

博士学位論文審査要旨

2017年1月18日

論文題目: **Influence of vesicular glutamate leakage on synaptic transmission at the mammalian presynaptic terminal** (シナプス伝達に対するシナプス小胞グルタミン酸漏洩の影響)

学位申請者: 高見 千尋

審査委員:

主査: 同志社大学大学院脳科学研究科 教授 坂場 武史

副査: 同志社大学大学院脳科学研究科 教授 御園生 裕明

副査: 同志社大学大学院脳科学研究科 教授 元山 純

要旨:

シナプス伝達は、シナプス前終末におけるシナプス小胞の開口放出とそれに伴う神経伝達物質放出、伝達物質のシナプス後部への作用によっておこる。シナプス小胞への伝達物質の充填はシナプス伝達において重要な役割をもつが、その分子細胞メカニズムは未解明のままである。また、充填された伝達物質が小胞から能動的あるいは受動的に漏れるかどうかは、小胞内の伝達物質濃度がシナプス伝達強度を規定する可能性という観点から機能的に興味深い問題である。

学位申請者は上記の点を明らかにするために、げっ歯類脳幹聴覚伝導路にある calyx of Held シナプスを標本とした実験をおこなった。この標本は大型シナプス前終末がシナプス後部の細胞体に直接シナプスを形成しており、シナプス前後部から同時記録をおこない、シナプス前部の分子細胞機構を直接解析できる利点がある。同時記録は技術的に難度が高く、世界的にも多くの研究室ができるようなものではない。申請者はこの技術を駆使して解析をしており、生理学的技術に卓越したものであると評価できる。申請者は記録電極を介してシナプス前終末の伝達物質グルタミン酸濃度を操作し、細胞質内の濃度を 0 状態にした。つまり、細胞質内から小胞へのグルタミン酸取り込みがおこらない実験的条件下で、小胞からの伝達物質の漏れが観察されるかを調べた。活動電位で惹起されるシナプス応答と 1 個のシナプス小胞が自発的に開口放出したときのシナプス応答の双方を注意深く観察し、ここからグルタミン酸の漏れが仮にあったとしてもおそらくは非常に少ないという結論を得た。また、グルタミン酸濃度を 0 にする以外のグルタミン酸取り込みを阻害する実験からも同様の結論が得られた。加えて、ノイズ解析をシナプス応答に適用することで、結論の妥当性に関して、多角的な検討を加えた。これらの研究の一部は英国生理学会の発行する生理学の国際雑誌である *Journal of Physiology* に 2016 年に受理され、online で掲載された。

以上、本論文は高度な生理学技術を駆使して、シナプス伝達を支える分子細胞メカニズムの一端を明らかにしたものである。よって、本論文は博士（理学）（同志社大学）の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2017年1月18日

論文題目： Influence of vesicular glutamate leakage on synaptic transmission at the mammalian presynaptic terminal (シナプス伝達に対するシナプス小胞グルタミン酸漏洩の影響)

学位申請者： 高見 千尋

審査委員：

主査： 同志社大学大学院脳科学研究科 教授 坂場 武史

副査： 同志社大学大学院脳科学研究科 教授 御園生 裕明

副査： 同志社大学大学院脳科学研究科 教授 元山 純

要 旨：

博士論文提出者は2012年4月に本学大学院脳科学研究科発達加齢脳専攻一貫制博士課程に入学し、現在在籍中である。この間、高橋智幸教授、高森茂雄教授のもとで、スライスパッチクランプ法の技術をはじめとする電気生理学な技法に習熟し、神経科学特にシナプス伝達に関する研究に従事してきた。本博士論文の内容の一部は2016年にJournal of Physiology 誌に筆頭著者として論文掲載された。

2017年1月18日午後1時より1時間半にわたり提出論文に関して審査会をおこない、提出者による英語によるプレゼンテーションと質疑応答をおこなった。プレゼンテーションでは研究の目的、方法、結果、考察が適切に述べられており、質疑応答からも提出者が研究内容への理解を有していると判断した。

その後、審査委員による論文内容および神経科学に関する非公開の口頭試問をおこなったが、本論文提出者は本学大学院博士課程修了に足りる学力と、国際的に活躍するに足る語学力(英語)を有していると判断した。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目: Influence of vesicular glutamate leakage on synaptic transmission at the mammalian presynaptic terminal

