

論文の内容の要旨

論文題目 海馬 CA1 領域での SNAP-25 のリン酸化による
プレシナプス短期可塑性の調節機構に関する研究

指導教員 真鍋 俊也 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 片山 憲和

<序文>

PKC は、開口放出の調節に関与しているキナーゼの一つである。神経細胞や内分泌細胞において、PKC を活性化する phorbol ester (diacylglycerol の類似体) を投与すると、神経伝達物質の開口放出が増加することから、開口放出の調節に PKC が重要な役割を担

っていることが明らかになっている。phorbol ester による PKC の活性化は、神経細胞や内分泌細胞において、readily releasable pool (RRP) サイズの増大や RRP へのシナプス小胞の補充速度の増加、細胞内の Ca^{2+} 感受性の増加、開口放出における release kinetics の調節などが引き起こされることが明らかになっている。PKC によってリン酸化される基質は、SNAP-25、Munc18 などが知られているが、一方で、PKC 非依存的に Munc13 を直接活性化することも明らかになっている。以上のことから、phorbol ester を用いた実験では、PKC による exocytosis の調節機構を解明することを困難にしている。

SNAP-25 は、PKC によってリン酸化を受ける基質の一つである。SNAP-25 は、phorbol ester の投与や生理的な刺激によってリン酸化され、主要なリン酸化部位は Ser187 であることが明らかとなっている。SNAP-25 Ser187 のリン酸化は、syntaxin と SNAP-25 の結合の促進、RRP へのシナプス小胞の供給速度の調節、 Ca^{2+} channel を介した Ca^{2+} 電流量を負に制御することが明らかになっている。また、caged Ca^{2+} を用いた実験では、SNAP-25 のリン酸化によって highly Ca^{2+} -sensitive pool (HCSP) と呼ばれるシナプス小胞のプールサイズが増大することが報告されている。しかしながら、SNAP-25 S187 のリン酸化は、exocytosis に影響しないという報告や、また、SNAP-25 は、PKC によるリン酸化ではなく PKA による SNAP-25 T138 のリン酸化によって、RRP のサイズを増大させるという報告もあることから、SNAP-25 のリン酸化の効果は未だ不明な点が多い。さらに、これらの結果は、内分泌細胞を用いた実験によって得られた結果であり、実際に中枢神経系において SNAP-25 のリン酸化がプレシナプス機能の調節に重要な役割を担っているかどうかは明らかになっていない。そこで、SNAP-25 の 187 番目のセリンをアラニンに置換した knock-in マウスを用いて、中枢神経系における SNAP-25 S187 のリン酸化のシナプス伝達における役割について電気生理学的に検討した。

<実験方法>

実験動物: SNAP-25 knock-in マウスと SNAP-25 KO マウスは、北里大学医学部生化学教室の高橋正身教授のグループより提供を受け、実験を行った。

Western Blot: P25 のマウスから脳を取り出し、Western blot により、タンパク質の発現量を定量した。

電気生理学実験: 麻酔したマウスから海馬を摘出し、スライスを作製した。リンゲル液 (119 mM NaCl, 26.2 mM NaHCO₃, 1 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 2.5 mM KCl, 11 mM Glucose, 2.5 mM CaCl₂, 1.3 mM MgSO₄; 95% O₂, 5% CO₂ で常時飽和) で灌流しながら、双極性タングステン刺激電極によりシャツファー側枝を刺激し、CA1 領域から細胞外電位記録法により興奮性シナプス後電位 (EPSP) を測定した。PPF (paired-pulse facilitation) は、25 μM *D*-AP5 存在下で、300、200、100、50、30 ミリ秒の間隔で 2 発の連続刺激を与えることで誘導した。input-output relationship は、25 μM *D*-AP5 と 1 μM CNQX 存在下で、実験を行った。テタヌス後増強 (post-tetanic potentiation: PTP) と短期抑圧 (short-term depression: STD) は、50 μM *D*-AP5 存在下でそれぞれ 100 Hz (1 秒) 刺激、5 Hz (3 分) 刺激によって誘導した。RRP サイズは、5 Hz (3 分) 刺激中の応答から算出した cumulative EPSP をもとに推定した。

