

氏 名 萩原 明

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第 816 号

学位授与の日付 平成 1 6 年 9 月 3 0 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 6 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 Differential Distribution of Release-related Proteins in  
the CA3 Area as Revealed by Freeze-fracture Replica  
Labeling

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 井本 敬二  
教授 河西 春郎  
教授 藤本 豊士（名古屋大学）

## 論文内容の要旨

Synaptic vesicle release occurs at a specialized membrane area known as presynaptic active zone (AZ). Several membrane proteins are involved in the vesicle release processes such as docking, priming, and exocytotic fusion. Cytomatrix at the active zone (CAZ) proteins, CAZ-associated-structural-protein (CAST) and Bassoon are structural components of AZ involved in the priming process and localized to AZ. However, distribution of t-SNARE proteins, syntaxin and SNAP-25 which have a crucial role for exocytotic fusion has not been well demonstrated in AZ with the conventional pre-embedding immunogold electron microscopy. This is possibly due to limited accessibility of antibodies to the dense matrix of protein complexes in AZ with the pre-embedding immunogold method. In the present study, she used SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL) to show two-dimensional distribution of these release-related proteins in the CA3 area of the rat hippocampus. This method has a potential to unmask immunoreactivity in dense matrix of proteins by dissolving tissue with strong detergents under various conditions.

Immunolabeling for CAST by pre-embedding electron microscopy was intensely observed in AZ compared to that in extrasynaptic membrane surrounding AZ (SZ) in associational/commissural (A/C) fiber and mossy fiber (MF) terminals in the CA3 area. Consistent with this finding, SDS-FRL revealed clusters of immunogold particles for CAST as well as for Bassoon on P-face of these presynaptic terminals. Opposing face (E-face) of the CAST-labeled P-face always had postsynaptic density underneath as revealed by reconstruction of semi-thin sections from the replicated tissue, confirming that the CAST-labeled area on P-face is AZ. Immunolabeling for t-SNARE proteins, syntaxin and SNAP-25 was diffusely distributed on P-face of presynaptic terminals and axons. Co-labeling with CAST revealed distribution of the t-SNARE proteins in AZ as well as in SZ. Quantitative analysis demonstrated that density of immunoparticles for CAST in AZ was much higher than that in SZ ( $127.4 \pm 7.6$  vs.  $0.4 \pm 0.1$  in A/C,  $107.2 \pm 12.0$  vs.  $1.1 \pm 0.1$  in MF; particles /  $\square\text{m}^2$ ,  $n = 3$  animals, mean  $\pm$  SE), while that for syntaxin and SNAP-25 was similar in AZ and SZ (for syntaxin,  $80.8 \pm 6.3$  vs.  $74.5 \pm 13.6$  in A/C,  $138.6 \pm 11.6$  vs.  $117.5 \pm 14.4$  in MF, for SNAP-25,  $92.5 \pm 13.5$  vs.  $102.7 \pm 11.9$  in A/C,  $126.8 \pm 8.3$  vs.  $96.7 \pm 7.4$  in MF; particles /  $\square\text{m}^2$ ,  $n = 4$  animals, mean  $\pm$  SE). These results suggest that CAZ but not t-SNARE proteins may be involved in specialization of the membrane domain for AZ and accumulation of synaptic vesicles.

## 論文審査結果の要旨

神経細胞のシナプス前終末で、シナプス小胞の神経伝達物質を放出する特異的膜領域はアクティブゾーン(AZ)と呼ばれる。AZとその周辺には、AZの細胞質基質を形成しシナプス小胞のプライミングへの関与が示唆されている CAZ タンパクや、シナプス小胞上タンパク質と結合しシナプス小胞の融合を誘導する t-SNARE タンパク等が知られているが、これらの AZ における局在は電子顕微鏡レベルではまだ十分に明らかにされていない。

申請者は、海馬 CA3 領域を観察対象とし、凍結切断レプリカ免疫標識法(SDS-digested freeze-fracture replica labeling, SDS-FRL 法)の最適化を行うとともに、グリッドマッピング法を巧みに用いて海馬の領域を特定して観察する方法を確立した。

CAZ タンパクの一つである CAST は、AZ に集積していることが既に知られていたが、申請者は SDS-FRL 法を用いて、CAST が前終末レプリカ膜上でクラスターを形成していること、このクラスターに対応するシナプス後膜に postsynaptic density が必ず観察されることから、CAST が AZ に特異的に存在する事を証明した。さらに t-SNARE タンパクである syntaxin および SNAP25 の局在を SDS-FRL 法で観察した。これらのタンパクは、従来の報告では AZ では検出されていない。SDS-FRL 法では、従来の報告と同様に前終末の膜上に広く標識が見られたが、AZ の分子マーカーである CAST との共標識によって AZ にも存在する事が示された。CAST および syntaxin、SNAP-25 の標識密度を定量的に解析したところ、CAST の AZ での密度は AZ 周辺領域より 100 倍以上高いのに対し、syntaxin と SNAP-25 の AZ での密度は AZ 周辺領域ほぼ同じレベルであり、t-SNARE タンパクはシナプス前終末の膜全体に一様に分布している事が定量的に示された。この結果は、t-SNARE タンパクよりむしろ CAST の方が AZ という特化した領域の形成に関与している事を示唆している。

本研究は放出関連たんぱく質の分布解析を行う際に、CAST が AZ の分子マーカーとして有用であることを示し、また t-SNARE タンパクが AZ に存在する事を初めて定量的に明らかにした。申請者の研究成果は、AZ 形成や AZ における放出過程のメカニズム解明に、今後大きく寄与する研究成果である。よって審査委員会は全員一致で本研究を博士論文として十分に価値のあるものであると判定した。

続いて試験を行った。学問的背景や実験的手法の詳細などに関して口頭試問を行ったが、いずれに対する応答も満足すべきものであった。また本論文は明瞭な英語で書かれており、申請者の英語力も十分であると判定した。以上、総合的に判断し学位取得に足る水準に達しているものと判断した。