[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目

Roles of presynaptic functional molecules in synaptic transmission and plasticity in the hippocampus.

海馬でのシナプス伝達と可塑性におけるシナプス前機能分子の役割

指導教員　真鍋俊也　教授

東京大学大学院医学系研究科
平成 13年4月入学

医学博士課程　脳神経医学専攻

氏名　熊澤　紀子

学習によって獲得された情報は、海馬が中心となって短期記憶から長期記憶へと変換され、最終的には大脳皮質に貯蔵される。動物個体を用いた薬理実験をはじめとした様々な脳の機能解析により、近年では海馬におけるシナプス可塑性は記憶・学習の細胞レベルの分子基盤であると考えられている。シナプス可塑性には長期増強（long-term potentiation: LTP）を代表とする長期可塑性（long-term plasticity）と短期可塑性（short-term plasticity)の 2 つのタイプがあり、LTP は記憶貯蔵の細胞レベルにおけるモデルであるとされている。LTP の分子メカニズムについては盛んに研究が行われているが、まだ不明

な点も多い。

数多くの機能分子がシナプス可塑性の誘導や発現に関与しているが、今回、海馬 CA1 領域においてシナプス前機能に関与すると思われる 2 つの機能分子に注目し、それらのシナプス可塑性の誘導閾値の修飾や LTP の発現における役割について研究を行った。

＜第 1 章＞

クラスリンアダプタータンパク質 AP-3B 欠損マウスにおける GABA による海馬 CA1 領域シナプス可塑性誘導の修飾の異常

AP-3 は、アダプタータンパク質（AP）複合体の一種であり、分泌やエンドサイトーシス経路の小胞輸送に関与している。AP-3 には全身に分布する AP-3A と神経特異的な AP-3B という 2 つのアイソフォームが存在する。AP-3A の生理的役割については近年かなり明らかになってきているが、AP-3B の役割についてはよく分かっていない。AP-3B の海馬における役割を明らかにするために、AP-3B のサブユニットの 1 つである μ3B を欠損するマウスが作成された。このマウスでは興奮性および抑制性シナプスのいずれにおいてもシナプス小胞の密度および径の低下がみられた。また、野生型マウスと変異型マウス間において正常状態では γ-aminobutyric acid (GABA)の放出には差がみられないが、高カリウムにより細胞の興奮性を高めた状態では変異型マウスにおける GABA の放出に著しい低下がみられた。

そこで、このマウスにおいて、このような興奮時における GABA の放出量の低下が海馬 CA1 領域の LTP にどのような影響を及ぼすかを検討した。$GABA_A$ 受容体のアンタゴニストであるピクロトキシン（PTX）の存在下あるいは非存在下で、比較的強い誘導条件および弱い誘導条件によって誘導される LTP について検討を行った。その結果、LTP の誘導条件が相対的に強い場合には、$GABA_A$ 受容体のアンタゴニストであるピク

ロトキシン(PTX)の有無にかかわらず両遺伝子型で同様のLTPが誘導された。しかし、野生型マウスではPTXが存在しないときにLTPが誘導されないような弱い誘導条件においても、変異型マウスではLTPが誘導された。一方、この表現型はPTX存在下では認められなかった。したがって比較的弱い誘導条件によるLTPの誘導においては、変異型マウスではGABAによる抑制効果が減弱したことにより、LTPが誘導されたものと考えられる。

これらの結果より、GABAを含有するシナプス小胞形成と興奮時のGABA放出に関与するμ3Bは、シナプス可塑性の誘導閾値の修飾や発現においても重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

＜第２章＞

海馬CA3-CA1シナプスにおけるシナプス前性TrkB受容体のシナプス可塑性における役割

BDNFやNT-4/5をリガンドとするTrkB受容体は、神経分化、神経シグナル伝達やシナプス可塑性に重要であるといわれている。しかし、TrkB受容体は海馬CA1領域においてシナプス前終末およびシナプス後細胞のいずれにも存在しており、それぞれの詳細な役割については不明な点が多い。そこで、シナプス前部に存在するTrkB受容体の役割を明らかにするために、海馬CA1領域へ求心性線維を投射する海馬CA3領域特異的に*trkB*遺伝子を欠損させた成体マウスの海馬スライスを用い、電気生理学的解析を行った。はじめに、神経伝達物質の放出確率とシナプス前性の短期可塑性について検討するために、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体のアンタゴニストであるD-2-amino-5-phosphonovaleric acid (D-APV)の存在下で、２発刺激促通（PPF: paired-pulse facilitation）および低頻度刺激（LFS: low-frequency facilitation; 5Hz）に対する応答について検討を行

った。その結果、いずれにおいても両遺伝子型間で差はみられなかった。また、D-APVの存在下でより強い刺激条件（100Hz/1s）により誘導されるシナプス前性の短期可塑性の1つであるテタヌス後増強（PTP: post-tetanic potentiation）について検討を行ったところ、変異型マウスにおいてテタヌス後０分から２分にかけて、PTPの減弱がみられた。さらに、N-タイプカルシウムチャネル阻害剤の存在下でPTPを検討したところ、コントロールマウスでは非存在下に比べて有意な減弱がみられたが、変異型マウスでは阻害剤の存在下および非存在下でPTPに差はみられなかった。

これらの結果より、シナプス前性TrkB受容体は、より強い誘導条件（100Hz）によりシナプス前終末への大量のCa^{2+}の流入されるような短期可塑性であるPTPに関与し、そのPTPにおけるN-タイプカルシウムチャネル依存性成分に必要であることが示唆された。

さらに、D-APV の非存在下で LTP におけるシナプス前部に存在する TrkB 受容体の役割についても検討を行った。はじめに、PTP と同じ誘導条件（100Hz/1s）で検討したところ、変異型マウスにおいてシナプス増強がやや減弱する傾向がみられたが、有意な差はみられなかった。また、200Hz/200ms、10 回というより BDNF が放出されやすいと報告されている誘導条件で LTP を誘導したところ、変異型マウスでシナプス増強の有意な低下がテタヌス後２０分まで見られた。さらに、200Hz/200ms、1 回という誘導条件で LTP を誘導したところ、変異型マウスにおいて LTP の減弱がテタヌス後 60 分までみられた。

これらの結果から、シナプス前終末に存在する TrkB 受容体は、より高頻度の 1 回の誘導条件で誘導される LTP の発現において重要な役割を果たしていることが明らかになった。