



Title	デュアルコンポーネントシナプスの形成と可塑性に関する研究
Author(s)	清末, 和之
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3110122">https://doi.org/10.11501/3110122</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

デュアルコンポーネントシナプスの  
形成と可塑性に関する研究

博士学位論文  
1996年1月

大阪大学基礎工学研究科物理系専攻  
生物工学科 葛西研究室

清末 和之

デュアルコンポーネントシナプスの  
形成と可塑性に関する研究

博士学位論文  
1996年1月

大阪大学基礎工学研究科物理系専攻  
生物工学科 葛西研究室

清末 和之

## 要旨

脳における情報伝達はシナプスにおいて行われる。記憶、学習の形成には、そのシナプスでの可塑的変化が起こることが期待される。シナプスの可塑的変化として、長期増強、長期抑圧、神経回路網の再構築と言った現象が認識されてきた。その分子メカニズムを解明することが脳の高次機能を解明することにつながると考えられる。中枢神経系における主な興奮性伝達はグルタミン酸作動性シナプスのデュアルコンポーネントシナプスにより行われる。このシナプスは時間的、薬理的に非常に異なる特性を持つ2つの受容体に依ってシグナルを伝達しており、その受容体の性質の違いから、シグナルの伝達をそれのみではなく、時間的情報を  $Ca^{2+}$  を介した細胞内情報伝達系へ伝える。さらにこの情報はそのシナプス自身の可塑的変化を起こす要因となる。このことは単一シナプス部位でのそれぞれの受容体の発現比率の制御メカニズムとその形成メカニズムが可塑性誘導と維持にそれぞれに重要である事が考えられる。しかしながらデュアルコンポーネントシナプスの形成メカニズムと可塑的変化における受容体の動態は解明されていない。

ニワトリ胚終脳解離培養系を用いて、このデュアルコンポーネントシナプスの形成のメカニズムの解析、成熟に与えるシナプス伝達の効果の解析、スライス標本を用いて長期増強発現時のデュアルコンポーネントシナプスの解析を行った。

培養系を用いたシナプス形成の解析では、胚齢の異なる神経細胞を用いて、シナプス後細胞に依存してどの様なデュアルコンポーネントシナプスが形成されるかを電気生理学的に検討した。E.E.Days (胚齢+培養日数) 17 をシナプス前細胞とした際にシナプス後細胞の分化成熟度に依存してシナプス形成をする事が示された。分化成熟の早い段階の神経細胞は機能的な  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate / Kainate 型受容体 (A/K-R) を発現しているにも関わらず、*N*-methyl-D-aspartate 型受容体 (NMDA-R) だけのシナプスを形成する事が明らかとなった。またこの培養系では、E.E.Days 15 から 17 にかけてシナプス伝達が大きくな

ることが示されていた。2つのシナプス伝達、活動電位に依存するシナプス伝達と自発的なシナプス小胞の放出による伝達であるが、この期間のシナプス伝達の増加に与える効果を阻害剤を用いて検討したところ、それぞれ微小シナプス後電流の増加と一つの細胞由来のシナプス後電流の増加に対して影響を持っていた。この結果は微小シナプス後電流がシナプス終末の数の成長に関与することを示唆していた。

長期増強発現時におけるデュアルコンポーネントシナプスの解析には、生後直後のヒヨコ IMHV 領域のシナプスを用いた。この領域はヒヨコの刷り込み現象に関連ある部位と示唆され、長期の記憶を担っていると考えられる。5Hz/300 発のシナプス前細胞の刺激とシナプス後細胞の脱分極刺激により長期増強をできた。この長期増強の前後でシナプス後電流における A/K-R と NMDA-R の寄与する割合を検討したところ、A/K-R と NMDA-R の両成分が増強されていたが、A/K-R に対して NMDA-R 成分の電流が大きくなっていた。この結果は、少なくとも長期増強に伴い NMDA-R の数、もしくは NMDA-R を多く持つシナプス部位が多くなっていることを示唆していた。

まだ多くの問題を残すが、ヒヨコ IMHV 領域の長期増強の発現に NMDA-R を多く持つシナプスの新しいシナプス形成、シナプス形成の初期過程は NMDA-R のみのシナプスをつくる事のアナロジーを考慮すると、シナプス形成の分子メカニズムを解明することにより、可塑性のメカニズムに大きく貢献すると考えられる。今後、E.E.Days 11 の神経細胞がどの様にしてサイレントシナプスを形成するかを検討したい。

