



## Postsynaptic Modulation of AMPA Receptor-Mediated Synaptic Responses and LTP by the Type 3 Ryanodine Receptor

志牟田, 美佐

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2001-10-10

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2576

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002576>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



## 【153】

氏名・(本籍) 志牟田 美佐 (福岡県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学位記番号 博ろ第1817号

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の日付 平成13年10月10日

### 【学位論文題目】

**Postsynaptic Modulation of AMPA Receptor-Mediated  
Synaptic Responses and LTP by the Type 3 Ryanodine Receptor**

(3型リヤノジン受容体によるAMPA受容体を介した  
シナプス応答及びLTPのシナプス後性調節)

### 審査委員

主査 教授 真鍋 俊也

教授 饗場 篤 教授 寺島 俊雄

神経細胞内のカルシウムイオン ( $Ca^{2+}$ ) 濃度の上昇は、神経伝達物質の放出、シナプス可塑性、遺伝子の転写調節といった様々な神経活動を制御していることが知られている。リヤノジン受容体 (RyR) は細胞内カルシウムストアである小胞体から  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release (CICR) によって細胞質内に  $Ca^{2+}$  を供給する  $Ca^{2+}$  放出チャネルとして機能し、その結果細胞質内の  $Ca^{2+}$  シグナルを増強することが示されている。RyR は近年の遺伝子クローニングにより、哺乳動物において 3 種類のサブタイプ RyR1 (骨格筋型)、RyR2 (心筋型)、RyR3 (脳型) の存在が明らかにされ、主に骨格筋と心筋において機能解析が進んでいる。また、RyR の全てのサブタイプ分子は脳に発現していることが明らかになっており、RyR1 は主に小脳のブルキンエ細胞に、RyR2 は脳全体に広く存在し、RyR3 は海馬 CA1 領域に豊富に発現していることが知られている。中枢神経系における RyR の役割の研究はこれまでに薬理学的な手法を用いて行われてきたが、これらの研究では個々の RyR サブタイプの機能を分離して検討することができず、それぞれの RyR サブタイプの機能的意義は未だ明らかでない。

活動依存的な可塑性であるシナプス伝達の長期増強 (LTP) は学習・記憶の基盤となる細胞レベルでの現象であると考えられている。特に海馬 CA1 領域での LTP は空間、陳述記憶といったタイプの長期記憶の基になるシナプス機構を司っていると示唆されている。その誘導では *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の活性を介したシナプス後細胞への細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入が引き金になっていることが知られている。これまでに、LTP 誘導における細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  放出の関与が示唆されているが、NMDA 受容体活性に続く CICR が LTP の成立に必要か否かはまだ解明されていない。また LTP の発現は通常の（正常）興奮性シナプス伝達を担っている  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 受容体応答の増大を伴い、その分子機構としては今までに以下の 2 つの可能性が提唱されている。第一に、シナプス後膜肥厚部表層にあらかじめ存在する AMPA 受容体が、 $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II などのリン酸化酵素によってリン酸化され、その单一チャネルコンダクタンスが増大する可能性が提唱されている。第二に、LTP 誘導刺激によって、それまで膜直下に存在した活性型 AMPA 受容体がシナプス後細胞の肥厚部に挿入

される可能性が提唱されている。

1996 年 Takeshima らによって、RyR3 の個体レベルでの生理学的機能の解析やサブタイプ間の機能上の差異を検討する目的で作製された RyR3 遺伝子欠損マウス (RyR3 (-/-)) は正常に発育および繁殖し、その骨格筋や平滑筋での生理学的機能の異常は全く認められなかったが、自発運動の亢進が行動学的実験から認められた。このことから RyR3 が中枢神経系におけるシナプス活動において重要な役割を担っていることが示唆された。そこで我々は中枢神経系における RyR3 の機能を解明する目的で、この遺伝子欠損マウスを用いて電気生理学的手法、生化学的手法、組織化学的手法によって解析を行った。RyR3 は RyR サブタイプの中で海馬 CA1 領域に最も多量に発現していることから、電気生理学的機能解析は海馬 CA1 領域において行った。

