

博士学位論文審査要旨

2018年2月1日

論文題目：Distinct modes of endocytotic presynaptic membrane and protein retrieval at the calyx of Held terminal (カリックス型シナプス前終末におけるシナプス小胞膜および小胞タンパク質の取り込み機構の研究)

学位申請者： 岡本 悠志

審査委員：

主査： 同志社大学大学院 脳科学研究科 教授 高森 茂雄

副査： 同志社大学大学院 脳科学研究科 教授 貫名 信行

副査： 同志社大学大学院 脳科学研究科 教授 御園生 裕明

要 旨：

神経間のシグナル伝達は、シナプス前終末からの神経伝達物質の放出によって喚起される。活動電位がシナプス前終末に到達すると、神経伝達物質を含むシナプス小胞膜が形質膜に融合し、伝達物質が隣接した細胞に向けて放出される。その後、シナプス小胞を構成する膜タンパク質や脂質はエンドサイトーシスで回収され、神経伝達物質が再充填されることで、再利用される仕組みになっている。従来、神経活動依存的なシナプス小胞エンドサイトーシスの過程は、脂質膜の回収を電気生理学的な膜容量測定の変化として検出する方法と、pH 感受性蛍光プローブを用いて膜タンパク質の回収過程を検出する方法を用いて研究されてきたが、これらを同時に測定した事例がないため、シナプス小胞膜とシナプス小胞タンパク質の回収が同時に起こるのか、あるいは別々の制御機構が存在するのかについては全く知られていなかった。

そこで岡本氏は、巨大シナプスであるカリックス型シナプス前終末を標本とし、膜容量と小胞タンパク質イメージングの同時測定を可能にする新たな実験系を確立した。本標本での膜容量測定法は既に確立された方法であるが、岡本氏はシナプス小胞タンパク質の一つである Synaptotagmin 2 (Syt2) の小胞内腔部位を認識する抗体に pH 感受性蛍光物質 CypHer5E を結合させたものをプローブとして用いることで、本標本においてシナプス膜とシナプス小胞タンパク質の動態を同時に測定することに成功した。この実験系を用いて、(1) カリックス型シナプスでは刺激強度によって速いエンドサイトーシスと遅いエンドサイトーシスが起るが、いずれの場合でも膜と Syt2 は同時に回収されること、(2) 膜容量測定とタンパク質イメージングによるエンドサイトーシスの時間経過の違いは、速いエンドサイトーシスで回収された大型の小胞の再酸性化が遅いことが原因であること、などを明らかにした。更に、シナプス小胞膜と Syt2 の回収が異なる機構で制御されている可能性を探索した結果、カルモジュリンという酵素の活性が Syt2 の回収効率を制御していることや、その下流でシナプスタンパク質である munc13-1 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

岡本氏が本学位論文で明らかにしたシナプス小胞膜とシナプス小胞タンパク質の異なる回収機構の存在は、世界でも先端的な研究成果であり、2016年に生命科学分野で有力な国際誌である *Elife* 誌に筆頭著者として発表された。

以上、本学位論文は、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

2018年2月1日

論文題目：Distinct modes of endocytotic presynaptic membrane and protein retrieval at the calyx of Held terminal (カリックス型シナプス前終末におけるシナプス小胞膜および小胞タンパク質の取り込み機構の研究)

学位申請者： 岡本 悠志

審査委員：

主査： 同志社大学大学院 脳科学研究科 教授 高森 茂雄

副査： 同志社大学大学院 脳科学研究科 教授 貫名 信行

副査： 同志社大学大学院 脳科学研究科 教授 御園生 裕明

要 旨：

博士論文提出者は、2013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。主に、脳幹部スライス標本を用いた電気生理学的測定と蛍光イメージングの技術を高いレベルで習得し、シナプス小胞のエンドサイトーシスにおける膜の回収機構と小胞タンパク質の回収機構についての研究を通じて、シナプスの生理学に関する知識の習得と研究活動に研鑽した。本博士論文の骨子となる研究内容は、2016年5月に生命科学系国際誌 *Elife* に筆頭著者論文として、発表された。

2018年1月17日午後3時より約1時間にわたり提出論文に関する審査会を行い、提出者による英語でのプレゼンテーションと質疑応答を行った。プレゼンテーションでは、研究の背景、目的、方法、結果、結論、考察が過不足なく適切に述べられ、質疑応答に関しても提出者の説明により十分な理解が得られたと評価できる。

