

審査の結果の要旨

氏名 葉山 達也

本研究は記憶や学習などの高次脳機能において重要な役割を担っていると考えられる競合的シナプス可塑性の機構を明らかにするため、ラット海馬 CA1 錐体細胞においてケイジドグルタミン酸とケイジド GABA の 2 色光刺激法を用いて、スパインの収縮及び局所競合の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ラット海馬スライス培養系において、ケイジドグルタミン酸とケイジド GABA の 2 色光刺激法を用いることで、単一スパインレベルでのスパイン収縮誘発法を確立した。また、ケイジド GABA 刺激は、GABA_A 受容体の作動薬である muscimol によって代替出来ることが示された。この時、スパイン増大は刺激スパインに限局するのに対し、スパイン収縮は周囲のスパインに拡散することが示された。また、スパイン収縮はグルタミン酸感受性の減少(長期抑圧)とともに起きていることが示された。

2. 長期増強刺激と長期抑圧刺激を隣り合ったスパインに対して行ったところ、長期抑圧刺激を行ったスパイン及びその周囲のスパインは収縮するのに対し、長期増強刺激を行ったスパインは増大することが示された。つまり、スパイン増大はスパイン収縮と競合することが示された。この時、p-cofilin peptide を用いて cofilin の脱リン酸化を抑制すると、スパイン収縮が阻害された。反対に、cofilin peptide を用いて cofilin のリン酸化を抑制すると、スパイン増大が阻害された。このことより、スパインの増大・収縮は、cofilin のリン酸化・脱リン酸化によって制御されていることが示された。

3. Photoactivatable GFP を結合した cofilin1 タンパク質を発現させて、cofilin タンパク質の細胞内動態の解析を行った。その結果、cofilin は数分以内に光活性化を行ったスパイン内から周囲のスパインに拡散していくことが示された。また、パッチクランプ電極からヒト cofilin1 タンパク質を細胞体に注入することで、スパインの収縮及び PSD95 の減少が起こることが示された。これらの結果より、cofilin は拡散性のスパイン収縮因子であることが示された。

4. Photoactivatable GFP-cofilin 発現細胞に対して、photoactivatable GFP の光活性化と同時にケイジドグルタミン酸による長期増強刺激を行い、スパイン増大時における cofilin 動態の観察を試みた。その際、野生型の cofilin の他に、脱リン酸化型を模倣した変異体である cofilin (S3A)とリン酸化型を模倣した変異体である cofilin (S3E)のそれぞれを用いて、リン酸化状態における cofilin 動態の差異を解析した。その結果、スパイン増大時にはリン酸化 cofilin が生成され、増大したスパインに集積することが示された。

以上、本論文はラット海馬 CA1 錐体細胞において、単一スパインレベルでのスパイン収縮誘発法の確立に成功し、スパイン収縮及び増大機構の解析から、樹状突起局所での競合的シナプス可塑性機構の存在を明らかにした。本研究はこれまで未知であった、脳内における競合的なシナプスの除去及び維持の機構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。