

論文の内容の要旨

論文題目 **Mechanisms Determining and Regulating Transmission Efficacy  
at the Brainstem Synapse of Rats**

ラット脳幹シナプスにおける伝達効率の決定・調節機構

指導教員 高橋 智幸 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

山下 貴之

化学シナプスにおいては、神経終末端内カルシウム濃度の上昇がシナプス小胞内伝達物質の開口放出の引き金となる。伝達物質放出の量子（小胞）仮説によれば、単一入力当たりの伝達効率（ $I$ ）は神経終末端における放出可能シナプス小胞数（ $N$ ）、各小胞の放出確率（ $p$ ）および単一小胞当たりのシナプス応答（素量子）サイズ（ $q$ ）によって  $I = N \cdot p \cdot q$  と定義される。これらパラメータのうち  $q$  は、小胞内伝達物質量、後シナプス受容体存在密度および小胞放出部位から後シナプス受容体までの距離の影響を受けて変化する。これらパラメータの変化は神経回路の開閉を通じて中枢神経系の機能に大きな影響を与え得る。したがって、脳機能をより良く理解するためには、これらパラメータの調節メカニズムを明らかにすることが必須である。本研究では、ラット脳幹のグルタミン酸作動性シナプス calyx of Held を用いて  $N$  と  $q$  の決定・調節機構について検討した。

## 1. 放出可能小胞数 $N$ の維持機構の検討

神経伝達物質は神経終末端のシナプス小胞から開口放出（エキソサイトーシス）される。開口放出を終えたシナプス小胞膜は神経終末端の細胞膜に融合した後、エンドサイトーシスによって小胞を形成し再利用される。このシナプス小胞リサイクルシステムは  $N$  の維持に不可欠であるが、そのメカニズムの詳細には不明な点が多い。そこで私は脳幹の巨大シナプス calyx of Held（生後 7–9 日齢）にホールセル・パッチクランプ法を適用して神経終末端の膜容量を測定することにより、シナプス小胞のエンドサイトーシスの速度と分子メカニズムについて検討した。

まず、神経終末端の膜容量変化のすべてがシナプス伝達と関連しているか否かを検討するため、神経終末端とシナプス後細胞からの同時記録を行いながらボツリヌス毒素 E を神経終末端内に投与したところ、シナプス伝達は完全に停止し、神経終末端の膜容量変化の大部分は消失したが、時定数 1 秒以下の速い膜容量変化が残存した。この膜容量成分は、従来 “kiss-and-run” 型のエンドサイトーシスを反映するとされていたものであるが、この実験結果からシナプス伝達に関わらないことが明らかとなった。また、シナプス伝達に関連する膜容量成分の減衰時定数は 10~25 秒であった。シナプス小胞エンドサイトーシスの平均時定数に相当するこの値は膜容量変化量に比例して大きい値を示した。

Calyx of Held の小胞リサイクルには GTP の加水分解が必須である (Takahashi *et al.*, 2000) が、リサイクルのどのステップに必要であるかは明らかでない。そこでエンドサイトーシスの GTP 結合 ( $G$ ) タンパク質依存性を検討した。 $G$  タンパク質の活性を抑える GDP アナログ GDP $\beta$ S を神経終末端内に投与するとエンドサイトーシスの速度が約 2 倍遅くなった。また、非加水分解性の GTP アナログ GTP $\gamma$ S を神経終末端内に注入し、 $G$  タンパク質による GTP の加水分解を遮断すると、エンドサイトーシスはほぼ完全に阻害された。GTP $\gamma$ S は開口放出に対する即時的な効果を示さなかったが、GTP $\gamma$ S 存在下では刺激回数に依存して開口放出量が減少し、約 40 回刺激後にシナプス伝達が完全に停止し

た。これらの結果から、小胞エンドサイトーシスおよびリサイクルには G タンパク質による GTP の加水分解が必要であると結論された。

ショウジョウバエ神経筋接合部では G タンパク質ダイナミン 1 が小胞エンドサイトーシスに必須とされているが、脊椎動物シナプスにおけるダイナミン 1 の役割は明らかでない。そこで、ダイナミン 1 のアンフィファイジンとの結合部位に相当しダイナミン 1 の機能を阻止するペプチドを神経終末端内に投与したところ、GTP $\gamma$ S と同様にエンドサイトーシス阻害と開口放出の使用依存性抑制が認められた。したがって、calyx of Held 神経終末端における小胞エンドサイトーシスとリサイクルによる N の維持にはダイナミン 1 による GTP の加水分解が必要不可欠であると結論された。

## 2. 素量子サイズ $q$ の決定機構の検討

単一シナプス小胞から放出される伝達物質は後シナプス受容体を飽和するため、 $q$  は専ら後シナプス受容体の密度および感度によって決定されるという考え（飽和仮説）が長い間支持されてきたが、近年、これに対立する不飽和仮説を支持する結果が報告されるようになってきた。最も直接的な証拠は calyx of Held において神経終末端にグルタミン酸を注入して濃度を上昇させると  $q$  が増大するという実験結果である（Ishikawa *et al.*, 2002）。しかしながら、この結果は 14-15 日齢の未成熟動物から得られたものであって、生後発達を経た成熟シナプスにおいても不飽和仮説が成立するかは明らかでない。そこで、私は様々な日齢のラットの calyx of Held シナプスから記録を行って生後発達に伴う  $q$  の変化と、成熟動物における飽和仮説の再検討を行った。

