

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	船橋 潤一郎
論文題目	単一シナプス小胞の開口放出とシナプス小胞膜タンパク質動態の解析		
(論文内容の要旨)			
<p>シナプス伝達は、活動電位の発火により迅速に行われ、高頻度の活動電位にも対応する。そのために、タンパク質が密に集積したシナプス前部の細胞膜近傍領域であるアクティブゾーンには、シナプス小胞を効率的に開口放出して再構築する仕組みがあると考えられている。しかし、アクティブゾーンのどのような分子構築により迅速な開口放出が実現されているのか、また開口放出・小胞取り込み・機能的なシナプス小胞の再構築を制御する仕組みについては不明な点が多い。そこで私は、1つのシナプス小胞の開口放出を観察できる新しい実験手法を開発し、アクティブゾーン内部での開口放出の発生位置とシナプス小胞膜タンパク質である <i>synaptophysin</i> (Syp) の開口放出後の動態について調べ、上記の問題の解決に寄与することを目指した。</p> <p>アクティブゾーンでの膜タンパク質の動態を詳しく観察するために、まず、細胞間接着分子の1つであり、シナプス前部の形成を誘導することが知られている <i>neuroligin</i> でカバーガラスをコートした。そして、その上に海馬神経細胞を分散培養し、アクティブゾーン様構造 (<i>active-zone-like membrane</i>; AZLM) をガラス面の直上に、ガラス面と平行に形成させた。この AZLM を、ガラス面直上の蛍光分子を高いシグナルノイズ比で観察できる全反射蛍光顕微鏡を用いて観察した。そうしたところ、AZLM には <i>bassoon</i>、<i>piccolo</i>、<i>Munc13</i>、<i>RIM</i> といった主要なアクティブゾーンタンパク質が集積しており、電場刺激によって AZLM 内で細胞内 <math>Ca^{2+}</math> 濃度が上昇し、AZLM がアクティブゾーンの主要な特性を有することを確認できた。次に、Syp と GFP 改変型 pH 感受性緑色蛍光タンパク質である <i>super-ecliptic pHluorin</i> (SEP) を融合させた Syp-SEP を神経細胞に発現させた。この Syp-SEP は、開口放出によって小胞膜から細胞膜に移動する際に蛍光を発することから、開口放出のマーカーとして用いられてきた分子である。一回の電場刺激と同期してアクティブゾーン内で Syp-SEP の輝度が上昇したこと等から、1個のシナプス小胞の開口放出を記録できたと判断した。そして、この輝度上昇後、Syp-SEP は細胞膜上を拡散した。拡散係数は <math>0.17 - 0.19 \mu m^2/s</math> と推測され、<i>synaptophysin</i> は開口放出後にほぼ自由拡散すると考えられた。さらに、電場刺激の直後に起こる同期放出は、AZLM 内の複数の特定領域で起った。一方で、刺激から遅れて起きる非同期放出はより分散した部位で起きた。これらの結果は、同期放出に適した部位は <math>Ca^{2+}</math> チャネルに近く、非同期放出はそうした部位から離れた場所で起こったと考えることで説明できる。</p> <p>本研究では、ガラス面直上に作られた AZLM での分子動態を、高いシグナルノイズ比で観察する新しい手法を開発した。そして、開口放出後にシナプス小胞膜タンパク質が細胞膜上を拡散することと、同期放出と非同期放出の発生位置が異なることを明らかにした。</p>			

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

神経細胞間の情報伝達はシナプスを介して行われる。シナプスにおいては、前部からグルタミン酸等の伝達物質が放出され、それが後部の受容体に結合することで情報が伝わる。シナプス前部に活動電位が到達すると、それがCa<sup>2+</sup>チャネルを介したCa<sup>2+</sup>流入を引き起こす。シナプス前部には、高濃度の伝達物質を蓄積しているシナプス小胞が多数存在し、Ca<sup>2+</sup>がシナプス小胞上のシナプトタグミンというタンパク質に結合することにより、シナプス小胞がシナプス前部のアクティブゾーンの細胞膜と融合することによって、伝達物質の開口放出が起こる。この開口放出は通常、活動電位のシナプス前部への到達後1ミリ秒以内という短時間で起こる(同期放出)が、遅れて起こる非同期放出の存在も知られている。同期放出と非同期放出がどのような制御機構の違いによって生じるかについては、各々が同じ部位で起こるか否か等未解決な問題がある。また、伝達物質の放出は高頻度の活動電位発火にも対応して持続的に行われる。それを可能にするために、シナプス小胞の再構築システムが存在するが、開口放出後にシナプス小胞膜タンパク質がどのように回収されるかは明らかになっていない。この点について、小胞膜タンパク質はまとまった状態で細胞内にエンドサイトーシスされるという説と、一度細胞膜上で拡散した後で、シナプス小胞に再集合するしくみがあるという説がある。申請者は、こういったシナプス前部での伝達物質放出制御とシナプス小胞膜タンパク質の開口放出後の回収過程の解明に寄与することをめざした。そのために、アクティブゾーン様構造をガラス面上に形成させ、そこで蛍光標識したシナプス小胞膜タンパク質のシナプトフィジンの動態を、全反射蛍光顕微鏡を用いて高シグナル・ノイズ比と高時空間分解能で観察する新実験手法を開発した。そして、同期放出はいくつかの定まった領域で起こる傾向があるが、非同期放出は同期放出部位からは離れた場所で起こる傾向を示す事を報告した。また、開口放出後にシナプトフィジンは細胞膜上をかなり早く拡散することも明らかにした。

本研究により、シナプス前部で起こるシナプス小胞開口放出の制御とシナプス小胞の再構築過程を解析する上で有用な新実験手法が確立された。そして、シナプス小胞の開口放出について、同期放出と非同期放出部位の位置関係が明らかになった。また、シナプス小胞膜タンパク質は、開口放出後にアクティブゾーンの細胞膜上を拡散して広がることも示され、小胞膜タンパク質は拡散後に再集積されることが示唆された。これらの研究成果は、シナプス前部における伝達物質放出制御とシナプス小胞膜タンパク質のシナプス小胞への再集積過程解明に大きな寄与をする重要な成果と考えられ、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認められる。また、平成30年5月23日に、論文内容とそれに関連した口頭試問を行い、その結果合格と認めた。