

審査の結果の要旨

氏名 石井 雄一郎

本研究は、グルタミン酸性シナプス伝達効率の長期増強 (LTP) における AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス輸送のメカニズムを明らかにするため、初代培養海馬神経細胞に AMPAR サブユニットを過剰発現させて部位特異的に蛍光標識する系にて、AMPAR のシナプス膜における動態を解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. 酵素タグである SNAP タグを AMPA 受容体サブユニットの N 末端細胞外領域に挿入した SNAP-GluA1 および SNAP-GluA2 を作製し、細胞膜非透過性 SNAP 基質によって膜特異的に蛍光標識できることが示された。また初代培養海馬神経細胞に過剰発現させると、内在性 GluA1 よりも細胞膜上の GluA1 総量が 1.9 倍程度増加するが、ポストおよびプレシナプスマーカー PSD-95、VGluT1 との免疫染色によってシナプス局在することが示された。
2. 初代培養海馬神経細胞に  $Ca^{2+}$  センサーとして Fluo4-AM または GCaMP4.1 を導入し、細胞外フィールド電極を用いて高頻度刺激 (2 sec, 50 Hz) を行うことによって、樹状突起、スパインおよび細胞体における  $Ca^{2+}$  上昇が誘導され、またこの過程が NMDAR を必要とすることが示された。また高頻度刺激は樹状突起スパイン構造の容積増大を引き起こし、一部のスパインでは容積増大が 20 分以上持続することが示された。
3. 膜特異的に蛍光標識した SNAP-GluA1 について、高頻度刺激依存的な膜上での動態を解析したところ、刺激から 1-2 分以内にスパイン容積の増大とともに速やかに SNAP-GluA1 が増大し、数分後、容積の減少とともに SNAP-GluA1 も減少することを示した。また一部のスパインでは容積と SNAP-GluA1 の減少が異なる kinetics で起こり、これらのスパインでは刺激前に比べて容積と SNAP-GluA1 が増加することが示された。さらにトリパンプルーを用いた表面消光実験から、増大した SNAP-GluA1 が膜上に局在していることが示された。またこの過程が NMDAR を必

要とすることが示された。同様にして膜局在 EGFP (gapEGFP) を用いてスパイン表面積の増加と SNAP-GluA1 の増加について相関を解析したところ、高頻度刺激直後の表面積と SNAP-GluA1 の増減は、ほぼ同様の kinetics で起こることが示された。

4. 新規合成 SNAP 基質を用いたパルスチェイス解析により、初代培養海馬神経細胞に過剰発現した SNAP-GluA2 について、刺激のない状態で 240 分間に細胞内から細胞膜上へ新たに輸送された SNAP-GluA2 の総和を可視化できることが示された。

以上、本論文は初代培養海馬神経細胞において、膜特異的に AMPAR サブユニットを蛍光標識することによって、LTP 様高頻度刺激時におけるスパイン構造の変化と GluA1 サブユニットの動態が異なる kinetics によって制御される可能性を示した。また新規蛍光基質を用いて、新規に膜挿入された AMPAR を可視化する手法を確立した。本研究は、これまで十分に解明されていない、スパイン構造の変化に対する膜上の AMPA 受容体動態の制御機構および AMPA 受容体の主要なシナプス輸送経路の解明に重要な貢献を果たすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。