

氏 名 菊地原 沙織

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1943 号

学位授与の日付 平成29年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Bergmann glia actively participate in the pruning of climbing  
fiber-Purkinje cell synapses

論文審査委員 主 査 教授 鍋倉 淳一  
教授 池中 一裕  
教授 吉村 由美子  
教授 渡邊 雅彦 北海道大学

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

Synapse pruning is a fundamental mechanism underlying the plasticity of nervous system. Recent studies indicate that not only neurons but also glial cells have active roles in synapse pruning. This study investigated the role of Bergmann glia (BG), cerebellum-specific astrocytes, in pruning of the climbing fiber (CF) - the Purkinje cell (PC) synapses in the cerebellum.

There has been no good procedure to study the role of BG in CF-PC synapse pruning. Degeneration of BG would cause severe inflammation, and activated microglia and/or infiltrated immune cells might affect the pruning procedure. I used *Mlc1* overexpressing mice (*Mlc1*-mtTA::*Mlc1* tetO homo, *Mlc1*-OE), whose BG are mostly found in the molecular layer (ML), as a tool to examine the role of BG in CF-PC synapse pruning.

*Mlc1* is a causative gene for Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). MLC is an infantile-onset inherited disease of the white matter. Water content of the cerebral white matter in MLC is highly increased. The expression of *Mlc1* is relatively high in the brain. In the brain, *Mlc1* is found in the cell membrane of astrocytes, especially in the endfeet at the blood-brain and cerebrospinal fluid (CSF)-brain barriers. Thus it has been suggested that *Mlc1* could have a channel or transporter function involved in the brain water and ion homeostasis. *Mlc1* expression pattern in BG and their precursor, radial glia (RG) changed during development. In *Mlc1*-OE, major portion of BG mislocalized in the ML. The onset of BG mislocalization was postnatal day (P) 10, the age corresponds with the initiation of CF-PC synapse translocation from PC soma to its dendrites. Lucifer-yellow staining visualized that the mislocalized BG did not extend the processes towards the Purkinje cell layer (PCL), indicating that mislocalized BG have little chance to contact PC soma. Indeed, wrapping of PC soma by glutamate-aspartate transporter (GLAST) positive membrane was extensively reduced in *Mlc1*-OE. In *Mlc1*-OE, PCs with incomplete wrapping of soma by GLAST positive membrane were occasionally observed. Thus, I used *Mlc1*-OE as a tool to examine the role of BG in the pruning of CF-PC synapses. Immunohistochemical study revealed that both pruning and translocation of CF-PC synapses were inhibited in *Mlc1*-OE. To clarify the number of CFs innervating to the PCs in *Mlc1*-OE, electrophysiological analysis was done. In *Mlc1*-OE, there were unique slow EPSCs (slow components) which showed extraordinary long rise time (> 1 ms). These responses had a similar property found in previously reported mice with glutamate spillover. Considering reduction of GLAST positive membrane around the PC soma, the slow component was speculated to be caused by glutamate spillover from nearby PCs. Thus, only the fast rise time components (< 1 ms) were counted as the responses to the innervating CFs. Electrophysiological analysis showed that the competitive selection of CFs during postnatal development was not affected in *Mlc1*-OE.

In the results obtained so far, it is unclear whether mislocalization of BG is really responsible for the deficiency of CF-PC synapse pruning because *Mlc1*-OE BG show abnormality

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

in Mlc1 expression level in addition to BG mislocalization. Thus, I tried to separate these two phenotypes. I achieved this by regulating the period of Mlc1 overexpression by doxycycline (DOX) administration to Mlc1-OE, which inhibits overexpression of Mlc1; i.e. during DOX administration Mlc1 expression level is normal. In Mlc1-OE DOX-administered from embryonic day (E) 0 to P7 (Mlc1-OE DOX E0-P7) BG aligned in the PCL at P28. Pruning of CF-PC synapses in Mlc1-OE E0-P7 was not affected even though Mlc1 was overexpressed. In contrast, in Mlc1-OE DOX-administered from P10 to P28 (Mlc1-OE DOX P10-P28) BG mislocalized in the ML at P28, but Mlc1 expression level was normal. In Mlc1-OE DOX P10-P28, pruning of CF-PC synapses was inhibited. These results suggested that mislocalization of BG, not Mlc1 overexpression, is the cause of impaired CF-PC synapse pruning.

