, Reim K, Sakaba T (2010) Target-dependent feedforward inhibition mediated by short-term synaptic plasticity in the cerebellum. *J Neurosci* 30:8171-8179.

Boyden ES, Katoh A, Raymond JL (2004) Cerebellum-dependent learning: the role of multiple plasticity mechanisms. *Annu Rev Neurosci* 27:581-609.

Brown SP, Safo PK, Regehr WG (2004) Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels. *J Neurosci* 24:5623-5631.

Cao YQ, Tsien RW (2010) Different relationship of N- and P/Q-type Ca^{2+} channels to channel-interacting slots in controlling neurotransmission at cultured hippocampal synapses. *J Neurosci* 30:4536-4546.

Cao YQ, Piedras-Rentería ES, Smith GB, Chen G, Harata NC, Tsien RW (2004) Presynaptic Ca^{2+} channels compete for channel type-preferring slots in altered neurotransmission arising from Ca^{2+} channelopathy. *Neuron* 43:387-400.

Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.

- Chavis P, Mollard P, Bockaert J, Manzoni O (1998) Visualization of cyclic AMP-regulated presynaptic activity at cerebellar granule cells. *Neuron* 20:773-781.
- Chubykin AA, Atasoy D, Etherton MR, Brose N, Kavalali ET, Gibson JR, Südhof TC (2007) Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron* 54:919-931.
- Chen YA, Scheller RH (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:98-106.
- Chen C, Regehr WG (1994) The mechanism of cAMP-mediated enhancement at a cerebellar synapse. *J Neurosci.* 17:8687-94.
- Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18-41.
- Coesmans M, Weber JT, De Zeeuw CI, Hansel C (2004) Bidirectional parallel fiber plasticity in the cerebellum under climbing fiber control. *Neuron* 44:691-700.
- Comoletti D, Flynn R, Jennings LL, Chubykin A, Matsumura T, Hasegawa H, Südhof TC, Taylor P (2003) Characterization of the interaction of a recombinant soluble neuroligin-1 with neurexin-18. *J Biol Chem* 278:50497-50505.
- Craig AM, Kang Y (2007) Neurexin-neuroligin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol* 17:43-52.
- Debanne D, Guérineau NC, Gähwiler BH, Thompson SM (1996) Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J Physiol* 491:163-176.
- Delaney AJ, Jahr CE (2002) Kainate receptors differentially regulate release at two parallel fiber synapses. *Neuron* 36:475-482.
- Dittman JS, Regehr WG (1996) Contributions of calcium-dependent and calcium-independent mechanisms to presynaptic inhibition at a cerebellar synapse. *J Neurosci* 16:1623-1633.

Dittman JS, Kreitzer AC, Regehr WG (2000) Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals. *J Neurosci* 20:1374-1385.

Foster KA, Crowley JJ, Regehr WG (2005) The influence of multivesicular release and postsynaptic receptor saturation on transmission at granule cell to Purkinje cell synapses. *J Neurosci* 25:11655-11665.

Funabiki K, Mishina M, Hirano T (1995) Retarded vestibular compensation in mutant mice deficient in $\delta 2$ glutamate receptor subunit. *Neuroreport* 7:189-192.

Hashimoto K, Kano M (1998) Presynaptic origin of paired-pulse depression at climbing fibre-Purkinje cell synapses in the rat cerebellum. *J Physiol* 506 (Pt 2):391-405.

Hashimoto K, Ichikawa R, Takechi H, Inoue Y, Aiba A, Sakimura K, Mishina M, Hashikawa T, Konnerth A, Watanabe M, Kano M (2001) Roles of glutamate receptor $\delta 2$ subunit (GluR $\delta 2$) and metabotropic glutamate receptor subtype 1 (mGluR1) in climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. *J Neurosci* 21:9701-9712.

Hirano T (2012) Glutamate-Receptor-Like Molecule GluR $\delta 2$ Involved in Synapse Formation at Parallel Fiber-Purkinje Neuron Synapses. *Cerebellum* 11:71-77.

Hirai H, Matsuda S (1999) Interaction of the C-terminal domain of δ glutamate receptor with spectrin in the dendritic spines of cultured Purkinje cells. *Neurosci Res* 34:281-287.

Hirano T (1990) Depression and potentiation of the synaptic transmission between a granule cell and a Purkinje cell in rat cerebellar culture. *Neurosci Lett* 119:141-144.

Hirano T (1991) Differential pre- and postsynaptic mechanisms for synaptic potentiation and depression between a granule cell and a Purkinje cell in rat cerebellar culture. *Synapse* 7:321-323.

Hirano T, Kasono K, Araki K, Shinozuka K, Mishina M (1994) Involvement of the glutamate receptor $\delta 2$ subunit in the long-term depression of glutamate responsiveness in cultured rat Purkinje cells. *Neurosci Lett* 182:172-176.

