

氏 名 春日井 雄

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 963 号

学位授与の日付 平成 18 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 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Quantitative localization of GABAA receptor subunits
on hippocampal pyramidal cells by SDS-digested freeze
fracture replica labeling(SDS-FRL)

論文審査委員 主 査 教授 鍋倉 淳一
教授 重本 隆一
教授 川口 泰雄
教授 小坂 俊夫(九州大学)

論文内容の要旨

Quantitative localization of GABA_A receptor subunits on hippocampal pyramidal cells by SDS-digested freeze fracture replica labeling (SDS-FRL)

Pyramidal cells in the hippocampal CA1 area express at least 14 subunits of the GABA-A receptor, and receive GABAergic input from interneurons, which make synapses on the soma, dendrites and the axon initial segment (AIS). Here, they used the SDS-digested freeze-fracture replica labelling method to visualize the cell surface distribution of the alpha1, alpha2, and beta2/3 subunits quantitatively on distinct subcellular compartments of pyramidal cells. Immunogold particles for these subunits were accumulated over clusters of intramembrane particles (IMP) on the protoplasmic face (P-face) of the plasma membrane, indicating that many IMP clusters of a certain size represent GABAergic synapses.

The sizes of labelled synapses were not different on the somata and the main apical dendritic trunks. However, the synaptic areas on AISs were significantly smaller than those on the soma and apical dendrites. Axon initial segments were identified by immunogold labelling for the Nav1.6 subunit of sodium channels. The synaptic receptor labelling densities for GABA-A receptor subunits were not significantly different on the tested areas of the cells. A high proportion of receptor labelling was on the extrasynaptic membrane of the pyramidal cell soma and dendrites. To examine the co-localization of different GABA-A receptor subunits in single synapses on the soma, double labelling was performed with antibodies raised in different species. These experiments showed that the majority of synapses contains alpha1, alpha2, and beta2/3 subunits. Future experiments aim at testing whether distinct synapse populations differing in the relative proportions of different subunits can be detected with freeze fracture replica immunogold labelling.

論文の審査結果の要旨

SDS レプリカ免疫電子顕微鏡法を用いて、海馬錐体細胞の apical dendrite, soma および axo-initial segment(AIS)における GABA 作動性入力シナプス後部を同定し、シナプス領域およびシナプス外領域における GABAA 受容体サブユニットの分布/局在を検討した研究をまとめた論文である。海馬錐体細胞 2 重膜の細胞質側に観られる膜内粒子 (intramembrane particle) の密集している領域で GABAA 受容体サブユニットの標識が認められるものを GABA シナプス領域と位置付け、AIS におけるシナプス部位面積は、近位樹状突起および細胞体のものと比較し小さいことを見出ししている。また、細胞各部位におけるシナプス領域の $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 5$ および $\beta 2/3$ GABAA 受容体サブユニットの局在を金粒子を用いた免疫電顕で検討した結果、近位樹状突起および細胞体においては $\alpha 1, \alpha 2$ および $\beta 2/3$ 金粒子の数とシナプス領域面積は正の相関が観察された。シナプス外受容体と考えられていた $\alpha 5$ についてもシナプス領域に標識が集積していたが、 $\alpha 5$ 金粒子数とシナプス領域面積に相関はみられない。また $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 5$ および $\beta 2/3$ のおのこの標識密度を樹状突起、細胞体、AIS のシナプス領域で比較したところ有意な差は認められなかった。次に、シナプス外領域における各サブユニットの密度をシナプス領域と比較したところ、シナプス外領域には $\alpha 1, \alpha 2$ および $\beta 2/3$ 金粒子に関しては、シナプス領域の約 100 分の 1、 $\alpha 5$ に関しては 16 分の 1 の密度で存在していることが判明した。また、各種サブユニットの共存については、 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ サブユニットの共存率は非常に高く、各々は $\beta 2/3$ 陽性シナプス部位の約 8 割で観察された。また、 $\beta 2/3$ 陽性全シナプスには $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 5$ のいずれかが観察された結果から、約 20% のシナプスでは $\alpha 1, \alpha 2$ が存在せず $\alpha 5$ のみ存在する可能性が示唆された。

提出論文は英文で書かれており、研究の背景、研究の進め方、得られた結果、およびそれに基づいた考察に関して、十分検討されている。今後、技術的な改良等をくわえることによって、海馬ばかりでなく中枢神経系全般における抑制性回路の理解に大きく貢献することが期待できる。

これらのことから申請者の論文は学位論文として十分に相応しい内容であると結論した。