

論文の内容の要旨

論文題目 持続したシナプス活動により誘導される
ミトコンドリア依存性シナプス前短期可塑性
指導教員 真鍋 俊也 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 18 年 4 月 進学
医学博士課程
脳神経医学専攻
氏名 森本 卓行

シナプスの長期可塑性は、ある種の記憶等との関連から多くの知見が得られ、そのメカニズムに関しても一定の理解がなされつつある。一方で、シナプスの短期可塑性は様々な刺激パターンに対するそのシナプスの応答を決める重要な因子であるのみならず、高次脳機能の時空間制御において重要な生理的役割を担うと考えられているが、その分子機序に関しては殆どわかっていないのが現状である。短期可塑性の代表的な例の一つに、高頻度刺激後の一過的なシナプス応答の増強であるテタヌス後増強 (posttetanic potentiation: PTP) がある。PTP に関しては様々な実験系でよく研究されているものの、不明な点も多い。特に、今回我々が扱う海馬 CA1 領域の Schaffer 側枝と CA1 錐体細胞とのシナプス (以下、CA3-CA1 シナプス) では、PTP を始めとした短期可塑性のメカニズムについて、未だに多くの研究者を納得させられるだけの実験結果が得られていない状況である。

我々は、今回、海馬スライス標本において、低頻度刺激後にも短期増強が起きることを示し、PTP と比較しながら実験を行うことによって、刺激頻度と応答の関係に関して知見を得、CA3-CA1 シナプスのシナプス前性短期可塑性について新たな考察を加えることができた。そして、ミトコンドリアによるシナプス前部のカルシウム濃度制御が短期可塑性に重要な役割を果たしている可能性を示すことができた。

我々はまず、5Hz 3min の低頻度刺激を加え、その応答を詳細に解析した。電気刺激により発火する軸索の本数の指標 (入力) となる fiber volley を、立ち上がりの最大勾配を計測することによって定量化すると、fiber volley は 5Hz 刺激中に減弱した後、5Hz 刺激終了後数分のタイムスケールで回復することが観察された。一方、シナプス応答の指標 (出力) である興奮性シナプス後電位 (Excitatory postsynaptic potential: EPSP) は 5Hz 刺激の最初の数十秒の間増強した後減弱に向かい、5Hz 刺激終了後は一度ベースライン近くまで跳ね上がり、その後再び減弱し、十数分のタイムスケールで回復していくことが観察された。この 5Hz 刺激終了後の一過的な増強の際、fiber volley はまだ回復しておらず、見かけの EPSP の増強よりも大きなシナプス増強が起きている可能性が示唆された。そこで、我々は、この

低頻度刺激後の短期増強と思われる現象について、詳細な解析とメカニズムの解明を行うことにした。

まず、GABA_A 受容体のアンタゴニストであるピクロトキシン (100 μM) あるいは NMDA 受容体のアンタゴニストである D-APV (50 μM) をそれぞれ投与し、コントロール群と比較する実験を行ったところ、低頻度刺激後の短期増強に顕著な影響はみられなかった。このことから、低頻度刺激後の短期増強に GABA_A 受容体や NMDA 受容体が関与している可能性は低いことが示唆された。

次に、テストパルスを paired pulse にして、paired-pulse ratio (PPR) をモニターすることで、シナプス前性の変化が低頻度刺激後に起きているかどうかを調べた。一般に、PPR が大きいシナプスほど刺激に対する神経伝達物質の放出確率が低いことが知られている。この実験では、低頻度刺激後に一過的な PPR の減少が観察され、この変化は低頻度刺激後の短期増強とほぼ同じタイムスケールであったことから、低頻度刺激後の短期増強は、シナプス前性の放出確率の増大によるものである可能性を示唆する結果となった。

我々は、PTP についてもテストパルスを paired pulse にして PPR をモニターする実験を行った。非常に興味深いことに、PTP での PPR の変化は、変化量、タイムスケール共に、低頻度刺激後の短期増強における PPR の変化と同等であった。このことは、高頻度刺激後の短期増強と低頻度刺激後の短期増強が同様の発現メカニズムを共有している可能性を示唆している。そこで、我々は、高頻度刺激後の短期増強と、低頻度刺激後の短期増強を比較することで、CA3-CA1 シナプスの短期可塑性についてより深い理解が得られるのではないかと考えた。