Hirano T (2006) Cerebellar regulation mechanisms learned from studies on GluR δ 2. *Mol Neurobiol* 33:1-16.

Hironaka K, Umemori H, Tezuka T, Mishina M, Yamamoto T (2000) The protein-tyrosine phosphatase PTPMEG interacts with glutamate receptor δ 2 and epsilon subunits. *J Biol Chem* 275:16167-16173.

Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.

Ito M (1989) Long-term depression. *Annu Rev Neurosci* 12:85-102.

Ito M (2001) Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev* 81:1143-1195.

Ito M (2002) The molecular organization of cerebellar long-term depression. *Nat Rev Neurosci* 3:896-902.

Ito M (2006) Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol* 78:272-303.

Takegawa W, Yuzaki M (2005) A mechanism underlying AMPA receptor trafficking during cerebellar long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17846-17851.

Kashiwabuchi N, Ikeda K, Araki K, Hirano T, Shibuki K, Takayama C, Inoue Y, Kutsuwada T, Yagi T, Kang Y, et al. (1995) Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR δ 2 mutant mice. *Cell* 81:245-252.

Katz B, Miledi R (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195:481-492.

Ko J, Soler-Llavina GJ, Fuccillo MV, Malenka RC, Südhof TC (2011) Neuroligins/LRRTMs prevent activity- and Ca^{2+} /calmodulin-dependent synapse elimination in cultured neurons. *J Cell Biol* 194:323-334.

Kochubey O, Lou X, Schneggenburger R (2011) Regulation of transmitter release by Ca^{2+} and synaptotagmin: insights from a large CNS synapse. *Trends Neurosci* 34:237-246.

Koehnke J, Jin X, Trbovic N, Katsamba PS, Brasch J, Ahlsen G, Scheiffele P, Honig B, Palmer AG, Shapiro L (2008) Crystal structures of β -neurexin 1 and β -neurexin 2 ectodomains and dynamics of splice insertion sequence 4. *Structure* 16:410-421.

Kohda K, Kakegawa W, Matsuda S, Nakagami R, Kakiya N, Yuzaki M (2007) The extreme C-terminus of GluR δ 2 is essential for induction of long-term depression in cerebellar slices. *Eur J Neurosci* 25:1357-1362.

Kreitzer AC, Regehr WG (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29:717-727.

Kurihara H, Hashimoto K, Kano M, Takayama C, Sakimura K, Mishina M, Inoue Y, Watanabe M (1997) Impaired parallel fiber-->Purkinje cell synapse stabilization during cerebellar development of mutant mice lacking the glutamate receptor δ 2 subunit. *J Neurosci* 17:9613-9623.

Kuroyanagi T, Hirano T (2010) Flap loop of GluD2 binds to Cbln1 and induces presynaptic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 398:537-541.

Kuroyanagi T, Yokoyama M, Hirano T (2009) Postsynaptic glutamate receptor δ family contributes to presynaptic terminal differentiation and establishment of synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4912-4916.

Landsend AS, Amiry-Moghaddam M, Matsubara A, Bergersen L, Usami S, Wenthold RJ, Ottersen OP (1997) Differential localization of δ glutamate receptors in the rat cerebellum: coexpression with AMPA receptors in parallel fiber-spine synapses and absence from climbing fiber-spine synapses. *J Neurosci* 17:834-842.

Lee CC, Anton M, Poon CS, McRae GJ (2009) A kinetic model unifying presynaptic short-term facilitation and depression. *J Comput Neurosci* 26:459-473.

Lev-Ram V, Wong ST, Storm DR, Tsien RY (2002) A new form of cerebellar long-term

potentiation is postsynaptic and depends on nitric oxide but not cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8389-8393.

Lev-Ram V, Mehta SB, Kleinfeld D, Tsien RY (2003) Reversing cerebellar long-term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15989-15993.

Li L, Bischofberger J, Jonas P (2007) Differential gating and recruitment of P/Q-, N-, and R-type Ca²⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *J Neurosci* 27:13420-13429.

Linden DJ (2001) The expression of cerebellar LTD in culture is not associated with changes in AMPA-receptor kinetics, agonist affinity, or unitary conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14066-14071.

Linhoff MW, Laurén J, Cassidy RM, Dobie FA, Takahashi H, Nygaard HB, Airaksinen MS, Strittmatter SM, Craig AM (2009) An unbiased expression screen for synaptogenic proteins identifies the LRRTM protein family as synaptic organizers. *Neuron* 61:734-749.

Lomeli H, Sprengel R, Laurie DJ, Köhr G, Herb A, Seeburg PH, Wisden W (1993) The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Lett* 315:318-322.

Mandolesi G, Cesa R, Autuori E, Strata P (2009) An orphan ionotropic glutamate receptor: The $\delta 2$ subunit. *Neuroscience*.