# 目次

第一章 序論.....	3
第1節 デュアルコンポーネントシナプス.....	4
第2節 シナプス形成.....	5
第3節 シナプスの可塑性.....	6
第二章 ニワトリ胚終脳解離培養系を用いたデュアルコンポーネントシナプス形成の解析.....	9
第1節 序論.....	10
第2節 材料と方法.....	11
I 培養.....	11
II 異胚齢共培養.....	12
III 電気生理学的手法.....	12
IV 免疫化学的組織染色.....	16
第3節 結果.....	18
I E.E.Days 17 の神経細胞におけるデュアルコンポーネントシナプス.....	18
II グルタミン酸シナプス形成とシナプス後細胞の成熟.....	24
III E.E.Days 11 のにおけるNMDA-Rのみを持つシナプスの形成.....	31
IV E.E.Days 11 の神経細胞におけるA/K-R と NMDA-R の存在.....	34
第4節 考察.....	41
I 異胚齢共培養を用いたアッセイについて.....	41
II サイレントシナプスの形成について.....	42
III グルタミン酸受容体について.....	44
第三章 ニワトリ胚終脳解離培養系を用いたシナプス伝達依存的なシナプス成熟.....	45
第1節 序論.....	46
第2節 材料と方法.....	47
第3節 結果.....	47

第4節 考察 .....	53
第四章 生後直後のヒヨコ <b>IMHV</b> 領域における長期増強 .....	56
第1節 序論 .....	57
第2節 材料と方法 .....	59
I 脳切片の準備 .....	59
II 溶液と薬剤 .....	59
III 記録と解析 .....	59
第3節 結果 .....	62
I <b>IMHV</b> 領域のシナプスの同定 .....	62
II 長期増強の誘導 .....	62
III NMDA-R 成分のより大きい増強 .....	67
IV 増強されないMini の振幅 .....	72
V <b>IMHV</b> 領域におけるサイレントシナプスの存在 .....	72
第4節 考察 .....	75
I <i>fast LTP</i> と <i>slow LTP</i> に関して .....	75
II 発現部位について .....	76
第五章 総括 .....	80
第六章 論文発表と学会発表 .....	81
第七章 参考文献 .....	85
第八章 謝辞 .....	92

略語一覧	EPSC	興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic currents)
	Mini	微小シナプス後電流 (miniature synaptic current)
	SSC	自発性シナプス電流 (spontaneous synaptic current)
	evoked EPSC	1 細胞刺激による EPSC

# 第一章 序論

第1節 デュアルコンポーネントシナプス .....	4
第2節 シナプス形成.....	5
第3節 シナプスの可塑性 .....	6

## 第1節 デュアルコンポーネントシナプス

同一の伝達物質に対し2種類以上の受容体が存在するシナプスがしばしば観測され(Dale and Roberts 1985; Kehoe 1972)、これをデュアルコンポーネントシナプスと呼ぶ。この様なシナプスは1種類の受容体しかないシナプスより、多様な伝達を行うことが可能になる。中枢神経系の興奮性シナプス伝達は、主にグルタミン酸作動性シナプスによって担われており、このグルタミン酸作動性シナプスの多くにおいて、シナプス後細胞膜には少なくとも2種類のグルタミン酸受容体(GluRs)があるとされている (Bekker and Stevens 1989; Forsthe and Westbrook 1988; Hestrin 1992a)。イオントロピックグルタミン酸受容体は、大きく2種類に分類される。α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate / Kainate 型受容体 (A/K-R)、と N-methyl-D-aspartate 型受容体 (NMDA-R)である。一般的に、この2種類の GluR は機能的に異なる性質を持っていると言われている。A/K-R を介する EPSC は非常に短く(減衰時定数 1-8ms)、NMDA-R を介する EPSC はそれに比べてずっと遅い(減衰時定数 10-200ms) (Collingrige, et al. 1988; Hestrin, et al. 1990; Lester, et al. 1990)。さらにリガンド依存性、イオン選択性、電位依存性の特徴も異なっている。リガンド依存性の違いは、アゴニストであるグルタミン酸に対する親和性の差である。NMDA-R は EC<sub>50</sub> 値がおおよそ 3 μM 程度に対して、A/K-R の EC<sub>50</sub> 値は >100 μM 程度である (Hestrin 1992; Lester and Jahr 1992)。また、A/K-R は1価のカチオンに選択性があり、ほぼ線形な電圧電流関係を示す。これに対して、NMDA-R は、負の膜電位で細胞外 Mg<sup>2+</sup>によって強力に阻害されており、生理条件下においては強い外向き整流性を示す (Nowak, et al. 1984)。また NMDA-R は A/K-R に比べて、Ca<sup>2+</sup>に対し強い透過性を持っている(P<sub>Ca</sub>/P<sub>Na</sub> は A/K-R の場合、おおよそ 0.1 に対し、NMDA-R の場合はおおよそ 4 である (マウス脊髄培養神経細胞: McDermont, et al. 1986)。この時間的性質、イオン透過性の違いを持つ受容体が1つのシナプスにあることにより、シナプス前細胞の活動の時間的情報が、そのままシナプス後細胞に伝わるのみならず、細胞内情報伝達の大きな役者である Ca<sup>2+</sup>の濃度変化として伝わる。このことは

