



博士(人間科学)学位論文 概要書

遺伝子組み換え技術を用いたシナプスにおける細胞内シグナリング機構に関する研究

2001年1月

早稲田大学大学院人間科学研究科

杉山 崇

指導教授 吉岡 亨

神経細胞とそのターゲット細胞とだけが形成できるシナプスの存在は神経組織における特徴的な構造である。シナプスは3つの共通した構造から成り立っており、第1は神経伝達物質を含んだシナプス小胞が存在する前シナプス、第2は伝達物質に対する受容体をもつ後シナプス、そして第3は前シナプスと後シナプスに挟まれた20nm程のシナプス間隙である。軸索を伝わってきた活動電位が神経終末まで達すると、前シナプスにおいてシナプス小胞と細胞膜の融合が起こり、神経伝達物質がシナプス間隙に放出される。伝達物質はシナプス間隙を拡散によって進み、後シナプス膜上に存在する受容体と結合してシグナルを後シナプスの細胞内に伝える。シナプスはほとんど全ての神経細胞に共通に存在し、一見単純な構造に思えるが、実はシナプスでの情報伝達は精密に制御されており、それによって脳の複雑な機能を担っていることが知られている。例えば、脳の高次機能とされる記憶・学習過程がシナプス伝達効率の長期増強(LTP)や長期抑制(LTD)、シナプス結合の数の変化などにより起こると考えられている。よって、シナプスでの情報伝達制御の分子機構を解明することは、脳の高次機能のメカニズムを明らかにしていく上で極めて重要なことである。

そこで本研究では遺伝子操作技術を用いてシナプスに特異的に局在している遺伝子を強制発現している細胞または欠如している動物を作製し、シナプスでの情報伝達機構について詳細な解析を行った。

第一編では前シナプスにおけるシナプス小胞数の制御機構について検討するため、シナプス小胞付随タンパクである synapsin II を強制発現した NG108-15 細胞におけるシナプス小胞のリサイクリングを解析した。これまで培養細胞を用いた研究では前シナプス機能である、刺激に応じた伝達物質の放出が観察されていなかったが、その理由として伝達物質を含むシナプス小胞の不足が考えられている。しかし、1991年に Han らによって synapsin II を強制発現した細胞では前シナプス様の構造である varicosity が増え、そこに含まれるシナプス小胞の数も増加すると報告された。そこで、本研究では前シナプス機能の解明のためこの細胞を作製し、刺激によるシナプス小胞のリサイクリングを蛍光色素である FM1-43 を用いて観察し、リサイクリングに伴う伝達物質の放出を測定した。synapsin II を発現した NG108-15 細胞では脱分極刺激後のシナプス小胞リサイクリングによる FM1-43 取り込み量が増え、特に varicosity での取り込みが顕著に増加していた。さらに、刺激により放出される伝達物質の量も増加していた。このことは synapsin II の発現により、開口放出が可能なシナプス小胞の数が増加され、伝達物質放出の場である前シナプス機能が強化された

ことを示唆しており、シナプス小胞数増加のメカニズムの1つが解明された。

第二編では後シナプスにおける代謝型グルタミン酸受容体のシグナリングカスケードの重要性を探った。そのため、遺伝子ターゲティング技術を用いてリン脂質加水分解酵素であるホスホリパーゼ C β 4(PLC β 4)を欠如したマウスを作製し、小脳での細胞内シグナリングおよび LTD、瞬目反射学習に及ぼす影響を調べた。哺乳類の PLC β には1型から4型までの4つのサブタイプが存在し、それぞれのサブタイプによって発現部位や発現量が異なっていることが知られている。野生型マウスの小脳プルキンエ細胞には β 1型、 β 4型が一様に発現していて、 β 3型は小脳の後側(第7-第10)小葉に発現している。PLC β 4欠損マウスの小脳では β 4型の発現は消失したが、 β 1型、 β 3型の発現パターンには変化がなかった。小脳での PLC β 4 を介する経路は、1型の代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)-Gq タンパク質-PLC β 3/4 と考えられており、プルキンエ細胞での LTD 形成にも関与している。遺伝子欠損マウスでのカルシウムイメージングでは mGluR1 アゴニスト刺激において前側(第1-第6)小葉でのカルシウム上昇が全く見られなくなったのに対して、後側(第7-第10)小葉ではカルシウム上昇が観察された。これは β 3型の発現パターンと一致しており、前側の小葉では β 1型の存在下でもカルシウムシグナリングは観察されなかった。このことは受容体-エフェクター間の機能的カップリングの不在を示唆している。PLC β 4 の欠損によって小脳前側小葉では LTD が起こらなくなったのに対して、後側小葉では PLC β 3 がなお存在するため LTD 形成が観察された。さらには第6小葉が深く関与していると考えられている、瞬目反射条件付けも大きく抑制された。これまでに、小脳小葉の破壊実験によって瞬目反射条件付けは大きく抑制されるという報告はいくつかなされてきたが、この実験法では小脳の構造そのものを破壊してしまっていたために部位特異的な原因がわからなかった。しかし本研究の結果、小脳第6小葉の mGluR1 シグナリングカスケードにおいて PLC β 4 以降が働かないために LTD も形成されず、瞬目反射条件付けも充分に行われなことが明らかとなった。さらに、このシグナリングカスケードに関与する PKC の分子種は、その局在および遺伝子欠損マウスの研究により PKC α だと判明した。したがって、小脳における LTD の形成と、それに引き続く瞬目反射条件付けの形成には mGluR1-Gq α -PLC β 4-PKC α のシグナリングカスケードが重要な働きをしていることが明らかにされた。