

[別紙1]

## 論文の内容の要旨

論文題目

**Mechanisms underlying an increase in synaptic efficacy at a brainstem synapse**

和訳

脳幹シナプスにおける伝達効率上昇機構

指導教員 森憲作教授

東京大学大学院医学系研究科

平成16年4月進学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 金子雅博

シナプス伝達効率は神経活動や細胞内メッセンジャーによって修飾を受けることが知られている。シナプス伝達物質放出の促進機構は、シナプス応答の解析によって明らかになったが、技術的制約のために、シナプス前末端から直接記録を行って、このメカニズムを解析した研究はほとんどない。哺乳動物脳幹台形体内側核において聴覚中継シナプスを形成する calyx of Held は巨大シナプス前末端として知られ、げっ歯類脳幹のスライス標本では、顕微鏡直視下に、前末端と後細胞から同時ホールセル記録を行うことができる。私はこの標本を用いて、シナプス伝達物質放出促進機構を解析した。

シナプス前末端における伝達効率促進メカニズムは、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入量の増大と  $\text{Ca}^{2+}$ 流入後のシナプス小胞開口放出機構の活性化に大別することができる。私は電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの活性化による  $\text{Ca}^{2+}$ 流入量増大機構のチャネルサブタイプ特異性、および環状アデノシ

ン1リン酸 (cAMP) による開口放出機構活性化のメカニズムに関して研究を行った。

生後1～2週齢のラットから脳幹スライス標本を作成し、calyx of Heldの前末端から活動電位、後細胞からEPSCを同時記録した。ホールセル記録電極に予め充填したcAMPを前末端に注入するとEPSCの振幅が顕著に増大した。また、cAMPの合成を促進するアデニル酸シクラーゼ活性化剤 forskolin (0.5  $\mu$ M～50  $\mu$ M) を細胞外投与すると濃度依存的にEPSCの振幅が増大した。forskolinの投与によって自発性微少興奮性シナプス電流 (mEPSC) の振幅は変わらず、頻度が増加したことから、forskolinの作用点は専らシナプス前末端と推論された。forskolinの伝達物質放出促進作用が即時放出可能なシナプス小胞数 (N)、放出確率 (P) のいずれに対するものかを明らかにするため、高頻度刺激でEPSCを誘発して、その累積振幅からNを算定し、低頻度刺激で誘発されるEPSCの振幅をNで割ってPを算定したところ、forskolinはN, P共に増大させるという結果が得られた。

次にcAMPの前末端内作用点がCa<sup>2+</sup>流入量の増大、Ca<sup>2+</sup>流入後のいずれかを検討した。calyx前末端から電位依存性I<sub>pCa</sub>および電位依存性I<sub>pK</sub>を記録して、forskolinを投与したところ、いずれの電流にも変化が認められなかった。従ってcAMPの標的はCa<sup>2+</sup>流入以降の開口放出機構と推論された。さらにcAMPの標的がPKAか否かを検討するために、8CPT2Me-cAMPをcAMPと同様な方法で前末端内に注入した。このcAMP誘導体はcAMP依存性GEF (Epac) を活性化する一方PKA活性作用が極めて弱いことが知られる。8CPT2Me-cAMPの前末端内注入はcAMPの作用を上回るEPSCの増強を示した。これに対し、PKA阻害剤H-89、KT5720はいずれもforskolin誘発性シナプス増強に対して無効であった。

以上の結果から、cAMPはシナプス前末端において、PKA非依存的にEpacを活性化することによって即時放出可能シナプス小胞数を増やし放出確率を上昇させ、その結果シナプス伝達効率の上昇をもたらすと推論した。

電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル $\alpha_{1A}$  サブユニットを欠損させたマウス ( $\alpha_{1A}$  KO マウス) および野生型 (WT) マウスの calyx of Held 前末端から  $\text{Ca}^{2+}$ 電流 ( $I_{pCa}$ ) をホールセル記録した。 $\omega$ -Agatoxin-IVA および  $\omega$ -Conotoxin-GVIA によって P/Q 型、N 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルをそれぞれ特異的にブロックして解析した結果、WT マウスの  $I_{pCa}$  は 90%以上が P/Q 型、 $\alpha_{1A}$  KO マウスの  $I_{pCa}$  は N 型と同定された。そこで、この系を用いて、シナプス前末端に発現した N 型と P/Q 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの性質を比較した。活性化の電位依存性曲線を比較すると、N 型チャネルの 50%活性化電位は P/Q 型のそれより約 7mV 脱分極側にシフトしていた。N 型、P/Q 型チャネル不活性化の電位依存性に差異はなかった。

G タンパク共役型受容体はシナプス前末端  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの抑制を介して、シナプス伝達を抑制する。この作用に関して P/Q 型と N 型を比較した。GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬 baclofen の最大濃度 (200  $\mu\text{M}$ ) による  $I_{pCa}$  と EPSC の抑制は、 $\alpha_{1A}$  KO マウスが WT マウスより有意に大きく、G タンパク共役型受容体によって、N 型が P/Q 型より強い抑制を受けることが示唆された。

ラットの calyx of Held から記録される  $I_{pCa}$  の振幅は繰り返し刺激によって活動依存的に増大することが知られている。この性質は WT マウスの P/Q 型  $I_{pCa}$  において再現したが  $\alpha_{1A}$  KO マウスの N 型  $I_{pCa}$  では認められなかった。灌流液の  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 濃度比を下げて、入力繊維を高頻度刺激すると WT マウスでは EPSC が短期増強を示したが、 $\alpha_{1A}$  KO マウスでは短期増強は、ほとんど認められなかった。これらの結果から、シナプス前末端の電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 電流の活動依存性増強は P/Q 型チャネルに固有の性質であり、高頻度刺激下における伝達効率短期増強の一端を担うことが示唆された。伝達物質の放出を媒介するシナプス前末端の  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルが生後発達に伴って N 型から P/Q 型へとスイッチする現象が多数の中樞シナプスにおいて認められるが、このスイッチの役割の一つは、活動依存的に伝達物質放出効率を上昇させることであり、このことにより後シナプス細胞の高頻度入力に対する活動電位発火の信頼性が高まるものと推測される。