活動依存的なシナプスの可塑性を生むメカニズムに重要であると考えられる。

## 第2節 シナプス形成

シナプス発生には明確には区別できない3つの過程がある。シナプスの形成、成熟、再構築の過程である。シナプス形成時のシナプス前細胞、後細胞における特異化の分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。特に中枢神経系におけるシナプス形成のメカニズムはほとんど解明されていない。電子顕微鏡を用いた研究が形態学的にシナプス形成に関する情報を供給してきた (Vaughn 1989)。近年シナプスを構成する分子群を免疫組織化学的手法を用い、見ながらの研究が行われつつあるが、しかしながらシナプスとしての機能を継続的に計測、解析した研究はほとんど行われていない。

シナプス形成の多くの知見は神経筋接合部から得られている (Hall and Sanes 1993; Colman and Lichtman 1993; Jai, et al. 1993)。神経筋接合部での伝達物質はアセチルコリン (ACh) である。運動神経は軸索を伸長し、筋細胞に接触する。数分の内に伝達が可能になり、数週間かけて成熟をする。このときにシナプス部位に ACh 受容体の凝集がおきる。この過程にはシナプスの前細胞と後細胞間で様々な分子が働いている (Haydon and Drapeau 1995; Hall and Sanes 1993)。Calcitonin gene-related peptides (CGRP)、ARIA (ACh-receptor inducing activity) は筋細胞での ACh 受容体の合成に影響を及ぼすものとして、また神経細胞由来の agrin と bFGF は筋細胞での AChR 凝集に影響を及ぼすものとして同定されている (Ferns, et al. 1993; Nastuk and Fallon 1993; Peng, et al. 1991)。また、シナプス後細胞で ACh 受容体の凝集に関して働いている分子としては、rapsyn が示唆されている (Noakes, et al. 1993)。一方受容体の電気的な特性もシナプス形成の過程において大きく変わることが示されている。シナプス形成前とその最初の凝集時に存在する ACh 受容体は大きなコンダクタンスと遅い開閉カインेटクスを持つものである。その後成熟にともない、コンダクタンスの小さな、そして速い開閉カインेटクスを持つチャンネルへと変わる。これは、ACh 受容体のサブユニットの  $\gamma$  が  $\epsilon$  に変わることによって

(Mishina, et al. 1986; Sakmann and Brenner 1978; Witzemann, et al. 1989). シナプス前細胞としては伝達物質放出機構関連分子(SNARE)の神経終末に局在化する. この様にシナプス形成は最初の接触から関連分子群の量的、質的な空間的変化を伴うものである.

### 第3節 シナプスの可塑性

記憶、学習にはシナプスの可塑的な変化が必要と考えられている. 現在確認されている可塑的な現象としては、長期増強(Long-term Potentiation: LTP)、長期抑圧(Long-term Depression: LTD)、学習による発芽、それと発生期における神経回路網の再構築(refinement)がある.

