

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 後藤 純一

本研究は小脳プルキンエ細胞の樹状突起におけるカルシウム放出の機能を明らかにするため、マウス小脳急性スライス中のプルキンエ細胞に対してパッチクランプを行うと共に、カルシウム感受性色素を細胞内に導入することでカルシウムイメージングを行う系にて、生後発達段階におけるシナプス刺激で誘導されるカルシウムシグナルとシナプス可塑性の変化、及び両者の関係について解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

(1) 平行線維のバースト刺激 (50 Hz の頻度で 5 回) によって誘導されるカルシウム上昇をマウスの週齢を様々に変えて測定した結果、2 週齢前後の幼若な時期ではカルシウム放出によるピークがカルシウム流入によるピークに対して相対的に大きく、4 週齢以降の小脳皮質が比較的成熟した時期ではカルシウム放出のピークは小さいことが示された。すなわち、平行線維バースト刺激で誘導されるカルシウム上昇に占めるカルシウム放出のピークの寄与は 2 週齢前後で大きく、成長に伴って低下することが示された。

(2) MCPG を用いて細胞外からのカルシウム流入と細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出を薬理学的に分離する実験を行ったところ、見かけ上のピーク値だけではなく実際のカルシウム放出のみを分離した場合にも、幼若期のプルキンエ細胞ではカルシウム放出活性が高く、より成長した細胞では低いことが示された。

(3) 平行線維バースト刺激を 10 回反復することで LTD を誘導する条件を用いたところ、2 週齢小脳スライスでは LTD が誘導されるが、4 週齢小脳スライスでは LTD が誘導されないことを示した。また、2 週齢においては LTD の大きさには細胞ごとに差異があり、LTD の大きさはカルシウム放出の相対的な活性と有意に相關することが示された。

(4) マウス 1 型 IP_3 受容体の機能阻害抗体 18A10 を細胞内に導入することでカルシウム放出を阻害したところ、LTD 誘導が阻害されることが示された。すなわち、平行線維バースト刺激による LTD の誘導もカルシウム放出に依存していることが示された。

(5) LTD 実験と同様のバースト刺激の反復回数を 90 回に増やしたところ、2 週齢小脳スライス中の平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにおいて、10~20 分程度持続する著明な短期増強 (short-term potentiation; STP) が誘導されることが示された。

(6) STP 誘導によって Paired-pulse facilitation ratio (PPF 比) は刺激直後に上昇し、およそ 20 分間かけてゆっくりと刺激前の値に戻ることが示された。すなわち、PPF 比の変化とシナプス効率の変化は同様の時間経過を辿ることから、STP の発現に前シナプス性機構の関与が認められた。また、この STP はプルキンエ細胞への BAPTA 導入によっても阻害されず、P/Q 型カルシウムチャネルノックアウトマウスにおいても野生型と同様に観測されることから、後シナプスのカルシウム上昇に依存しないことが示された。したがって、バースト刺激による STP は主に前シナプス性の機構によって発現されることが示された。

以上、本論文は生後発達期のマウス小脳プルキンエ細胞において、シナプス刺激によって誘導されるカルシウム放出とシナプス可塑性の解析から、幼若期のプルキンエ

細胞が大きなカルシウム放出活性を持ち、バースト刺激による LTD も誘導されやすいこと、また、カルシウム放出活性と LTD 誘導の間に密接な関係があることを明らかにした。それとともに、同じバースト刺激の反復回数の違いによって、本シナプスで異なる可塑性が誘導され得ることを明らかにした。本研究ではこれまで未知に等しかつた、小脳プルキンエ細胞におけるカルシウム放出、及びシナプス可塑性の生後発達段階における機能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。