以下に実験内容とその結果、及び考察を記載する。

初めに、海馬 CA1 領域での正常シナプス伝達を調べる目的で、電気生理学的手法を用いて、AMPA 受容体及び NMDA 受容体を介した興奮性シナプス後電位 (EPSPs) の入出力関係を調べた。その結果、NMDA 受容体を介したシナプス応答には野生型と RyR3 (-/-) マウス群間には差は認められなかったが、AMPA 受容体を介したシナプス応答では RyR3 (-/-) マウス群において有意な減少が認められた。したがって RyR3 (-/-) マウス群ではシナプス後細胞での AMPA 受容体を介したシナプス応答が選択的に減少していることが示された。

上述の AMPA 受容体応答の減少が AMPA 受容体の発現量の減少によるものか否かを検討する目的で、海馬における AMPA 受容体、NMDA 受容体、シナプス後膜直下に存在する足場タンパク質 PSD-95 の発現を免疫組織化学的手法を用いて検討した。その結果、いずれの分子も海馬での発現量に差は認められなかった。更に詳細に検討するために、前脳全体、シナプス膜、シナプス後肥厚より精製した膜分画での AMPA 受容体、NMDA 受容体、PSD-95 の発現量をウエスタン法で解析した結果、どの膜分画においてもそれぞれの発現量には差は認められなかつた。したがって、RyR3 (-/-) マウス群で認められた AMPA 受容体を介したシナプス応答の減少は、野生型マウス群に比べて AMPA 受容体の発現量や、シナプスの数が減少しているため

ではなく、AMPA受容体の特性の変化による可能性が示唆された。

次に、RyR3 (-/-) マウスでシナプス可塑性が影響を受けているか否かを電気生理学的手法を用いて検討した。入力線維に 100 Hz の高頻度刺激を 1 秒間与えると、正常のマウス海馬 CA1 領域ではそのシナプス伝達が 1 時間以上にわたって増強される LTP が誘導される。LTP の実験の結果、高頻度刺激直後では野生型と RyR3 (-/-) マウス群間に有意な差は認められなかったが、高頻度刺激後 1 時間では RyR3 (-/-) マウス群において明らかな減弱が認められた。しかし刺激の持続時間を短くして LTP が殆ど生じない程度の刺激 (100 Hz の高頻度刺激を 100 ミリ秒間) による短期増強 (STP) 誘導の実験では刺激直後と刺激後 1 時間ともに全く差は認められなかった。以上のことから、シナプス後細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度の上昇に RyR3 が関わっており、刺激の強度が一定の閾値を越えた場合に RyR3 (-/-) マウスにおける LTP の減弱が生じることが示された。

これまでの検討から RyR3 はシナプス後細胞での AMPA 受容体を介したシナプス応答を調節し、LTP を制御していることが示された。しかしながら RyR3 は軸索にも発現していることが報告されているため、RyR3 (-/-) マウス群で見られた LTP の減弱はシナプス前細胞からの神経伝達物質放出機構の異常による可能性も考えられた。そこで  $Ca^{2+}$  濃度上昇を介するシナプス前性の短期可塑性 (2 発刺激増強、5Hz 刺激応答、テタス後増強) を検討したが、野生型と RyR3 (-/-) マウス群間に差は認められなかった。このことから、RyR3 (-/-) マウス群における LTP の異常はシナプス前性の変化によるものではないことが示唆された。

以上の結果から、海馬 CA1 領域において RyR3 が AMPA 受容体の特性とシナプス後細胞における LTP 誘導・発現機構に影響を与えると結論した。

神戸大学大学院医学系研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 1820 号	氏名	志牟田 美佐
論文題目	Postsynaptic modulation of AMPA receptor-mediated synaptic responses and LTP by the type 3 ryanodine receptor 3型リヤノジン受容体による AMPA 受容体を介したシナプス応答及び LTP のシナプス後性調節		
審査委員	主査 真鍋 俊也 副査 繁易 篤 副査 寺島 俊雄		
審査終了日	平成 13 年 9 月 18 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

神経細胞質内のカルシウムイオン ( $Ca^{2+}$ ) 濃度の上昇は、様々な神経活動を制御していることが知られている。リアノジン受容体 (RyR) は細胞質内カルシウムストアから  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release (CICR) によって細胞質内に  $Ca^{2+}$  を供給する  $Ca^{2+}$  放出チャネルとして機能することが示されている。RyR は 3 種類のサブタイプ RyR1 (骨格筋型)、RyR2 (心筋型)、RyR3 (脳型) の存在が明らかにされ、主に骨格筋と心筋において機能解析が進んでいる。しかしながら RyR の全てのサブタイプ分子は脳に発現しているにもかかわらず、シナプス伝達における役割の詳細は不明である。

