

氏 名（国籍）	ちょう 趙	し 晞（中 国）
学 位 の 種 類	博 士（医 学）	
学 位 記 番 号	博 甲 第 3849 号	
学位授与年月日	平成 17 年 7 月 25 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科	
学 位 論 文 題 目	<b>Developmental, Regulation of GABAergic and glutamatergic synapses in hippocampal neurons</b> （海馬神経細胞におけるガンマアミノ酪酸及びグルタミン酸作動性シナプスの進展制御）	
主 査	筑波大学教授	博士（医学） 朝 田 隆
副 査	筑波大学教授	医学博士 落 合 直 之
副 査	筑波大学助教授	医学博士 玉 岡 晃
副 査	筑波大学助教授	医学博士 水 上 勝 義

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### （目的）

本実験の主目的は、シナプス形成の生じる最初の数週間、異なるタイプのシナプスがどのように形成されるかを見出すことにある。特に発達過程において GABA 性伝達の興奮性から抑制性への変化が、GABA 性シナプスの形成にどのような影響を及ぼすかに注目した。既に海馬細胞の heterochronic 培養において、樹状突起の成熟は、シナプス形成の律速段階であることが示されている。これ類似したシステムを用い、我々は成熟した樹状細胞の年齢によって、グルタミン酸性あるいは GABA 性シナプスの追加を受容できる能力が影響されるか否かを検討した。

### （対象と方法）

E18 ラットの海馬神経を CFP-actin でラベルし、異なる期間培養した。別に、GFP-synaptophysin (GFP-syp)をもつプラスミドを電気的分極により E18 神経細胞に導入した。この GFP-synaptophysin でラベルした E18 の神経細胞を、別に異なる期間で（1 週間あるいは 2 週間）培養してあった、より成熟した段階にある CFP-actin でラベルした細胞に加えた（heterochronic 培養）。2 週間後、細胞を固定し、抗 GABA 抗体で染色した。CFP-actin でラベルした樹状細胞にそって認められる GFP-synaptophysin 陽性クラスターを、シナプス新生として検討した。

### （結果）

通常の培養（同じ成熟過程にある細胞同士の培養、homochronic 培養）において、新生シナプスの 4 タイプ（I → E, I → I, E → I, E → E, I: Inhibitory, E: Excitatory）のすべてが最初の 3 週間において類似した早さで増加した。heterochronic 培養においても、シナプス前あるいはシナプス後の細胞の種類によらず、また CFP-actin でラベルされたシナプス後細胞の成熟度に関係なく、同程度のシナプス新生が認められ

た。この結果は、成熟樹状突起の週齢がシナプスの形成には影響しないこと、異なるタイプの新生シナプスが heterochronic 培養においてもバランスのとれた発育をすることを意味する。

#### (考察)

異なるタイプのシナプスが類似した発達を示すという観察から、これらのシナプス間の分子レベルでの違いは、正常の発達には関与しないと思われる。言い換えれば、一般的なシナプス形成のための細胞メカニズムは、シナプス新生の早期にあると言える。つまり、興奮性細胞や抑制性細胞の樹状突起は、いずれも逆行性のシグナルを出し、その結果どちらの軸索末端においてもシナプス前終末の形成およびシナプス小胞の集積をもたらすのであろう。そのようなシグナリングは、シナプス前、および後の膜タンパクによって調節されている可能性がある。

しかし、本研究は、形態学的発達の早期に限られたものであり、4つのタイプのシナプスの機能的な発達が、互いに相関しあっているか否かは明らかでない。すべてのシナプス小胞の集積、あるいは GFP-synaptophysin 陽性クラスターとして認められるような形態的に定義されるシナプスが、現実にはシナプス伝達を担っているか否かの検討、さらにこれらのシナプスの伝達効率の変化などは今後の課題である。これらについては電気生理学的な計測などの新しいアプローチを使って明らかにせねばならない。一方、すべてのタイプのシナプスが類似の速度で成長する可能性をもち、結果として発達における適当なバランス状態を保っていることは重要なことと思われる。heterochronic 培養で成長に差が見られないことは、新生したシナプスがすでに存在する神経回路に入っていくときに、よいバランスを保つことができる可能性を示唆している。

heterochronic 培養に基づく結果では、成熟した樹状突起（たとえば培養後2週間のもの）は、あらゆる種類のシナプスを受け入れる可能性を持っていた。これは、正常培養（homochronic）でみられた結果と同じであり、すべてのタイプのシナプスは2週から3週の間に持続的に形成される。これらの培養細胞では、GABA 性伝達は、7-10DIV（Day in Vitro）で、脱分極（興奮性）から過分極（抑制性）へ移り変わっていく。今回の実験で、この発達における GABA 性伝達の変化は、樹状突起が GABA 性シナプスの形成のためのシナプス前の構造的分化を促進する能力には影響を与えないことが示唆された。つまり、脱分極性 GABA 性伝達は、シナプス後 KCC2（K-Cl-co-transporter）の発現と機能を促進することによりシナプスの発達を促しているが、それはシナプス前終末の分化には必要ないものと思われる。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、シナプス形成の生じる最初の数週間で、GABA 性伝達の興奮性から抑制性への変化が、GABA 性シナプスの形成にどのような影響を及ぼすかに注目したものである。シナプス前あるいはシナプス後の細胞の種類によらず、またシナプス後細胞の成熟度に関係なく、同程度のシナプス新生が認められた。この結果は、成熟樹状突起の週齢がシナプスの形成には影響しないこと、異なるタイプの新生シナプスがバランスのとれた発育をすることを見出した。差が見られないことは、新生したシナプスがすでに存在する神経回路に入っていくときに、よいバランスを保つことができる可能性を示唆している。これは神経細胞の新生・再生のメカニズムを把握する上で重要な所見である。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。