はじめに、自発性微小後シナプス電流（mEPSC）を解析したところ、生後発達に伴い mEPSC の発生頻度と平均振幅（ $q$ ）が増大し、mEPSC の時間経過が短縮し、生後 20-21 日齢で安定することが明らかになった。

次に、生後発達に伴う  $q$  の増大の原因が、後シナプス受容体の単一チャンネルコンダクタンス（ $\gamma$ ）の増大である可能性を検討した。mEPSC を構成する AMPA 受容体の  $\gamma$  をチャ

ネルノイズ解析法 (non-stationary fluctuation analysis) によって解析したところ、シナプスの成熟段階に関わらず $\gamma$ の測定値は一定であった。そこで、次に、生後発達に伴う単一小胞内グルタミン酸量の増加によって $q$ が増大する可能性を検討した。AMPA 受容体の低親和性拮抗阻害薬であるキヌレン酸によるシナプス応答の阻害効果は、シナプス間隙内グルタミン酸量が多いほど弱いことが知られている。そこで、13-14 日齢と 28-29 日齢のラットの mEPSC に対するキヌレン酸の阻害効果を比較したところ、28-29 日齢において $q$ の増大に伴ってキヌレン酸の阻害効果が弱くなることが観察された。これらの結果は生後発達に伴うシナプス小胞内伝達物質量の増加が $q$ 増大の一因であることを示唆する。

そこで、増加した小胞内伝達物質が後シナプス受容体を飽和するか否かを成熟シナプスにおいて検討した。生後 4 週齢のラットの calyx of Held 神経終末端とシナプス後細胞から同時記録を行い、パッチ電極を介して高濃度グルタミン酸を終末端内に注入したところ、mEPSC の平均振幅 $q$ が約 1.5 倍に増加した。この結果から、成熟シナプスにおいても単一シナプス小胞から放出される伝達物質は後シナプス AMPA 受容体を飽和しないと結論された。

次に、生後発達を通じて不飽和仮説が成り立つか否かを、幼若ラット (生後 7-8 日齢) の calyx of Held を用いて検討した。この日齢のシナプスでは、小胞の放出確率 ( $p$ ) を上昇させても神経刺激によって誘発される AMPA 受容体を介する興奮性後シナプス応答 (evoked EPSC) の振幅が増大しないことが知られている (Iwasaki et al., 2001)。シナプス前末端と後細胞から同時ホールセル記録を行い、前末端に高濃度のグルタミン酸を注入したところ、 $q$ が約 1.4 倍に増大し、calyx of Held では発達期を通じて後シナプス AMPA 受容体が単一小胞由来のグルタミン酸によって飽和しないことが示された。

一方、高濃度グルタミン酸注入によって evoked EPSC の振幅は増大しなかった。細胞外  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 濃度比を下げて $p$ を減少させた後に同様の実験を行うと evoked EPSC の増大が観察された。これらの結果は複数の小胞に由来する伝達物質の重複によって受容体が飽和に達することを示唆する。

しかし、この見かけ上の飽和には AMPA 受容体の脱感作が関与している可能性が考えられる。そこで cyclothiazide (CTZ) によって AMPA 受容体脱感作をブロックした後、前末端に高濃度グルタミン酸を注入したところ、正常細胞外液においても evoked EPSC の増大が観察され、見かけ上の飽和は AMPA 受容体の脱感作による可能性が示唆された。そこで outside-out patch への急速投与法を用いて AMPA 受容体の脱感作に必要な最低グルタミン酸濃度を検討したところ、1  $\mu$ M 以上のグルタミン酸の持続投与によって AMPA 受容体の脱感作が観察された。0 mM  $Mg^{2+}$  液下で後シナプス細胞から記録される NMDA 受容体電流ノイズを解析したところ、後シナプス細胞周囲のグルタミン酸の定常濃度は 55 nM と推定され、定常的に存在するグルタミン酸は受容体飽和には関わらないことが示唆された。

幼若 calyx of Held において CTZ は evoked EPSC の振幅を増大させるが、同時に AMPA 受容体のグルタミン酸に対する親和性も高めることが知られている。そこで、outside-out patch への急速投与法により AMPA 受容体電流の振幅に対する CTZ の効果を検討したところ、CTZ は飽和濃度のグルタミン酸投与による AMPA 受容体電流の振幅を増大させたことから、CTZ による evoked EPSC の増大は AMPA 受容体の親和性向上によるものではないことが示唆された。これらの結果から、幼若 calyx of Held においては、小胞由来のグルタミン酸によって AMPA 受容体が即座に脱感作し、飽和に達すると結論された。

本研究により、神経終末端におけるダイナミン依存的シナプス小胞エンドサイトーシス・シナプス小胞内伝達物質濃度及び後シナプス受容体の脱感作と飽和は、シナプス伝達効率を調節・決定する重要因子であることが明らかとなった。