Markram H, Wang Y, Tsodyks M (1998) Differential signaling via the same axon of neocortical pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5323-5328.

Marr D (1969) A theory of cerebellar cortex. *J Physiol* 202:437-470.

Matsuda S, Hannen R, Matsuda K, Yamada N, Tubbs T, Yuzaki M (2004) The C-terminal juxtamembrane region of the $\delta 2$ glutamate receptor controls its export from the endoplasmic reticulum. *Eur J Neurosci* 19:1683-1690.

Matsuda K, Yuzaki M (2011) Cbln family proteins promote synapse formation by regulating distinct neurexin signaling pathways in various brain regions. *Eur J Neurosci* 33:1447-1461.

- Matsuda K, Miura E, Miyazaki T, Kakegawa W, Emi K, Narumi S, Fukazawa Y, Ito-Ishida A, Kondo T, Shigemoto R, Watanabe M, Yuzaki M (2010) Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor $\delta 2$, a bidirectional synapse organizer. *Science* 328:363-368.
- Mintz IM, Sabatini BL, Regehr WG (1995) Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* 15:675-688.
- Missler M, Zhang W, Rohlmann A, Kattenstroth G, Hammer RE, Gottmann K, Südhof TC (2003) α -neurexins couple Ca^{2+} channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 423:939-948.
- Miyagi Y, Yamashita T, Fukaya M, Sonoda T, Okuno T, Yamada K, Watanabe M, Nagashima Y, Aoki I, Okuda K, Mishina M, Kawamoto S (2002) Delphilin: a novel PDZ and formin homology domain-containing protein that synaptically colocalizes and interacts with glutamate receptor $\delta 2$ subunit. *J Neurosci* 22:803-814
- Miyawaki H, Hirano T (2011) Different correlations among physiological and morphological properties at single glutamatergic synapses in the rat hippocampus and the cerebellum. *Synapse* 65:412-423.
- Mochida S (2011) Activity-dependent regulation of synaptic vesicle exocytosis and presynaptic short-term plasticity. *Neurosci Res* 70:16-23.
- Murthy VN, De Camilli P (2003) Cell biology of the presynaptic terminal. *Annu Rev Neurosci* 26:701-728.
- Myoga MH, Regehr WG (2011) Calcium microdomains near R-type calcium channels control the induction of presynaptic long-term potentiation at parallel fiber to purkinje cell synapses. *J Neurosci* 31:5235-5243.
- Oheim M, Kirchhoff F, Stuhmer W (2006) Calcium microdomains in regulated exocytosis. *Cell Calcium* 40:423-439.
- Raymond JL, Lisberger SG (1996) Error signals in horizontal gaze velocity Purkinje cells under stimulus conditions that cause learning in the VOR. *Ann N Y Acad Sci* 781:686-689.

Robinson DA (1981) The use of control systems analysis in the neurophysiology of eye movements. *Annu Rev Neurosci* 4:463-503.

Roche KW, Ly CD, Petralia RS, Wang YX, McGee AW, Brecht DS, Wenthold RJ (1999) Postsynaptic density-93 interacts with the $\delta 2$ glutamate receptor subunit at parallel fiber synapses. *J Neurosci* 19:3926-3934.

Salin PA, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron* 16:797-803.

Schmid SM, Kott S, Sager C, Huelsken T, Hollmann M (2009) The glutamate receptor subunit $\delta 2$ is capable of gating its intrinsic ion channel as revealed by ligand binding domain transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:10320-10325.

Schneggenburger R, Neher E (2000) Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature* 406:889-893.

Südhof TC (2008) Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455:903-911.

Südhof TC (2012) The presynaptic active zone. *Neuron* 75:11-25.

Takayama C, Nakagawa S, Watanabe M, Mishina M, Inoue Y (1995) Light- and electron-microscopic localization of the glutamate receptor channel $\delta 2$ subunit in the mouse Purkinje cell. *Neurosci Lett* 188:89-92.

Tedford HW, Zamponi GW (2006) Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacol Rev* 58:837-862.

Torashima T, Iizuka A, Horiuchi H, Mitsumura K, Yamasaki M, Koyama C, Takayama K, Iino M, Watanabe M, Hirai H (2009) Rescue of abnormal phenotypes in $\delta 2$ glutamate receptor-deficient mice by the extracellular N-terminal and intracellular C-terminal domains of the $\delta 2$ glutamate receptor. *Eur J Neurosci* 30:355-365.

Uemura T, Mori H, Mishina M (2004) Direct interaction of GluR $\delta 2$ with Shank scaffold proteins in cerebellar Purkinje cells. *Mol Cell Neurosci* 26:330-341.

