

審査の結果の要旨

氏名 中村 健

本研究ではシナプスの短期可塑性に重要な役割を果たしていると考えられるプレシナプス末端における Ca 電流の不活化現象を対象とした解析を行った。プレシナプス末端からの直接的なパッチクランプ記録が可能なラット脳幹スライスを用いて、巨大シナプス(calyx of Held)の前末端から Ca 電流を記録したところ、下記の結果が得られた。

1. P7-9、および P13-15 のラット脳幹スライスを用いてシナプス前末端からの Ca 電流を記録し、2 回パルス刺激による Ca 電流の不活化を検討した。すると、P7-9 において 0.05-2s の刺激間隔において Ca 電流の不活化が見られ、この不活化は CaM 阻害薬であるカルミダゾリウム、MLCK ペプチドにより抑制された。一方、P13-15 においてはどの刺激間隔においても不活化が観察されず、これらの阻害薬も影響しなかった。従って、Ca 電流不活化のメカニズムは発達に伴い消失していくと考えられた。
2. 次に、この CaM 依存的な Ca 電流不活化のシナプス抑圧への関与を検討するため、脳幹スライスのポストシナプスの細胞体から EPSC の記録を行った。0.5-5Hz の繰り返し刺激を行うと EPSC サイズは徐々に小さくなり、最終的には一定のサイズに到達し定常状態に至る。P7-9 の検討においてカルミダゾリウムはこのシナプスの短期抑圧を抑制したが、P13-15 においては特に影響を与えなかった。従って、Ca 電流の不活化のシナプス抑圧への関与も同様に発達に伴い消失していくと考えられた。
3. CaM 依存的な Ca 電流不活化が発達に伴い消失していくメカニズムを検討する目的で以下の実験を行った。

発達に伴いプレシナプスにおける CaM の発現抑制が起こる可能性を検討するため、P8、および P14 ラット由来の脳幹スライスを CaM に対する特異的抗体を用いて蛍光免疫化学染色した。プレシナプスのマーカーとしてシナプトフィジンをを用い、プレシナプスにおける CaM シグナルの平均蛍光強度を算出したところ P8 と P14 では同程度であり、CaM の発現レベルは発達により変化しないと考えられた。

ヘルドの前末端において発達の初期において発現していた N 型 Ca チャネルの発現は徐々に減少していくことが知られており、チャネルサブタイプのスイッチが CaM 依存的な Ca 電流不活化の消失の要因になっている可能性が考えられた。そこで、P7-8 において N 型 Ca チャネル阻害薬である ω -conotoxin GVIA 存在下で Ca 電流を記録したが

Ca 電流の不活化が観察された。従って、N 型 Ca チャネルの発達に伴う発現低下は Ca 電流不活化には関与していないと考えられた。

以上の結果より、細胞内の Ca 環境の変化が Ca 電流不活化の消失の要因になっている可能性が考えられた。そこで、P14 において Ca 電流を記録し、200Hz の繰り返し刺激を 2s 与えたところ、Ca 電流は促通したのち、徐々に減衰し、不活化した。また、より生理的な刺激として活動電位様のパルス刺激を用いて同様の検討を行ったところ、500Hz の繰り返し刺激により同様の Ca 電流の促通と不活化が観察され、この不活化は CaM 阻害薬である MLCK ペプチドにより抑制された。従って、P14 において CaM 依存的な Ca 電流の不活化機構は存在しているが、何らかの発達変化によって P7 よりも強く刺激され Ca イオンが十分積算した時に初めて観察されると考えられた。

以上、本論文はヘルドの前末端からのパッチクランプ記録により Ca 電流不活化のメカニズムが生後発達の初期において存在し、シナプスの短期抑圧に関与することを示した。また、生後発達変化によりプレシナプス末端の Ca 環境が変化することで、そのメカニズムが消失していくことを示した。本研究は Ca 電流の不活化とシナプス短期抑圧の関係、またその生後発達変化を明らかにした初めての研究であり、学位の授与に値するものと考えられる。