シナプス伝達に対するシナプス小胞グルタミン酸漏洩の影響

氏名: 高見 千尋

要旨:

中枢神経系における神経情報伝達はヒトの認知機能、運動制御、学習や記憶などのあらゆる脳機能を担っている。神経情報は神経細胞間に存在する化学シナプスを介して伝達される。シナプス前終末には神経伝達物質が充填されているシナプス小胞が存在し、シナプス小胞膜は前終末の細胞膜と膜融合して神経伝達物質をシナプス間隙に開口放出する。神経伝達物質を放出した空のシナプス小胞は開口放出後にシナプス前終末内へ回収され、神経伝達物質充填機構によって伝達物質が再充填されて次のシナプス伝達に備える。シナプス伝達効率はシナプス前終末から放出される神経伝達物質量やシナプス後膜の受容体量などによって変化して、神経情報伝達に影響を与える。従って、シナプス伝達効率を研究することは、神経情報に対する知見を深め、中枢神経系が担う脳機能を理解する上でも重要であると考えられる。

シナプス応答サイズは即時放出可能なシナプス小胞数(N)、シナプス小胞の放出確率(p)、単一シナプス小胞の応答サイズ(q)の積・ $N \times p \times q$ で表すことができ、この3つの因子の増減によってシナプス伝達効率変化を観察することができる。一般的に哺乳類の中枢神経系シナプスにおいて、 $N \times p$ は1回の活動電位に誘発されるシナプス小胞数で決定するのに対し、 q はシナプス小胞内神経伝達物質量ではなくシナプス後膜の受容体量によって決定すると考えられてきた。しかし近年、シナプス小胞内神経伝達物質量が変化する可能性が示唆されている。従って、シナプス小胞内神経伝達物質量の調節機構を解明することは、シナプス伝達効率に対して重要な知見を与えると推察される。

シナプス小胞内神経伝達物質量の調節に関する充填機構については、シナプス小胞膜上の神経伝達物質トランスポーターが液胞型プロトン(H^+)ATPase(V-ATPase)によって形成される H^+ の電気化学的勾配によって駆動されることが報告されている(Wolosker et al., 1996)。また、小胞型グルタミン酸トランスポーターを過剰発現させるとシナプス小胞内グルタミン酸充填量が増大することが報告されている(Wojcik et al., 2004)。シナプス小胞内神経伝達物質量の調節に関する漏洩機構については、シナプス小胞内外の H^+ 勾配を消失させると神経伝達物質であるグルタミン酸が漏洩することが報告されている(Burger et al., 1989)。また、海馬の培養神経細胞でV-ATPaseを薬理的に阻害すると、単一シナプス小胞の応答サイズとみなされている自発性微小興奮性シナプス後電流(miniature excitatory postsynaptic current; mEPSC)の振幅値が減少することが報告されている(Zhou et al., 2000)。これは、グルタミン酸がシナプス小胞から漏洩している可能性を示唆している。しかし一方で、海馬の培養神経細胞からなる autapses を用いてV-ATPaseを薬理的に阻害しても、mEPSC振幅値は変化しないという報告もされている(Ikeda and Bekkers, 2009)。このように、シナプス小胞における神経伝達物質漏洩機構は議論の余地が残っている。シナプス小胞内神経伝達物質量は充填と漏洩のバランスによって決定するため、神経伝達物質漏洩機構はシナプス伝達において重要な役割を果たすと仮説を立てた。

哺乳類脳幹に存在するグルタミン酸作動性シナプスの巨大シナプス前終末カリックスオブヘルドでは、細胞質内のグルタミン酸を除去すると誘発性EPSC振幅値が時間経過に伴い著しく減少するのに対して自発性mEPSC振幅値も減少するが、その割合は誘発性EPSCと比較

