

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	た な か ひ ろ み つ 田 中 洋 光
学 位 (専 攻 分 野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学 位 授 与 の 日 付	平 成 年 月 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
(学 位 論 文 題 目) シナプス長期増強に際しての AMPA 型グルタミン酸受容体の動態解析	
論 文 調 査 委 員	(主 査) 平 野 丈 夫 教 授 阿 形 清 和 教 授 七 田 芳 則 教 授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	田中 洋光
論文題目	シナプス長期増強に際しての AMPA 型グルタミン酸受容体の動態解析		
(論文内容の要旨)			
動物は経験に基づき脳の情報処理を変化させる。こうした変化の基礎機構として、海馬におけるシナプス長期増強現象 (LTP) 等のシナプス可塑性が知られている。LTP の発現機構として、シナプス後膜におけるグルタミン酸受容体数の増加が挙げられる。しかしながら、どのような型の受容体がいづどのように増加するのかは明らかでない。そこで本研究では、シナプス後膜における受容体の動態を直接可視化できる新しい実験系を構築し、LTP 発現に際して異なる型のグルタミン酸受容体が各々別経路で増加することを明らかにした。 本研究では、興奮性シナプス伝達を担う AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) に注目した。シナプス後膜内外での AMPA 受容体の動態を可視化するために、シナプス後膜の形成を誘導する Neurexin をガラス面にコートし、そのガラス面上に培養した海馬神経細胞にシナプス後膜様構造 (PSLM) を形成させる、という新手法を確立した。次に、AMPA 受容体のサブユニットである GluA1、GluA2、GluA3 各々に蛍光タンパク質を融合して標識し、海馬神経細胞で発現させた。そして、LTP 誘導刺激前後での PSLM 内外における各サブユニットの増減を、全反射顕微鏡を用いて観察した。全反射顕微鏡は、背景光を減らすことにより、ガラス面直上の蛍光のみを高 S/N 比で観察できる顕微鏡である。PSLM における GluA1-3 は、共に刺激 30 分後では蛍光輝度が増加したが、その時間経過は異なっていた。GluA1 の蛍光輝度は、刺激後 4 分以内に増加した。一方、GluA2 と GluA3 の蛍光輝度は、刺激 4 分後では減少し、その後増加に転じた。また、PSLM 外における GluA1 の蛍光輝度は、PSLM におけるほど増加しなかったのに対し、GluA2 と GluA3 の蛍光輝度は、PSLM 内と同様の増加を示した。次に、これらの増加がどのような経路によるかを明らかにするために、LTP 誘導刺激前後での GluA1-3 の動態変化を、画像取得後解析した。GluA1 では、刺激 0-1 分後に PSLM 周辺で起こるエキソサイトーシスの頻度が増加した。一方 GluA2 では、刺激 5-8 分後に PSLM 外で起こるエキソサイトーシス頻度が増加した。GluA3 では、刺激 24-25 分後に PSLM 外で起こるエキソサイトーシスの頻度が増加した。また、GluA1-3 の PSLM への側方移動も観察できた。以上の結果は、AMPA 受容体がどのサブユニットを含むかによって、刺激後の動態変化が異なることを示唆した。さらに、主要な AMPA 受容体である GluA1/GluA2 ヘテロ四量体と GluA2/GluA3 ヘテロ四量体の動態変化を調べるために、二種類の AMPA 受容体サブユニットを同時に発現させて、LTP 誘導刺激前後の各サブユニットのエキソサイトーシスを解析した。GluA1 と GluA2 を共発現した場合では、刺激直後の PSLM 周辺でのエキソサイトーシスは、GluA1 に限られていた。一方で、刺激約 5 分後に PSLM 外での GluA1 あるいは GluA2 のエキソサイトーシス頻度が増加した。また、GluA2 と GluA3 を共発現した場合では、刺激約 20 分後に PSLM 外で			

の GluA3 のエキソサイトーシスの頻度が増加した。これらの結果から、以下のように推定した。LTP 誘導直後には、GluA1 ホモ四量体の数がシナプス後膜周辺でのエキソサイトーシスにより増加する。そして LTP 誘導数分後に、GluA1/GluA2 ヘテロ四量体の数が、シナプス外でのエキソサイトーシスと側方移動の組み合わせにより増加し、LTP 誘導数十分後には、GluA2/GluA3 ヘテロ四量体の数が、シナプス外でのエキソサイトーシスと側方移動の組み合わせにより増加する。

(論文審査の結果の要旨)

動物の学習・記憶の基盤細胞メカニズムとして、神経活動依存性の伝達効率変化であるシナプス可塑性が知られている。シナプス可塑性の代表例として、海馬におけるシナプス長期増強現象 (LTP) が知られている。LTP の発現に際しては、シナプス後膜における AMPA 型グルタミン酸受容体数の増加が起こるが、その詳細は不明であった。複数種ある AMPA 受容体のうちどのタイプがいかなる経路でいつシナプス後膜において増加するかが明らかになっていなかった。

田中洋光は、この問題を解明するために、新しい実験手法を確立した、それは、シナプス後膜形成を誘導する Neurexin をガラス面にコートし、その上に海馬神経細胞を培養して、ガラス面上にシナプス後膜様構造 (PSLM) を形成させ、PSLM 内外での蛍光標識した AMPA 受容体の挙動を、高シグナル・ノイズ比の全反射蛍光顕微鏡を用いて調べるという方法である。AMPA 受容体のサブユニットである GluA1、GluA2、GluA3 各々に蛍光タンパク質を融合して標識し、海馬神経細胞で発現させ、LTP 誘導刺激前後での PSLM 内外における各サブユニットの増減を調べた。また、高時間分解能記録を行い、各サブユニットのエキソサイトーシスと膜上での側方移動の記録も行った。これらの実験により、サブユニット構成が異なる AMPA 受容体は、LTP 発現時に各々が別の経路でシナプス後膜に集積することが明らかになった。LTP 初期相では、GluA1 ホモ四量体がシナプス後膜周辺でのエキソサイトーシスにより増加する。次に GluA1/GluA2 ヘテロ四量体が、シナプス外でのエキソサイトーシスと側方移動によりシナプス後膜で増加する。そしてその後、GluA2/GluA3 ヘテロ四量体が、シナプス外でのエキソサイトーシスと側方移動により増加する。

上述したように、申請者はシナプス後膜内外での受容体の挙動を高 S/N 比・高分解能で可視化する新実験手法を確立し、海馬長期増強発現に際しての AMPA 型グルタミン酸受容体のサブタイプごとの挙動を明らかにした。これらの成果は、哺乳類脳内のシナプス伝達の制御機構の解明に寄与する重要な知見である。よって、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 24 年 3 月 1 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。