海馬での活動依存的な可塑性であるシナプス伝達の長期増強 (LTP) は学習・記憶の基盤となる細胞レベルでの現象であると考えられている。海馬 CA1 領域での LTP の誘導は *N-methyl-D-aspartate* (NMDA) 受容体の活性を介したシナプス後細胞への  $Ca^{2+}$  流入が引き金になっていることが知られている。これまでに、LTP 誘導における細胞質内ストアからの  $Ca^{2+}$  放出の関与が示唆されているが、NMDA 受容体活性に続く CICR が LTP の成立に必要か否かはまだ解明されていない。また LTP の発現は、通常の（正常）興奮性シナプス伝達を担っている  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 受容体応答の増大を伴うことが示されている。

1996 年 Takeshima らによって作製された RyR3 遺伝子欠損マウス (RyR3(-/-)) は正常に発育および繁殖し、その骨格筋や平滑筋での生理学的機能の異常は全く認められなかつたが、自発運動の亢進が認められた。このことから RyR3 が中枢神経系において重要な役割を担っていることが示唆された。そこで我々は中枢神経系における RyR3 の機能を解明する目的で、RyR3 が高濃度に発現している海馬 CA1 領域でのシナプス伝達と可塑性を、RyR3 遺伝子欠損マウスを用いて検討した。

初めに、海馬 CA1 領域での正常シナプス伝達を調べる為に、AMPA 受容体及び NMDA 受容体を介したシナプス応答を検討した。その結果、NMDA 受容体を介したシナプス応答には野生型と RyR3(-/-) マウス群間には差は認められなかつたが、AMPA 受容体を介したシナプス応答では RyR3(-/-) マウス群において有意な減少が認められた。AMPA 受容体応答の減少が海馬での AMPA 受容体発現量の減少によるものかを、免疫組織化学法とウエスタン法にて検討したが、その発

現量には差は認められなかつた。したがつて、RyR3 (-/-) マウス群で認められた AMPA 受容体を介したシナプス応答の減少は、野生型マウス群に比べて AMPA 受容体の発現量が減少しているためではなく、AMPA 受容体の特性の変化による可能性が示唆された。

次に、RyR3(-/-) マウスでシナプス可塑性が影響を受けているか否かを検討した。入力線維に 100 Hz の高頻度刺激を 1 秒間与えると、正常のマウス海馬 CA1 領域ではそのシナプス伝達が 1 時間以上にわたつて増強される LTP が誘導されるが、RyR3(-/-) マウス群では時間の経過に伴つた LTP の減弱が認められた。しかし刺激の持続時間を短くして LTP が殆ど生じない程度の刺激 (100 Hz の高頻度刺激を 100 ミリ秒間) による短期増強 (STP) 誘導の実験では刺激直後と刺激後 1 時間ともに全く差は認められなかつた。以上のことから、シナプス後細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度の上昇に RyR3 が関わつており、刺激の強度が一定の閾値を越えた場合に RyR3(-/-) マウスにおける LTP の減弱が生じることが示された。

RyR3 は軸索にも発現していることが報告されているため、RyR3(-/-) マウス群で見られた LTP の減弱はシナプス前細胞からの神経伝達物質放出機構の異常による可能性も考えられた。そこで  $Ca^{2+}$  濃度上昇を介するシナプス前性の短期可塑性を検討したが、野生型と RyR3(-/-) マウス群間に差は認められなかつた。このことから、RyR3(-/-) マウス群における LTP の異常はシナプス前性の変化によるものではないことが示唆された。

以上の結果から、海馬 CA1 領域において RyR3 が AMPA 受容体の特性とシナプス後細胞における LTP 誘導・発現機構に影響を与えていると結論した。

本研究は、海馬 CA1 領域におけるシナプス伝達とシナプス可塑性における 3 型リアノジン受容体の役割について検討したものであるが、シナプス後細胞の小胞体からの 3 型リアノジン受容体を介したカルシウム放出が、LTP の誘導のみならず、AMPA 受容体により媒介される正常シナプス伝達をも調節していることを世界に先駆け明らかにしたものであり、シナプス可塑性誘導機構について重要な知見を得たものとして価値ある研究であると認める。よつて、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。