

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 藤原明子

本研究は、小脳プルキンエ細胞における長期抑圧(LTD)形成に主たる役割を担うカルシウムシグナル経路を明らかにするため、マウス小脳を題材に、新しい生理活性測定法と電気生理学的方法を用いて進められた。プルキンエ細胞に発現するカルシウム放出チャネルである IP_3 受容体の基本性質の解析と、カルシウムシグナルと長期抑圧を結ぶ因子の同定を試み、下記の結果を得ている。

1. 低親和性 Ca^{2+} 蛍光指示薬 (Furaptra) をマウスの胎児小脳から調製したプルキンエ細胞初代培養系(培養 3 週目)の細胞質および小胞体に負荷した。次に、細胞膜を界面活性剤で透過性にして、細胞質の色素を除去すると共に、細胞質の Ca^{2+} および IP_3 濃度を制御できるようにした。このようにして、プルキンエ細胞の小胞体内腔の Ca^{2+} 濃度を制御された細胞質環境においてリアルタイムイメージングすることに初めて成功した。
2. 上記の解析系を用いた結果、小脳プルキンエ細胞における IP_3 受容体の IP_3 に対する感受性は、他の組織に発現している同じサブタイプの受容体や、精製した小脳由来の受容体よりも約 20 倍低い($EC_{50} = 25.8 \mu M$)が、 Ca^{2+} 感受性については差がない、ということが示された。また、 IP_3 受容体の密度は細胞体よりも樹状突起のほうが 1.5 倍高いことも示された。以上のような IP_3 受容体の性質は、拡散性の高いシグナル分子である IP_3 の効果を局所に限り、シナプス可塑性に局所性を持たせることに貢献していると考えられた。
3. LTD 形成に必須である細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の下流の一つに Ca^{2+} 依存性脱リン酸化酵素カルシニューリンがあると仮説を立て、これを検証した。マウスから小脳スライス標本作製してホールセルパッチクランプ法によりプルキンエ細胞の電気生理学的記録を行なった。始めに、カルシニューリン抑制薬であるサイクロスポリン A が平行線維-プルキンエ細胞シナプスの興奮性後シナプス電流(EPSC)に与える影響を調べた。通常細胞外液中で EPSC を測定し、その振幅が 10 分以上安定したことを確認した後、細胞外液を $1 \mu M$ サイクロスポリン A を含む細胞外液と置換した。EPSC の振幅はサイクロスポリン A を入れた前後で変化せず、その振幅の安定は置換後 1 時間以上は持続した。従って、この薬物が平行線維-プルキンエ細胞間の EPSC の振幅に直接の影響は及ぼさないことが確認できた。

4. 1 μ M サイクロスポリン A で 1 時間以上処理した小脳スライス標本上で、平行線維刺激とプルキンエ細胞の脱分極(登上線維刺激の代用)が同期した反復刺激を 1Hz、300 秒間(以下、LTD 誘導刺激)行った。刺激後 20-30 分後において、薬物なしの対照実験では EPSC が約 30%低下する LTD が観測されたが、サイクロスポリン A 中では EPSC の低下は約 15%にとどまり、LTD の形成が有意に抑制された。また、別のカルシニューリン阻害薬である FK506 を用いても全く同じ結果が得られ、LTD 形成が抑制された。
5. カルシニューリン阻害薬を細胞外液中に入れたことで LTD 形成が抑えられた原因を解明するため、シナプス前終末(平行線維側)からのグルタミン酸放出が薬物により増強されたため、後膜側(プルキンエ細胞側)のグルタミン酸に対する応答の低下が打ち消された、という可能性を検証した。パッチ電極内に BAPTA 20 mM を入れ、プルキンエ細胞内 Ca^{2+} をキレートしてシナプス後膜側で LTD が起きない状態にし、LTD 誘導刺激をサイクロスポリン A 投与群と非投与群に対して行った。刺激後の EPSC の振幅は両群ともに刺激の前後で有意な変化はみられず、両群間にも有意な差は見られなかった。
6. シナプス後膜側での LTD 形成経路が妨げられた可能性を検証するため、カルシニューリン阻害ペプチドを含んだパッチ電極内液でプルキンエ細胞をパッチクランプし、シナプス後膜側のみでカルシニューリンを阻害した条件下にて LTD 誘導刺激を行った。この実験の対照実験には、阻害ペプチドの特異的配列をスクランブルしたペプチドをパッチ電極内液に含んだものを用いた。対照実験では EPSC が約 30%低下する LTD が観察されたのに対し、カルシニューリン阻害ペプチド入りの内液でパッチクランプした細胞では刺激前のものに比べて EPSC がほとんど変化せず、LTD 形成が有意に抑えられた。以上の結果は、LTD 誘導刺激に引き続くプルキンエ細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が少なくともカルシニューリンを活性化することで LTD を形成していることを強く示唆している。

以上本論文は LTD 形成に必須であるというプルキンエ細胞内のカルシウムシグナル系を担う IP_3 受容体の機能解析を行うことで、新たな IP_3 受容体の生理的役割を示し、また、これまで未知であった LTD 誘導刺激後に生じる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の下流には少なくともカルシニューリンがあることを示した。これらの結果は LTD 形成におけるカルシウムシグナル経路網の解明に重要な貢献を示すと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。