長期増強は、いろいろな領域のシナプスにおいて観測されているが、発現、維持のメカニズムに関して統一の見解はいまだない. むしろ領域ごとにそのメカニズムが違うことが示されている. 齧歯類の海馬においては、2種類のシナプスで長期増強が確認されている. CA3の錐体細胞に対する歯状回(Dentate Gyrus: DG)からの入力シナプスと CA1の錐体細胞に対する Schaffer 側枝からの入力シナプスである. 誘導のメカニズムとして、前者は NMDA-R 非依存型であり、後者は、NMDA-R 依存型である (Bliss and Collingridge 1993). また、後者の発現のメカニズムに関しては、刺激に対する伝達物質放出確率の上昇に依るシナプス前細胞説とグルタミン酸受容体の応答増加に依るシナプス後細胞説の混迷の時期を過ごしていた. この実験こと実解釈における問題を解消したモデルがサイレントシナプスである. サイレントシナプスは NMDA-R のみを持つシナプスである. A/K-R と NMDA-R を介する電流における coefficient of variance の違いの発見を期にして (Kullmann 1994)、サイレントシナプスの存在が確認され、このシナプスの silent から un-silent への転換が長期増強を誘導するペアリング刺激により引き起こせることが明らかとなった (Issac, et al. 1995; Liao, et al. 1995). 現在このサイレントシナプスの活性化がこの領域における長期増強の主たる発現メカニズムとして支持されている. 以上の最近の報告によると、発現メカニズムとしては、CA3 では伝達物質放出確率の上昇が、

CA1 ではシナプス後細胞における A/K-R の増加が主たる要因であると有力視されている (Nicoll and Malenka 1995).

神経回路網の再構築は、一般に NMDA-R 依存的な現象であると認識されている(Cline and Constantine-Paton 1989; Fox, et al. 1989; Simon, et al. 1992; Li, et al. 1994). 網膜から外側膝状体への投射、IO 核から小脳プルキンエ細胞への投射におけるシナプス結合の再構成には NMDA-R の活性が必要であることが示されてきた. バレル形成は幼弱期に限定して起こる現象として知られているが、Crair と Malenka はこの体性感覚野の第 4 層に対する視床からのシナプス入力で長期増強が起きること、そして、その臨界時期に高い増強率をもつ実験事実を提出し、神経回路網の再構築においても長期増強は重要な役割を持っていることを主張している. このことは網膜から外側膝状体への入力でも発生期に長期増強が起こることと一致している(Mooney, et al. 1993). さらに長期増強の増強率の減少と平行して、A/K-R に対する NMDA-R を介する電流比が減少していることを明らかにした(Crair and Malenka 1995). つまり長期増強の誘導率が高いときは、NMDA-R の A/K-R に対する比率が高いのである. 以上のことと海馬 CA1 における長期増強の発現メカニズムを考慮すると、長期増強誘導メカニズムのはデュアルコンポーネントシナプスにおける機能的な NMDA-R と A/K-R の発現比率を制御しているメカニズムに非常に密接に関連するものと思われる. しかしながら NMDA-R と A/K-R のシナプスにおける存在比を制御している機構に関しては全く知見がない.

シナプスの可塑性の維持には、発芽と言った新しいシナプスの形成も必要であると考えられる. そこで発生におけるシナプス形成メカニズムがこの新しいシナプスの形成時に再動員されると考えられる. しかしながら、機能を計測しながら進めた中枢神経系におけるシナプス形成の研究はほとんどない. 本論文で取り扱うデュアルコンポーネントシナプスにおける NMDA-R と A/K-R の存在比の制御メカニズムはシナプス形成と可塑的变化に大きく関与していると考えられる. .

本論文では、このデュアルコンポーネントシナプス形成メカニズムの解析、

シナプス成熟に与えるシナプス伝達の効果の解析、スライス標本を用いた長期増強時のデュアルコンポーネントシナプス解析を行った。

## 第二章 ニワトリ胚終脳解離培養系を用いたデュアルコンポーネントシナプス形成の解析

第1節 序論.....	10
第2節 材料と方法.....	11
I 培養.....	11
II 異胚齢共培養.....	12
III 電気生理学的手法.....	12
IV 免疫化学的組織染色.....	16
第3節 結果.....	18
I E.E.Days 17 の神経細胞におけるデュアルコンポーネントシナプス.....	18
II グルタミン酸シナプス形成とシナプス後細胞の成熟.....	24
III E.E.Days 11 のにおけるNMDA-Rのみを持つシナプスの形成.....	31
IV E.E.Days 11 の神経細胞におけるA/K-R と NMDA-R の存在.....	34
第4節 考察.....	41
I 異胚齢共培養を用いたアッセイについて.....	41
II サイレントシナプスの形成について.....	42
III グルタミン酸受容体について.....	44

