

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 松 崎 政 紀

本研究は、哺乳動物中枢神経細胞の樹状突起上のスパインの形態と AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) の機能的発現の関連性を調べるために、ケイジドグルタミン酸を 2 光子励起法によって局所的に活性化することで、単一スパインでの AMPAR 反応の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 2 光子吸収断面積が大きく、水溶液中で安定な新規のケイジドグルタミン酸を開発し、2 光子励起法を用いて 3 次元的な任意の一点でグルタミン酸を放出し、同時に蛍光観察を行えるシステムを構築した。ホールセルクランプしたラット培養海馬細胞の樹状突起近傍でケイジドグルタミン酸を 2 光子励起法によって $50 \mu\text{s}$ の間だけ活性化させると、シナプス前終末からのグルタミン酸の放出で起きる mEPSC とほぼ同一の時間経過を持つ AMPAR による電流を誘起することができた。その反応の空間解像度は水平方向で $0.45 \mu\text{m}$ 、垂直方向で $1.1 \mu\text{m}$ であり、2 光子励起法としての理論的な限界値を達成した。シナプス前終末のシナプス小胞からの開口放出という生理的現象に極めて近いグルタミン酸の放出を、光学的に作り出すことが初めて可能になった。
2. この方法論をラット海馬のスライス標本に適用し、ホールセルクランプした CA1 錐体細胞の樹状突起に沿って 3 次元的にグルタミン酸感受性のマッピングを行った。グルタミン酸感受性はスパインの体積に強く相関し、キノコ型の大きな頭部を持つスパインでは強く、細いスパインや細長いフィロポディアでは反応がないか、弱い反応しか得られなかった。この結果から、いわゆる「サイレントシナプス」が後者の形態をも

ったスパインである可能性が示唆された。キノコ型スパインにおいて非定常状態ノイズ解析を行い、機能的な AMPAR の数は単一スパインあたり最大で約 150 個存在することが示された。

3. グルタミン酸感受性及び形態（体積）の空間的な自己相関を求めると、距離にして 1 μm 以下の隣接したスパイン間においても両者共に相関が無かった。これらの結果から、スパインの形態と機能的 AMPAR の発現は強く相関しており、その機能的発現量は高いダイナミックレンジを持ちながら、単一スパインレベルで独立に調節されていることが示された。

以上、本論文はラット海馬 CA1 錐体細胞において、ケイジドグルタミン酸の 2 光子励起法による活性化によって、単一スパインレベルでの AMPA 型グルタミン酸受容体の機能的発現を可視化し、その発現量がスパインの形態と強い相関関係にあることを明らかにした。本研究はこれまで調べることのできなかつた中枢神経細胞の樹状突起上のスパインの形態と機能の関係性の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。