

論文の内容と要旨

論文題目 "Mechanism for the phorbol ester-induced facilitation of transmitter
release"

和訳 ホルボールエステルによるシナプス伝達物質放出増強メカニズムの解析

指導教官 高橋智幸教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 堀哲也

ホルボールエステルは伝達物質放出を促進することが様々なシナプスで報告され、そのメカニズムとして PKC のリン酸化による Ca チャネルの活性化、または K チャネルの抑制、あるいは Ca 流入後のシナプス伝達物質放出機構の活性化などの可能性が示唆されてきた。しかしこれまでの研究はいずれも間接的方法によっており、シナプス前終末での直接的な証拠は得られていなかった。そこで我々はラット脳幹横断面スライス標本を作製し、聴覚路の中継核である台形体内側核(MNTB)の興奮性シナプスの、Calyx of Held と呼ばれる巨大シナプス前終末を顕微鏡下に同定してホールセル記録を行い、ホルボールエステルによる増強効果を検討した。

実験方法としてはまず細胞外刺激電極を用い MNTB にシナプス応答を誘発し、

シナプス後細胞ホールセル電位固定下にて興奮性後シナプス応答(EPSC)を記録した。次にシナプス前終末端及びシナプス後細胞から同時にホールセル記録を行い、シナプス前終末の活動電位により誘発される EPSC を記録した。また、ホルボールエステルの増強作用に対する、シナプス前終末及びシナプス後細胞の寄与を分離して考察するため、シナプス前終末からテトロドトキシン存在下に Ca 電流及び K 電流を、シナプス後細胞からは自発性微小 EPSC(mEPSC)を記録した。

2分間のホルボールエステル phorbol 1,2-dibutrate (PDBu) の灌流投与により、EPSC の振幅は増大し、この増大は灌流投与終了後 20 分経過後も持続した。PDBu の不活性類似対である 4α -PDBu 投与ではこの増強は認められなかった。

次に PDBu がシナプス後細胞上の受容体の感度を変化させている可能性を検討するため mEPSC に対する PDBu の効果を観察した。PDBu 灌流投与により mEPSC の頻度の上昇が観察されたが投与前後での mEPSC の振幅は変化しなかった。この実験結果より PDBu によってシナプス後細胞の受容体の感受性は変化しないことが明らかになった。また mEPSC の頻度が上昇することから、シナプス前終末に起因する増強が示唆された。

次に PDBu がシナプス前終末の Ca チャネルおよび K チャネルに作用する可能性を検討するため、前終末から電位依存性 Ca 電流と K 電流を記録し PDBu を投与したが、電位依存性 Ca 電流及び K 電流はいずれも変化しなかった。これらの結果は、ホルボールエステルに誘発されるシナプス増強にはシナプス後細胞の受容体及びシナプス前終末の Ca チャネル・K チャネルのいずれもが関与してお

らず、専らシナプス前終末内への Ca 流入過程以降のシナプス小胞開口放出機構への作用であることが示唆された。

次に PKC 活性化のこの増強への関与を考察するため、PKC 阻害剤存在下で PDBu によるシナプス増強を観察した。PKC 阻害剤である BIS 及び Calphostin C 存在下では、PDBu によるシナプス増強効果が抑制された。また、シナプス前終末へ PKC 阻害ペプチドを直接注入したところ、同様に PDBu によるシナプス増強が抑制された。この結果から PKC がホルボールエステル誘発性のシナプス増強に関与することが示された。

PKC の分子種を明らかにするために、シナプス前終末の Ca 濃度減少の PDBu によるシナプス増強への影響を観察した。膜透過性 Ca キレート剤である EGTA-AM を標本に前処理をしたところ、PDBu によるシナプス増強効果は変化しなかった。また、シナプス前終末へ EGTA を直接注入しても、PDBu による増強効果には影響がなかった。この結果からホルボールエステル誘発性のシナプス増強には Ca 濃度非感受性である novel 型の PKC 分子種が関与していることが示された。novel 型 PKC の PKC ϵ の抗体による免疫組織化学の実験により、PKC ϵ がシナプス前終末に存在することが観察された。この結果から PKC ϵ がホルボールエステル誘発性のシナプス増強に関与することが示された。

次に Doc2 α -Munc13-1 複合体形成阻害部分ペプチドである Mid をシナプス前終末へ注入したところ、PDBu によるシナプス増強が抑制された。

次に高頻度刺激中のシナプス枯渇に対するホルボールエステルの効果を観察した。100Hz の高頻度刺激中にはホルボールエステルによる増強効果がみられな

かった。100Hz刺激により得られた実験結果をもとに EPSCの累積応答を計算し、放出可能なシナプス小胞の数(N)と小胞の放出確率(p)を算出した。ホルボールエステルにより Nと pはどちらも上昇した。

以上の実験結果より、ホルボールエステルによるシナプス増強はシナプス前終末からの伝達物質の放出の促進によるもので、Ca 流入後のシナプス小胞放出過程の増強である事が示された。またホルボールエステルの標的は Doc2 α と Munc13-1 の結合過程及び Ca 非感受性型 PKC である PKC ϵ による放出関連蛋白質の磷酸化である事が示された。ホルボールエステルはシナプス前終末の放出可能なシナプス小胞の数と小胞の放出確率を上昇することによりシナプス伝達を増強することが確認された。