## 第1節 序論

デュアルコンポーネントシナプスにおいてはグルタミン酸作動性シナプスの伝達が、全く異なる性質を持つ2つのイオントロピック受容体によって行われている。その性質により、単一受容体のシナプスより多くの情報をシナプス後細胞に伝えることができ、可塑的変化を誘導する機構がそのシナプスのNMDA-RとA/K-Rの比率の制御機構に非常に密接に関連するものと考えられる。どのような過程を経てデュアルコンポーネントシナプスになるのか、またA/K-RとNMDA-Rの比率がどのようなメカニズムで制御されているのであろうか。

中枢神経系のシナプス形成過程を詳細に解析するには、解離培養系は非常に有用な方法であり、様々な培養系が開発されてきた(Basarsky, et al. 1994; Kraszewski and Grantyn 1992; Nelson and Field 1989)。我々は、シナプス形成を解析することの可能なニワトリ胚終脳の解離培養系を開発してきた(Tokioka, et al. 1993)。この培養系において、主なシナプス伝達はグルタミン酸作動性シナプスとGABA作動性シナプスである。グルタミン酸作動性シナプスは受容体としてA/K-RとNMDA-Rを持っている。またGABA作動性シナプスはGABA<sub>A</sub>受容体を持っている。胚齢6日(E6:以下同様の省略を行う)からE10の胚を用いた培養においては、培養日数ではなく、E.E.Days(胚齢と培養日数の和)に依存して、自発的なシナプス後電流(SSC)が観測され、E.E.Days 17ではすべての細胞でSSCが見られる。SSCはE.E.Days 13より見られはじめ、E.E.Days 15から17にかけて急激にその頻度、振幅が大きくなる。このことはE.E.Days 13から17にかけてシナプス形成の能力に差があることを示唆している。本研究では、この解離培養系を用いてこのデュアルコンポーネントシナプスの形成過程を解析し、シナプスにおけるレセプターの存在比率の制御機構を検討した。

## 第2節 材料と方法

### I 培養

培養神経細胞は、ニワトリ胚の終脳より調製した。終脳を胚より切り出し、メスで 1mm 角程度の大きさに刻み、0.175% trypsin (Gibco CO.LTD.)、0.007% EGTA-4Na と 10mM glucose を含むリン酸緩衝液 (PBS) 液中にて 37°C に加温し、30 分酵素処理を行った。その後、酵素液を除去し、fire polish したパスツールピペットにてゆるやかにピペッティングし解離させた。解離した神経細胞を直径 35mm の培養皿(Corning Co.Ltd.)に  $5 \times 10^5$  個の密度でまき、37 °C / 95 % CO<sub>2</sub> の環境下にて培養を行った。培養皿はあらかじめ 25µg/ml の濃度の poly-L-lysine (M.W. >300kDa, Sigma) を 30 分から一晩インキュベートし、滅菌水で浮遊して poly-L-lysine をよく洗い、完全に乾燥させたものを用いた。培養液は Minimum Eessential Medium(MEM; Gibco)に改良を加えたものを用いた。組成は Table 1 に示す。通常、培地交換は 2 日目と 5 日目に行った。

**Table 1** 培養液の組成

<b>50% Earle's minimum essential medium (MEM)</b>	
<b>40% GIT medium (Nihon seiyaku Co.Ltd.)</b>	
<b>10% Fetal cauf serum (FCS)</b>	
<b>(Supplyment)</b>	
<b>10 mM</b>	<b>glucose,</b>
<b>2 mM</b>	<b>L-glutamine</b>
<b>1 mM</b>	<b>CaCl<sub>2</sub></b>
<b>30 mM</b>	<b>NaCl</b>
<b>0.5 mM</b>	<b>sodium pyruvate</b>
<b>25 µM</b>	<b>Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub></b>
<b>0.05 mM</b>	<b>choline-Cl</b>
<b>0.05 mM</b>	<b>inositol</b>
<b>100 U/ml</b>	<b>penicillin</b>
<b>100 g/ml</b>	<b>streptomycin</b>
<b>5 g/ml</b>	<b>insulin</b>
<b>25 mM</b>	<b>HEPES-Na (pH 7.4)</b>

