

## 審査の結果の要旨

氏 名 李 勝天 (LI SHENGTIAN)

本研究は、神経系の可塑性として知られている海馬の長期抑圧現象 (LTD) の分子機構を解明する一環として、電気刺激を用いずに、脳切片の細胞外灌流溶液の $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Mg}^{2+}$ の濃度を調整することによって、海馬CA1領域の広範囲でLTDを誘発することを可能にしたものである。主な実験結果は下記の通りである。

- 1 細胞外灌流液の $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 濃度をそれぞれ2 mM、2 mMから4 mM、0.1mMに変化させて高 $\text{Ca}^{2+}$ /低 $\text{Mg}^{2+}$ 灌流液を作成し、電気刺激を与えずに20分間投与した結果、平均29%のLTDが誘導された。したがって、高 $\text{Ca}^{2+}$ /低 $\text{Mg}^{2+}$ 灌流液の投与によりCA1領域の広範囲のシナプスでLTDが誘導されたと考えられる。
- 2 細胞膜電位を-80mVに固定し、単一のCA1神経細胞の自発性whole-cell EPSCを記録した。field potential recordingとなるべく同じ条件にするため、通常自発性whole-cell EPSCを測定するときに用いられるTTX (膜電位依存性 $\text{Na}^{+}$ チャンネルの阻害剤) とbicuculline (GABAA受容体阻害剤) を投与しない状態で、標準灌流液と高 $\text{Ca}^{2+}$ /低 $\text{Mg}^{2+}$ 灌流液投与後の自発性EPSCを記録した。その結果、標準灌流液と比べて、高 $\text{Ca}^{2+}$ /低 $\text{Mg}^{2+}$ 灌流液の存在下では自発性EPSCの平均振幅と出現頻度とも増加した。また、AMPA型グルタミン酸受容体の阻害剤であるCNQXとNMDA型グルタミン酸受容体の阻害剤であるD-AP5をそれぞれ20  $\mu\text{M}$  と50  $\mu\text{M}$ 同時投与した結果、自発性whole-cell EPSCがほぼ完全に阻害された結果から、以上で観察された自発性whole-cell EPSCは自発性のグルタミン酸放出に伴うシナプス反応であることが判明し、高 $\text{Ca}^{2+}$ /低 $\text{Mg}^{2+}$ 灌流液の投与により自発性のグルタミン酸放出が増加したことが示唆された。
- 3 高 $\text{Ca}^{2+}$ /低 $\text{Mg}^{2+}$ 灌流液の投与によりLTDを誘導してから低頻度刺激を与えても

それ以上のLTDは誘導されず、又逆に低頻度刺激によりLTDを誘導してから高Ca<sup>2+</sup>／低Mg<sup>2+</sup> 灌流液を投与してもそれ以上のLTDは誘導されなかった。以上の結果から、この二種類のLTDは少なくとも一部のメカニズムを共有していることが示唆された。

- 4 高Ca<sup>2+</sup>／低Mg<sup>2+</sup> 灌流液により誘導されるLTDはD-AP5 (50 μM) と代謝型グルタミン酸受容体の阻害剤であるMCPG (1 mM) のそれぞれ単独投与では抑制されなかったが、D-AP5とMCPGの同時投与によって有意に抑制された。従って高Ca<sup>2+</sup>／低Mg<sup>2+</sup> 灌流液の存在下ではNMDA型グルタミン酸受容体依存性と代謝型グルタミン酸受容体依存性の二つの経路が活性化され、いずれの経路もLTDの誘導に貢献していると考えられる。
- 5 高Ca<sup>2+</sup>／低Mg<sup>2+</sup> 灌流液により誘導されるLTDは、カルシニューリンの特異的阻害剤であるFK506の細胞外投与により有意に抑制されたことから、カルシニューリンの活性がこのLTDの誘導に必要なことが示唆された。又、従来の低頻度刺激により誘導されるLTDの形成にもカルシニューリンの活性が必要であることから、カルシニューリンの活性がこの二種類のLTDの共通したメカニズムであることが示唆された。

以上、本研究はラット海馬のCA 1 錐体細胞において、低頻度電気刺激の代わりに高Ca<sup>2+</sup>／低Mg<sup>2+</sup> 灌流溶液を20分間投与することによりCA 1 領域の広範囲のシナプスでLTDが誘導されることを明らかにした。これまで、生化学や分子生物学などの手法によりLTDの形成に関わる物質を解析することは困難であったが、本研究はそれらの手法による解析を可能にするために重要な方法論を提案するに至った。本研究で見出された結果はLTD形成の分子機構の解明に重要な貢献をなすものと考えられるので、学位の授与に値する。