Uemura T, Kakizawa S, Yamasaki M, Sakimura K, Watanabe M, Iino M, Mishina M (2007) Regulation of long-term depression and climbing fiber territory by glutamate receptor $\delta 2$ at parallel fiber synapses through its C-terminal domain in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 27:12096-12108.

Uemura T, Lee SJ, Yasumura M, Takeuchi T, Yoshida T, Ra M, Taguchi R, Sakimura K, Mishina M (2010) Trans-synaptic interaction of GluR $\delta 2$ and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum. *Cell* 141:1068-1079.

van den Bogaart G, Meyenberg K, Diederichsen U, Jahn R (2012) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate increases the Ca^{2+} affinity of synaptotagmin-1 40-fold. *J Biol Chem*.

Wadiche JI, Jahr CE (2001) Multivesicular release at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron* 32:301-313.

Wall MJ, Dale N (2007) Auto-inhibition of rat parallel fibre-Purkinje cell synapses by activity-dependent adenosine release. *J Physiol* 581:553-565.

Yamaguchi K, Tanaka M, Mizoguchi A, Hirata Y, Ishizaki H, Kaneko K, Miyoshi J, Takai Y (2002) A GDP/GTP exchange protein for the Rab3 small G protein family up-regulates a postdocking step of synaptic exocytosis in central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14536-14541.

Yamasaki M, Miyazaki T, Azechi H, Abe M, Natsume R, Hagiwara T, Aiba A, Mishina M, Sakimura K, Watanabe M (2011) Glutamate receptor $\delta 2$ is essential for input pathway-dependent regulation of synaptic AMPAR contents in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 31:3362-3374.

Yap CC, Muto Y, Kishida H, Hashikawa T, Yano R (2003) PKC regulates the $\delta 2$ glutamate receptor interaction with S-SCAM/MAGI-2 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 301:1122-1128.

Yawata S, Tsuchida H, Kengaku M, Hirano T (2006) Membrane-proximal region of glutamate receptor $\delta 2$ subunit is critical for long-term depression and interaction with protein interacting with C kinase 1 in a cerebellar Purkinje neuron. *J Neurosci* 26:3626-3633.

Yoshida T, Katoh A, Ohtsuki G, Mishina M, Hirano T (2004) Oscillating Purkinje

neuron activity causing involuntary eye movement in a mutant mouse deficient in the glutamate receptor $\delta 2$ subunit. *J Neurosci* 24:2440-2448.

Yue Z, Horton A, Bravin M, DeJager PL, Selimi F, Heintz N (2002) A novel protein complex linking the $\delta 2$ glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron* 35:921-933.

Yuzaki M (2009) New (but old) molecules regulating synapse integrity and plasticity: Cbln1 and the $\delta 2$ glutamate receptor. *Neuroscience* 162:633-643.

Zhang W, Rohlmann A, Sargsyan V, Aramuni G, Hammer RE, Südhof TC, Missler M (2005) Extracellular domains of α -neurexins participate in regulating synaptic transmission by selectively affecting N- and P/Q-type Ca^{2+} channels. *J Neurosci* 25:4330-4342.

Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.

書籍

Purves D, Augustin GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM
Neuroscience (Third Edition) SINAUER 2004

謝辞

本研究を進めるにあたり、平野丈夫教授には懇切丁寧にご指導していただきました。何度も自信を失い、あきらめそうになる私を優しく見守っていただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。田川義晃講師にはアドバイスをいただき、研究に対する姿勢を教えていただきました。技官の石井貴美子さん、澤田真紀子さん、秘書の板橋彩さん、西山あゆみさん、岡田美木さん、田中優子さん、清水実験材料の和田里美さんには研究を円滑にすすめる手助けをしていただきました。また、女性が少ない環境の中、様々な相談にのっていただき、心の支えになっていただきました。1年間直接指導していただいた大槻元博士には、実験手法だけでなく、研究に対する心構えなど、多くのものを教えていただきました。研究室を移られた後も、たびたびアドバイス等をいただきました。心より感謝しております。川口真也准教授には、理論計算について、何もわからず、つまずいてばかりいる私に1から丁寧に教えていただきました。また、何か問題が起こったときでもすぐに対応していただき、いつも頼りにさせていただきました。吉田盛史博士・山寄義人氏・横山まりえさん・柳キョンヒさんとは、一緒に論文を書かせていただきました。貴重な経験をさせていただきました。その他研究室の皆様には様々な助言や討論をしていただきました。中島エリザベス博士には英語のご指導・添削をしていただきました。この場を借りてお世話になったすべての方に心から御礼を申し上げます。

最後に、精神的にも経済的にも支えていただき、自由に研究に打ち込ませてくれた母・和子と姉・優香里に感謝の意を表したいと思います。いつも笑顔で私を迎えて癒してくれる姪・琴宝ちゃんと甥・碧杜くんも本当にありがとう。