

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 片山 憲和

本研究は、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を明らかにするために、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、もしくは SNAP-25 knock-out マウスの Hetero マウスを用いて電気生理学的に検討を行い、下記の結果を得た。

1. 海馬急性スライスを用いて、CA1 領域から細胞外電位記録により、EPSP を記録した。25 μM *D*-AP5 存在下で、2 発刺激促通 (paired-pulse facilitation: PPF) を記録したところ、SNAP-25 knock-in マウスでは、WT マウスと比べて PPF の増強が明らかになった。また、25 μM *D*-AP5 と 1 μM CNQX 存在下で、AMPA 受容体を介した input-output relationship を記録したところ、fiber volley amplitude に対する EPSP slope 値は、WT マウスと比べて有意に減弱していた。以上の結果から、SNAP-25 knock-in マウスではプレシナプス終末からの神経伝達物質の放出確率が低下していることが示された。
2. 50 μM *D*-AP5 存在下で、100 Hz (1 秒) によって誘導される短期可塑性 (post-tetanic potentiation: PTP) について記録したところ、SNAP-25 knock-in マウスでは、WT マウスと比べて PTP の著しい増強が示された。また、50 μM *D*-AP5 存在下で、5 Hz (3 分) によって誘導される短期可塑性 (short-term depression: STD) について記録したところ、SNAP-25 knock-in マウスにおける 5 Hz 刺激中の応答は、WT と比べて著しく異なり、最終的な減弱率にも有意差が見られた。さらに、5 Hz 刺激後の減弱率には有意な差は見られなかったが、減弱からの回復速度は、WT マウスに比べて有意に低下していた。
3. western blot により、プレシナプスタンパク質の発現量を解析したところ、SNAP-25 knock-in マウスでは、SNAP-25 の発現量の半減が示された。そこで、SNAP-25 の発現量の低下が神経伝達物質の放出確率や短期可塑性の変化に直接関係しているかどうかを検討するため、SNAP-25 knock-out マウスの Hetero マウスを用いて電気生理学的に検討したところ、WT マウスと比べて、PPF や PTP、STD に違いは見られなかった。以上の結果から、SNAP-25 knock-in マウスで見られた表現型は、SNAP-25 の発現量の低下によるものではなく、SNAP-25 がリン酸化されないことによるものであることが明らかになった。

4. SNAP-25 knock-in マウスで見られた表現型が release machinery の Ca^{2+} 感受性の変化で説明できるかどうかを検討するために、細胞外 Ca^{2+} 濃度の短期可塑性に対する影響を検討したところ、SNAP-25 knock-in マウスにおいて、細胞外 Ca^{2+} 濃度を 2.5 mM から 4.5 mM に上げると、PPF は WT マウスにおける 2.5 mM Ca^{2+} のときと同程度の値を示した。一方、PTP は細胞外 Ca^{2+} 濃度を変化させても、ほぼ同程度の値を示し、WT マウスと比べて依然有意に高い増強を示した。また、5 Hz 刺激中に見られる応答は、細胞外 Ca^{2+} 濃度を 4.5 mM に上げると、刺激開始直後の一時的な増強は依然として見られるものの、最終的に WT マウスにおける 2.5 mM と同程度まで減弱した。
5. PTP の著しい増強が readily releasable pool (RRP) の増大によって説明できるかどうかを検討するために、5 Hz 刺激によって誘導される EPSP を再解析することによって RRP サイズを推定したところ、今回用いた刺激条件では不明な点があるものの、SNAP-25 knock-in マウスの RRP サイズは、WT マウスと比べて有意に増大している可能性が示された。

以上、本論文は、SNAP-25 knock-in マウス、および SNAP-25 knock-out マウスの Hetero マウスを用いて電気生理学的に解析することにより、中枢神経系のプレシナプス終末に発現する SNAP-25 のリン酸化におけるシナプス伝達に対する役割について明らかにした。本研究は、これまで明らかにされていなかった開口放出関連タンパク質のリン酸化による開口放出の調節機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。