<結果および考察>

SNAP-25 S187A knock in マウスを用いて、電気生理学的な実験を行った。SNAP-25 knock-in マウスにおいて、PPF は、WT マウスと比べて、どの刺激間隔においても有意に増強していた。また、input-output relationship は、WT マウスと比べて有意に減弱していた。さらに、SNAP-25 knock-in マウスにおいて、細胞外 Ca²⁺濃度を 4.5 mM に上げる

と、PPF は、2.5 mM の WT マウスと同程度まで減弱した。以上の結果から、SNAP-25 knock-in マウスでは、release machinery の Ca^{2+} 感受性の低下によって、神経伝達物質の放出確率が顕著に低下した可能性が示唆される。

次に、SNAP-25 knock-in マウスにおける短期可塑性への影響について検討した。

SNAP-25 knock-in マウスにおける PTP は、WT マウスと比べて、有意な増強が見られた。このとき、細胞外 Ca^{2+} 濃度を 2.5 mM から 4.5 mM に変えても、PTP はわずかに低下するにとどまり、WT マウスと比べて、依然増大したままであった。一般的に、PTP は高頻度刺激後にシナプス終末に生じる残存 Ca^{2+} によって、一過的な神経伝達物質の放出確率の上昇と RRP サイズの増加が引き起こされることによって生じるとされている。そこで、5 Hz 刺激によって誘導される EPSP から RRP サイズを推定したところ、SNAP-25 knock-in マウスでは、RRP サイズの増大が示唆される結果が得られた。以上の結果から、SNAP-25 S187 のリン酸化は、RRP サイズの調整に関与している可能性が示唆された。また、海馬 CA1 領域における PTP は、神経伝達物質の放出確率の変化よりも RRP の変化によってダイナミックに制御されている可能性が示唆された。しかしながら、今回 RRP サイズの推定に用いた刺激は、一般的に RRP サイズの推定に用いられている高頻度刺激とは異なり、持続的な低頻度刺激を用いて行われた。この刺激頻度では RRP を十分枯渇することができているかどうか明らかではないことや、RRP への供給量がどの程度であるかも明らかではない。したがって、SNAP-25 S187 のリン酸化が RRP サイズの調節に重要な役割を担っているかどうかについては、今後、より一般的な刺激条件を用いた更なる検討が必要である。

SNAP-25 knock-in マウスにおいて、5 Hz (3 分) 刺激によって誘導される STD の減弱のピークは、WT マウスと比べてやや強い減弱傾向を示すものの、有意差は見られな

かった。一方、減弱からの回復速度は、WT マウスと比べて有意に低下していた。一般的に、STD は RRP の小胞が枯渇することによって生じるとされ、一方、STD からの回復は、endocytosis や reserve pool からの RRP へのシナプス小胞の供給が働くことによって生じると考えられる。また、内分泌細胞において、SNAP-25 S187 のリン酸化は、reserve pool から RRP へのシナプス小胞の供給を促進することが明らかになっている。以上の結果から、SNAP-25 knock-in マウスでは、RRP へのシナプス小胞の供給速度が低下している可能性が示唆される。

SNAP-25 knock-in マウスでは、おそらくネオマイシン耐性遺伝子による影響のために、SNAP-25 の発現量が半減していた。SNAP-25 は、SNARE 複合体の構成タンパク質であり、神経伝達物質の放出に直接関係している。したがって、SNAP-25 の発現量の半減が神経伝達物質の放出確率の低下や短期可塑性の変化に関係しているかどうかを検証するために、SNAP-25 KO マウスの Hetero マウスを用いて実験を行った。Hetero マウスの PPF は WT と比べて有意な差は見られなかった。また、PTP、および STD に関しても WT マウスと比べて顕著な差は見られなかった。これらの結果から、少なくとも海馬 CA3-CA1 シナプスにおいて、SNAP-25 の発現量の半減は、シナプス伝達には影響はしないことが明らかになった。

これらの結果は、SNAP-25 S187 のリン酸化が中枢神経系において、神経伝達物質の放出確率や RRP サイズ、短期可塑性の調節といったプレシナプス機能の調節に重要な役割を担っていることを強く示唆するものである。