

氏 名 田 中 淳 一

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第783号

学位授与の日付 平成16年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 The Number and Density of AMPA Receptors
in Single Synapses:Combination of
Electrophysiological and Morphological
Studies in Immature Rat Cerebellum

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 河西 春郎
教授 井本 敬二
教授 重本 隆一
教授 渡辺 雅彦（北海道大学）

論文内容の要旨

中枢神経系において、シナプス後部に発現する受容体数の制御は、神経伝達効率を決定する重要な因子の一つとされ、シナプス可塑性や入力部位特異的な空間的 scaling に重要な役割を果たしていることが明らかとなりつつある。包埋後免疫金標識法を用いた研究により、シナプスサイズに依存した受容体数の発現調節が示唆されているが、機能的な受容体数とシナプスサイズとの直接的な関係は、単一シナプスレベルで明らかにされていない。

彼は、中枢神経系の重要な情報伝達を担う AMPA 受容体の数とシナプスサイズとの関係を単一シナプスレベルで明らかにするため、興奮性入力として登上線維のみの支配をうけ、かつ、電気的にも形態学的にもコンパクトであるという利点をもつ生後 3-4 日齢ラット小脳プルキンエ細胞を解析対象として選んだ。彼は、まず、プルキンエ細胞の樹状突起におけるシナプスの分布を電子顕微鏡下に調べ、おおよその分布を把握し、十分に単離されたシナプスが樹状突起全長の 50%付近に存在する頻度が高いことを明らかにした。さらに、2 光子励起法による caged-glutamate の活性化と細胞体からの whole-cell 記録を組み合わせ、樹上突起上でグルタミン酸感受性マッピングを行い、グルタミン酸感受性の高い領域 'hotspot' に発現する機能的 AMPA 受容体の性質を調べた。さらに、彼は、電気生理学的実験を行った同一細胞およびシナプスを電子顕微鏡下に容易に同定する方法として、2 光子励起法を利用した photoconversion 法を自ら確立し、その方法を用いて、各 hotspot の形態学的性質を電子顕微鏡下に観察、解析することに成功した。その結果、彼は、世界で初めて単一シナプスにおける機能的 AMPA 受容体数とシナプスサイズとの間の高い相関を明らかにし、機能的 AMPA 受容体密度として、1150 - 1410 受容体/ μm^2 を算出した。また、hotspot が形態学的に定義されるシナプスに相当するが、光学顕微鏡の解像度の限界から、一つの hotspot が必ずしも一つのシナプスに相当しないことも明らかにした。

さらに、彼は、電気生理学的実験で得られた AMPA 受容体数とシナプスサイズとの関係を別の方法で検証、支持するため、SDS-FRL 法を無固定小脳スライス標本に適用し、すべての AMPA 受容体サブユニット (GluR1-4) を認識する抗体で染色した。レプリカ上に観察される膜内粒子の凝集 (IMP cluster) を興奮性シナプスの指標とし、IMP cluster 上のラベリング数も、IMP cluster サイズとの間に高い相関を示すことを明らかにした。一方、シナプス外領域における AMPA 受容体ラベリング密度が、シナプス領域と比較して著しく低いことに着目し、2 光子励起法 caged-glutamate の活性化により生じる反応が、シナプスに存在する AMPA 受容体の活性化によると推論した。さらに、彼は、シナプス領域とシナプス外領域における AMPA 受容体のラベリング密度の比率を用いて、電気生理学的実験で推定された機能的 AMPA 受容体密度の誤差を補正し、単一シナプスにおける機能的 AMPA 受容体密度が、1060 - 1300 受容体/ μm^2 と推定した。

本研究は、中枢神経系情報伝達の間であるシナプスにおいて、機能的 AMPA 受容体数、AMPA 受容体ラベリング数が、シナプスサイズに直接相関することを世界で初めて実証したものである。特に、本研究の着目すべき点は、これまで中枢神経系シナプス伝達メカニズムの解明に用いられてきた複数の方法論を組み合わせると共に、方法論のギャップを埋め、困難とされてきた非常に微細な中枢神経系シナプスを単一シナプスレベルで解析することに成功した点にある。

論文の審査結果の要旨

中枢神経系において、シナプス後部に発現する受容体数の制御は、神経伝達効率を決定する重要な因子の一つとされ、シナプス可塑性や入力部位特異的な空間的 scaling に重要な役割を果たしていることが明らかとなりつつある。包埋後免疫金標識法を用いた研究により、シナプスサイズに依存した受容体数の発現調節が示唆されているが、機能的受容体数とシナプスサイズとの直接的な関係は、単一シナプスレベルで明らかにされていない。

申請者は、中枢神経系の重要な情報伝達を担う AMPA 受容体の数とシナプスサイズとの関係を単一シナプスレベルで明らかにするため、電気的にも形態学的にも利点をもつ生後3-4日齢小脳プルキンエ細胞を対象として選んだ。申請者は、まず、樹状突起におけるシナプスの分布を電子顕微鏡下に調べ、おおよその分布を把握し、十分に単離されたシナプスが樹状突起全長の50%付近に存在する頻度が高いことを明らかにした。さらに、2光子励起法による caged-glutamate の活性化と細胞体からの whole-cell 記録を組み合わせ、樹上突起状でグルタミン酸感受性マッピング隣接シナプスを行い、グルタミン酸感受性の高い領域 'hotspot' の形態学的性質および各 hotspot に発現する機能的 AMPA 受容体の性質を調べた。

申請者は、電気生理学的実験を行った同一細胞およびシナプスを電子顕微鏡下に容易に同定する方法を自ら確立し、その方法を用いて、単一シナプスにおける機能的 AMPA 受容体密度 (1150 - 1410 受容体/ μm^2) を算出することに成功した。また、hotspot が形態学的に定義されるシナプスであるが、一つの hotspot がかならずしも一つのシナプスに相当しないことも明らかにした。

さらに、申請者は、電気生理学的実験で得られた AMPA 受容体数とシナプスサイズとの関係を別の方法で検証、支持するため、SDS-FRL 法を無固定小脳スライス標本に適用し、すべての AMPA 受容体サブユニット (GluR1-4) を認識する抗体で染色した。レプリカ上に観察される膜内粒子の凝集 (IMP cluster) を興奮性シナプスの指標とし、IMP cluster 上のラベリング数が、IMP cluster サイズと高い相関を示すことを明らかにした。一方、シナプス外領域における AMPA 受容体ラベリング密度が、シナプス領域と比較して、著しく低いことに着目し、2光子励起法 caged-glutamate の活性化により生じる反応が、シナプスに存在する AMPA 受容体の活性化によると推論した。また、申請者は、シナプス領域とシナプス外領域における AMPA 受容体のラベリング密度の比率を用いて電気生理学的実験で得られた密度を補正し、単一シナプスにおける AMPA 受容体密度は、1070 - 1310 受容体/ μm^2 と推定した。

本研究は、中枢神経系シナプス伝達の場合であるシナプスにおいて、機能的 AMPA 受容体数および AMPA 受容体ラベリング数が、シナプスサイズに直接相関することを世界で初めて実証したものであり、申請者の研究成果の学問的意義は極めて高いと考えられた。これらのことから、学位審査会は、全員一致で本論分が学位論文として相応しいものであると判定した。

審査委員会において発表を行い、委員からのさまざまな質問に適切に答えたので、専門及び周辺分野の基礎知識や理解については、博士号取得に十分と判断した。

英語の実力は、田中君が書いた英文の学位論文を審査委員全員で見て、十分と判断した。