Previous reports indicate that parallel fiber (PF)-PC inputs is an important factor for the CF-PC synapse pruning. Thus, I immunostained sections with a PF synapse marker, vesicular glutamate transporter 1 (vGluT1), and a PC marker, calbindin, to investigate above possibility. Immunohistochemical results showed no abnormality in the PF-PC synapse formation in Mlc1-OE. These results suggest that localization of BG in PCL does not affect CF-PC synapse pruning via alteration of PF-PC synapses.

Recently it has been reported that cortical astrocytes take part in synapse pruning by engulfing unwanted synapses. Considering the heterogeneity of astrocytes, it is under debate whether the pruning ability is commonly shared in all types of astrocytes or a unique property of selected astrocytes. In this study, I showed that mislocalized BG lost contact with PC leading to the failure of CF-PC synapse pruning, demonstrating that BG are essential for CF-PC synapse pruning.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

シナプスの刈り込みは、発達期における神経回路機能の可塑性を調節する主要な機構の一つであり、近年、グリア細胞がシナプスの刈り込みに積極的に関与することが示唆されている。菊地原氏は、小脳特異的なアストロサイトであるバグマングリアがマウス小脳の登上線維-プルキンエ細胞間シナプスの刈り込みに関与しているかについて、Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts発症の責任遺伝子MCL1の発現産物であるMlc1が過剰発現しているマウス(Mlc1過剰発現マウス)を用いて検討した。Mlc1過剰発現マウスでは 登上線維-プルキンエ細胞間シナプスの刈り込みが起こる時期までにglutamate-aspartate transporter (GLAST)で標識したバグマングリアの大部分が小脳分子層に異所的に局在していた。また、登上線維シナプスの刈り込みが起こる場所であるプルキンエ細胞体は、コントロールマウスではバグマングリア膜で完全に覆われていたが、Mlc1過剰発現マウスではプルキンエ細胞体周囲の一部でバグマングリア膜の欠損が観察された。登上線維終末マーカーのvesicular glutamate transporter (vGluT2)とプルキンエ細胞マーカーのcalbindinの二重免疫組織化学的染色を行った結果、細胞体に接している登上線維終末数が4つ以上観察されたプルキンエ細胞の数が、Mlc1過剰発現マウスでは有意に増加していた。また、シナプス除去過程で観察される登上線維シナプス終末のプルキンエ細胞体から樹状突起への移行の距離は、Mlc1過剰発現マウスではコントロールマウスの2/3程度にまで低下していた。

次に、登上線維の刈り込みの機能的な評価のためにシナプス電流記録を行った結果、コントロールマウスとMlc1過剰発現マウス両者において、複数の登上線維のうち1本の線維の機能強化は行われていることがわかった。一方、Mlc1過剰発現マウスでは、立ち上がり時間が異常に遅い電流応答が見られる細胞が多く存在した。同マウスのプルキンエ細胞体においてバグマングリア膜の一部欠損部位が見られることと合わせると、グルタミン酸が再取り込みされずに漏れ出ている状態（スピルオーバー）になっていることに起因することが示唆された。

Mlc1過剰発現マウスにおいてシナプスの刈り込みが阻害された原因としては、バグマングリアの位置の異常とMlc1の発現レベル異常の可能性が考えられる。そこで、tTAプロモーターの活性化をドキシサイクリン(Dox)投与により制御し、Mlc1の過剰発現を時期特異的に調節した。バグマングリアの位置は正常だがMlc1は過剰発現しているマウス(DOX投与期間：胎生期-生後7日目)でプルキンエ細胞体におけるシナプスの刈り込みに異常はなかった。一方で、バグマングリアの位置は異常だがMlc1の発現はコントロールと同じ程度のマウス(DOX投与期間：生後10日-28日)ではシナプスの刈り込みが阻害された。以上の結果より、バグマングリアの位置異常がプルキンエ細胞体におけるシナプスの刈り込み阻害の原因である可能性が示された。

本研究では、Mlc1 過剰発現マウスにおけるバグマングリアの位置の異常が登上線維-プルキンエ細胞間シナプスの刈り込みの阻害の原因であるという結果から、バグマングリアがプルキンエ細胞層に存在することが登上線維-プルキンエ細胞間シナプスの刈り込

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

みに必要であることを示した。ミクログリアが発達期におこるシナプス刈り込みに関与するというこれまでの報告に加え、アストロサイトも神経回路再編の主要メカニズムの一つであるシナプス刈り込みに関与しているという新たな知見を明示した。本研究が学位論文にふさわしいとして、審査委員全員の意見が一致した。