

審査の結果の要旨

氏名 山下 貴之

本研究は化学シナプスにおける伝達効率の調節メカニズムを明らかにするため、ラット脳幹のグルタミン酸作動性シナプス calyx of Held を用いて放出可能小胞数と素量子サイズの決定・調節機構について検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. ボツリヌス毒素 E の神経終末端内に投与し、神経終末端およびシナプス後細胞から同時パッチ・クランプ記録を行うことにより、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時定数 1 秒以下の速い膜容量変化がシナプス伝達に関わらないことが示された。一方、シナプス伝達に関連する小胞エンドサイトーシスの時定数は 10~25 秒でありエキソサイトーシス量に比例することが示された。
2. GTP アナログ GTP γ S およびダイナミン 1 ペプチドの神経終末端内への投与により、小胞エンドサイトーシスの停止と使用依存的シナプス抑圧が引き起こされることが示された。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放出可能小胞数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。
3. 自発性微小後シナプス電流 (mEPSC) の平均振幅が生後発達に伴い増加することが示された。また、mEPSC の発生頻度・時間経過も生後発達に伴い変化するが、これらパラメータの変化はすべて生後 20-21 日齢で安定することが示された。
4. mEPSC を構成する AMPA 受容体のチャネル・ノイズ解析により受容体の単一チャネル・コンダクタンスは生後発達によって変化しないことが示された。また、キヌレン酸の mEPSC の振幅に対する効果が発達変化を示したことから、単一小胞内伝達物質量が発達に伴って増加すると結論された。
5. 生後 28-29 日の成熟シナプスにおいて、神経終末端内に 100 mM グルタミン酸

を投与することにより、mEPSC の平均振幅が増大することが示された。したがって、単一小胞内伝達物質質量が増加していると結論された成熟シナプスにおいても後シナプス受容体は飽和していないと考えられた。

6. 幼若 calyx of Held において、神経終末端内に 100 mM グルタミン酸を投与することにより mEPSC の平均振幅が増大する一方、神経刺激誘発性後シナプス電流 (eEPSC) の振幅には変化がないことが示された。細胞外 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 濃度比を下げて放出確率を減少させた後に同様の実験を行うと eEPSC の増大が観察されたことから、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と考えられた。
7. 幼若 calyx of Held において、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 eEPSC の増大が観察され、AMPA 受容体の飽和に受容体脱感作が関与することが示された。
8. 幼若ラットにおける outside-out patch への急速投与方法および NMDA 受容体チャネル・ノイズ解析により、細胞周囲に定常的に存在するグルタミン酸濃度は受容体を脱感作するには不十分であることが示された。さらに、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ることから、幼若シナプス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。

以上、本論文は、ラット脳幹シナプス calyx of Held において、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質量及び後シナプス受容体の脱感作と飽和が、シナプス伝達効率を調節・決定する重要因子であることを明らかにした。本研究は、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シナプス伝達効率の調節メカニズム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。