

論文の内容の要旨

論文題目 cAMP 依存性プロテインキナーゼによる神経伝達物質放出の両方向性制御
Bidirectional regulation of neurotransmitter release by cAMP-
dependent protein kinase

氏名 古賀 毅

神経細胞間のシナプス伝達は、シナプス結合部において開口放出される神経伝達物質を介して行われている。シナプス伝達機構の解明は、記憶・学習の分子メカニズムを理解する上でも非常に重要であるが、次の二つの課題が未解決のテーマとして残されている。

第一の課題は、多様な細胞集団である神経系において、どのような生理活性物質がシナプスで放出され、神経回路の機能制御に関わっているか、まだ完全に明らかにされていない点。第二の課題は、伝達物質放出がどのような機構で制御され、それが記憶・学習に如何なる役割を持っているのかについて明らかにされていない点である。開口放出の一連の過程は、非常に多種類のシナプスタンパク質によって制御されており、様々なプロテインキナーゼによるシナプスタンパク質のリン酸化が、シナプス伝達の機能調節に重要であると考えられている。しかし、その具体的な機構については、多くが未解明のままである。

私はこれらの問題を明らかにしていくため、培養小脳細胞、PC12 細胞、および副腎髄質クロマフィン細胞を用いて、開口放出機構とリン酸化によるその制御の解析を行った。

培養小脳細胞を用いた実験系では、内在性アミノ酸の開口放出の解析を行った結果、神経伝達物質であるグルタミン酸 (Glu) や γ -アミノ酪酸 (GABA) と同様に、従来は神経伝達物質/修飾物質として認知されていなかったアラニン (Ala) がシナプス小胞の開口放出によって放出されていることを見出した。さらに、Ala 放出は Glu や GABA 放出とは異なるリン酸化機構によって制御されている可能性を見出した。

PC12 細胞を用いた実験系では、伝達物質放出の制御に関わるプロテインキナーゼとして、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) に焦点を絞り、その制御機構を解析した。PKA の選択的阻害剤 H-89 は、dBcAMP による PC12 細胞からのカテコールアミン (CA) およびアセチルコリン放出促進を阻害するだけでなく、単独で投与した場合もこれらの放出を無処理群のレベル以下にまで抑制した。また、PC12 細胞の PKA 変異株 A126-1B2 からの CA 放出は、対照株で見られるような dBcAMP による CA 放出の促進が起きず、dBcAMP 非存在下での放出能自体が顕著に低かったことから、PC12 細胞内では PKA が持続的に活性化されている可能性が示唆された。A126-1B2 に PKA をトランスフェクションしたところ、Ca²⁺依存性、Ca²⁺非依存性いずれの開口放出能も有意に回復したことから、PC12 細胞における PKA の持続的活性化は、CA の放出能の維持に機能していると結論した。

副腎髄質クロマフィン細胞を用いた実験系では、単一の分泌小胞からの伝達物質放出量 (放出素量) を測定する手法であるアンペロメトリー法を用いて、CA 放出の高時間分解測定を行なった。その結果、PKA の持続的な活性化の阻害により、CA の放出素量が減少することを発見した。また、測定シグナルの形状の解析から、放出素量の減少が膜融合の初期に形成されるフュージョン・ポアの不安定化に起因する可能性が示唆された。

以上の結果から、PKA の持続的な活性化は開口放出能の維持に働いており、その更なる活性亢進により開口放出を促進し、逆に低下させることにより開口放出を抑制するという、両方向性の制御に関わっている可能性が示唆された。このような制御機構はシナプス可塑性の実体と考えられている、長期増強と長期抑圧のいずれも誘導できることから、効率的な記憶・学習の成立を可能にしているものと考えられた。