更に、審査会終了後、審査委員により論文内容ならびに関連する脳科学分野の諸問題について非公開の口頭諮問を実施した結果、本論文提出者は研究者として十分な学力と、国際的に活躍するために語学力（英語）を有していることが認められた。

なお、本論文提出者は、在学中に日本学術振興会特別研究員(DC2)に採用されており（2017年度～2018年度）、今後の研究者としての活躍が十分期待できる。

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：Distinct modes of endocytotic presynaptic membrane and protein retrieval at the calyx of Held terminal (カリックス型シナプス前終末におけるシナプス小胞膜および小胞タンパク質の取り込み機構の研究)

氏名：岡本 悠志

要旨：

神経細胞間の接合部位である化学シナプスにおいて、出力側であるシナプス前終末から神経伝達物質が放出され、それが入力側であるシナプス後細胞の受容体に作用することでシナプス伝達が起こる。神経伝達物質の放出は、活動電位に伴う電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介したシナプス前終末内への Ca^{2+} 流入によって誘発される。 Ca^{2+} 流入は、シナプス前終末内に存在するシナプス小胞の形質膜との膜融合を引き起こし、シナプス小胞内に蓄えられた神経伝達物質が細胞外へ開口放出される（エキソサイトーシス）。開口放出後、膜融合したシナプス小胞と同等の膜と小胞タンパク質がクラスリンやダイナミンによって細胞内へ取り込まれ（エンドサイトーシス）、小胞内再酸性化／神経伝達物質充填を経て、シナプス小胞として伝達物質放出に再利用される。この一連の過程はシナプス小胞サイクリングと呼ばれ、持続的なシナプス伝達の維持に必要不可欠であると考えられている。

シナプス小胞のエンドサイトーシス機構に関してはいくつか未解明の点が残されている。シナプス小胞の開口放出とエンドサイトーシスに伴うシナプス前終末の膜容量の増減（形質膜表面積の増減）を計測する膜容量測定法を用いると、刺激強度によって時間経過の異なるエンドサイトーシスが観察される。刺激が比較的弱い場合には時定数が数十秒程度の遅いエンドサイトーシスが起こるのに対して、強い刺激を与えると時定数が数秒程度の速いエンドサイトーシスが起こる。一方、pH 感受性蛍光タンパク質を用いた光学的手法でシナプス小胞タンパク質のエンドサイトーシスを測定すると、膜容量測定とは逆に刺激を強めるとエンドサイトーシスがより遅くなることが知られている。ここで、(疑問1) 両者の時間経過の違いはどのようにして起こるのか、言い換えれば両者は同じものを測定しているのか。(疑問2) シナプス小胞膜と小胞タンパク質は同時に取り込まれるのか、あるいは別々の制御機構が備わっているのか。本研究はこの2つの疑問を解くためにおこなった。

疑問1を解くためには、小胞膜と小胞タンパク質のエンドサイトーシスを同時測定できる標本および方法が必要である。このために、げっ歯類脳幹聴覚伝導路にあるグルタミン酸作動性大型シナプス前終末 calyx of Held (直径 10-20 ミクロン程度；以下 calyx シナプス) を標本とした。Calyx シナプスに直接パッチクランプ法をおこない、膜容量測定法を適用することで、シナプス小胞膜のエキソ-エンドサイトーシスを測定した。膜容量の増加はエキソサイトーシスを、膜容量の減少はエンドサイトーシスを反映する。シナプス小胞タンパク質のエンドサイトーシス測定には、小胞タンパク質の1つである synaptotagmin2 (Syt2) の小胞内腔部位を認識する抗体に pH 感受性蛍光物質 cypHer5E を結合させたもの (anti-Syt2-cypHer；以下 cypHer) を使用した。CypHer は酸性で蛍光を発して中性では消光する性質を持ち、シナプス小胞内は酸性で細胞外は中性であるため、エキソサイトーシスによって消光し、エンドサイトーシスと小胞の再酸性化によって蛍光が回復する。pH 感受性と Syt2 抗体を利用して、内在性 Syt2 のエキソ-エンドサイトーシスを測定した。しかし cypHer による測定は、エンドサイトーシスそのものだけではなく、エンドサイトーシスされた小胞の再酸性化を測定することに注意が必要である。

実験1: calyx シナプスにおいてシナプス小胞膜と Syt2 のエンドサイトーシスを同時測定した。