我々はまず、CA3-CA1 シナプスで PTP への関与の報告のある PKC に関して、阻害剤を用いて PTP 及び低頻度刺激後の短期増強への関与を調べた。Chelerythlene、BIS I、Ro-31-8425 の3つの阻害剤について実験を行った。Chelerythlene (5 μM) に関しては、EPSP のベースラインの減弱が観察されたため、可塑性への影響を検討する実験は行わなかった。BIS I (8 μM) および Ro-31-8425 (10 μM) に関しては、いずれもベースラインに顕著な影響が無く、PTP および低頻度刺激後の短期増強にも影響は無かった。Chelerythlene がミトコンドリアのエネルギー産生に影響を与えるという報告があることもあり、chelerythlene のベースラインへの影響は副作用である可能性がある。BIS I 及び Ro-31-8425 は、これまでの報告から判断して十分効果があると考えられる条件で投与していることから、PKC が短期可塑性に関与することには否定的な結果となった。これら以外に、PKA inhibitor H-89 (2 μM)、CaMKII inhibitor KN-93 (5 μM)、myosin light chain kinase inhibitor ML-7 (10 μM) についてもベースラインへの影響と PTP 及び低頻度刺激後の短期増強への影響を調べたが、顕著な影響は観察されなかった。

次に我々は、細胞内カルシウム貯蔵庫としてのミトコンドリアの役割を考え、コンディショニング刺激中にシナプス前終末内のミトコンドリアにカルシウムが蓄積し、コンディショニング刺激後に放出されることで短期増強を誘導している可能性を検討した。ミト

コンドリアは細胞質より電位が百数十ミリボルト低く、ミトコンドリアへのカルシウム流入は電気化学的勾配を利用して受動的に起こると考えられている。流入経路に関しては、**mitochondrial Ca²⁺ uniporter** と呼ばれる、未だチャネルかキャリアかが不明の分子が考えられている。一方、カルシウムの放出に関しては、**mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger (mNCX)** によるナトリウム依存的な放出と、他の未知のキャリアによるナトリウム非依存的な放出、及び **permeability transition** というこれらとは異なる現象によると考えられている。我々は、コンディショニング刺激後には、シナプス前終末内のカルシウム濃度だけでなくナトリウム濃度も高まっていることを考慮に入れ、mNCX の inhibitor である **tetraphenylphosphonium (TPP⁺)** を用いて実験を行った。1 μ M の TPP⁺ を投与しても EPSP のベースラインは影響を受けなかった。一方、同じ濃度の TPP⁺ の投与によって、PTP 及び低頻度刺激後の短期増強が有意に減少した。これらの結果から、高頻度刺激後および低頻度刺激後のいずれの短期増強においてもミトコンドリアからのカルシウム放出が関与している可能性が示唆された。ミトコンドリアからのカルシウム排出のほかの経路である **permeability transition** に関わる分子の CA3 特異的ノックアウトマウスの解析では、PTP や 5Hz 3min 刺激後の可塑性に顕著な影響が見られなかったことから、短期可塑性に関与するのは mNCX からの放出に比較的限られるのかもしれない。

なお、当研究室でのタイプ 3 のリアノジン受容体のノックアウトマウスの実験結果や **Thapsigargin (3 μ M)** の投与で CA3-CA1 シナプスでの高頻度及び低頻度刺激後の短期可塑性に顕著な影響を与えなかったことなどから、小胞体からのカルシウム放出の影響は小さいと考えられるが、更なる検討が必要である。

以上の結果から、CA3-CA1 シナプスにおける短期増強において、PPR の解析から、高頻度刺激と低頻度刺激で共通した現象が起こっている可能性が示唆され、それがコンディショニング刺激によってミトコンドリアにカルシウムが蓄積し、刺激後に放出されることで増強を引き起こす現象である可能性を示唆する結果が得られた。

今回の我々の研究では、CA3-CA1 シナプスの短期可塑性にミトコンドリアが関与していることが示唆されたことに加え、異なった刺激時に起こる短期増強の比較から CA3-CA1 シナプスの短期可塑性のメカニズムに関して、これまでよりかなり踏み込んだ考察を加えることができたのではないかと考えている。