して小さいと報告されている(Ishikawa et al, 2002)。この研究結果は、シナプス小胞内グルタミン酸漏洩はシナプス伝達に影響しないことを示唆している。しかし、この実験系には background noise による自発性 mEPSC 振幅値の検出限界、シナプス小胞放出確率の低下などの懸念事項があり、シナプス小胞内グルタミン酸漏洩が正確に観察できない可能性が生じる。そこで、本博士学位研究ではカリックスオブヘルドを標本として上記の懸念事項を詳細に検証し、シナプス伝達に対するシナプス小胞内グルタミン酸漏洩の影響を明らかにすることを目的とした。

本研究ではシナプス小胞内グルタミン酸漏洩を確実に観察するために、カリックスオブヘルド内のグルタミン酸除去操作、及び V-ATPase 阻害剤であるバフィロマイシン A1 投与の 2 つの手法を用いてシナプス小胞内グルタミン酸の充填を阻害した。先行研究(Ishikawa et al, 2002)では、0.1Hz の刺激頻度で誘発性 EPSC を記録していた。そこで、刺激頻度を減らし、10 分毎に誘発性 EPSC 及び自発性 mEPSC を記録した。その結果、誘発性 EPSC 振幅値および自発性 mEPSC 頻度は時間経過に伴って著しく減少した。一方、mEPSC 振幅値は減少するものの、時間経過に伴い減少が止まる傾向にあった。この結果は、グルタミン酸充填阻害時においてシナプス小胞はグルタミン酸を完全に漏洩せず、一定量を維持していることを示唆している。

次に、シナプス後側のイオンチャネル型グルタミン酸受容体の 1 種である α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸(AMPA)受容体を 6 シアノ 7 ニトロキノキサリンジオン(CNQX)で段階的に遮断して自発性 mEPSC 振幅値を測定し、振幅値の検出限界を推定した。この結果から、シナプス小胞内グルタミン酸の充填阻害時における mEPSC 振幅値は検出限界のはるか上にとどまっていることが明らかになった。この結果は、グルタミン酸充填阻害時でもシナプス小胞はグルタミン酸を一定量維持していることを裏付けている。

さらに、膜容量測定実験を行い、シナプス小胞の開口放出(エキソサイトーシス)及びシナプス小胞の回収(エンドサイトーシス)が細胞質内グルタミン酸の有無によって変化するか否かを検証した。この実験結果から、グルタミン酸除去はエキソサイトーシス及びエンドサイトーシスに影響しないことが示された。これは細胞質内グルタミン酸濃度およびシナプス小胞内グルタミン酸充填量はシナプス小胞の放出確率に影響しないことを示唆している。

近年、自発的に開口放出するシナプス小胞群と誘発的に開口放出するシナプス小胞群が分離していることを示唆する報告がされている(Chung et al., 2010)。そこで、誘発性 EPSC 振幅値に平均分散分析法を適用して誘発性シナプス応答を構成する単一シナプス小胞の応答サイズの推定を試みた。誘発性 EPSC 振幅値はシナプス前終末内グルタミン酸除去操作 20 分後、グルタミン酸存在下と比較すると著しく減少した。一方、シナプス前終末内のグルタミン酸有無において平均分散分析法によって求めた単一シナプス小胞の応答サイズに有意な差は見られなかった。この結果から、自発性 mEPSC 振幅値の実験結果と同様に、シナプス小胞内グルタミン酸充填阻害時において、誘発性 EPSC を構成するシナプス小胞はグルタミン酸を一定量維持していることが示唆される。

シナプス前終末内グルタミン酸除去操作 30 分間で蓄積される空のシナプス小胞数を概算すると、約 25,000 個であった。その概算数は電子顕微鏡を用いて既に報告されたカリックスオブヘルド内の放出可能なシナプス小胞数(de Lange et al., 2003)とほぼ一致する。従って、グルタミン酸除去操作時においてシナプス小胞内グルタミン酸充填量に対するグルタミン酸漏洩の影響は少なく、かつ、ほぼ全ての放出可能なシナプス小胞を枯渇したと考えられる。

以上の結果より、グルタミン酸はシナプス小胞から漏洩し得ると結論付けた。しかし、その漏洩程度は少なく、シナプス伝達に対する影響は少ないと考えられる。単離したシナプス小胞標本と異なり、生体内に存在するシナプス小胞には、小胞内にグルタミン酸を一定量維持するメカニズムが存在する可能性がある。