## II 異胚齢共培養

異なる胚齢由来の神経細胞の共培養には、E6, E8, E10 の胚を用いた。細胞の混合比は、10% : 90% (若い胚齢由来 : E10 由来) とした。E.E.Days13 と E.E.Days 17 の共培養は、E6 と E10 の終脳神経細胞を同時に培養し、E.E.Days 11 と E.E.Days 17 の場合は、E10 由来の細胞を 2 日間培養した後に、E6 由来の細胞を加え、また、E.E.Days 9 と 17 の場合には、E10 由来の細胞を 4 日間培養した後に、E6 由来の神経細胞を加えて、最終的に 7 日間培養して準備した。2 種の神経細胞を区別するために脂溶性蛍光色素を用いて、若い胚齢由来の細胞を標識した。用いた色素は PKH-26 (PKH-26 fluorescent staining kit: Zynaxis) もしくは、DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate ; Molecular Probes) である。PKH-26 を用いて細胞を染めるときは基本的には Horan らの方法に従った (Horan, et al. 1990) 。解離した神経細胞を遠心し、1ml の 5 $\mu$ M PKH-26 を含む Diluent C をゆっくりと加え、軽く懸濁し 2 分間静かに攪拌する。1ml の FSC を加え、さらに 1 分攪拌する。培養液を 2ml 加え、遠心し色素を取り除く。さらに培養液を加え再懸濁した。細胞濃度を測定し適当量にして、培養皿にまいた。

## III 電気生理学的手法

### 溶液と薬剤

通常の記事外液は次の組成である(mM) : NaCl (130), KCl (3), CaCl<sub>2</sub> (2), MgCl<sub>2</sub> (1), glucose (10), HEPES-Na (10), pH=7.3. Mg<sup>2+</sup> free 溶液においては、MgCl<sub>2</sub> を抜いたものを用いた。また GABA 作動性の抑制性シナプス後電流の混入を防ぐ際には、25~100 $\mu$ M の picrotoxin (PTX: Wako, Japan)、もしくは 100 $\mu$ M bicuculline (BCC: Sigma)を用いた。その他の用いた阻害剤等は、tetrodotoxin (TTX: Wako)、D,L-2-aminophosphonovalerate (APV: Sigma)、cyano-nitroquinoxaline-dione (CNQX, Sigma)、を用いた。

電極内液は目的に応じて次の 5 種類の組成のものを用いた(mM).

ホールセルレコーディング用 1 (KMS1) :  $\text{KCH}_3\text{SO}_4$  (130)、 $\text{KCl}$  (10)、 $\text{CaCl}_2$  (0.2)、 $\text{MgCl}_2$  (2)、EGTA (1)、Mg-ATP (2)、HEPES-K (10) (pH=7.2).

ホールセルレコーディング用 2 (CsMS5) :  $\text{CsCH}_3\text{SO}_4$  (130)、 $\text{KCl}$  (10)、 $\text{CaCl}_2$  (0.2)、 $\text{MgCl}_2$  (2)、EGTA (5)、Mg-ATP (2)、HEPES-Cs (10) (pH=7.2).

ホールセルレコーディング用 3 (CsMS0.5) :  $\text{CsCH}_3\text{SO}_4$  (130)、 $\text{KCl}$  (10)、 $\text{CaCl}_2$  (0.2)、 $\text{MgCl}_2$  (2)、EGTA (0.5)、Mg-ATP (2)、HEPES-Cs (10) (pH=7.2).

ホールセルレコーディング用 4 (ATP-KMS) :  $\text{KCH}_3\text{SO}_4$  (105)、 $\text{KCl}$  (17.5)、 $\text{CaCl}_2$  (0.2)、 $\text{MgCl}_2$  (2)、 $\text{NaCl}$  (8)、 $\text{Na}_2\text{-ATP}$  (2)、 $\text{Na}_3\text{-GTP}$  (0.3)、phosphocreatine (20)、creatine phosphokinase (50U/ml)、EGTA (1).

パーフォレイトホールセルレコーディング用 (NyK) :  $\text{KCl}$  (140)、 $\text{CaCl}_2$  (0.2)、 $\text{MgCl}_2$  (2)、EGTA (1)、HEPES-K (10)、nystatin (0.1) (pH=7.2).

ATP-KMS 溶液は、ATP 依存的な細胞内機構の rundown を防ぐために、ATP 再構成系を加えた。シナプス前細胞にホールセルレコーディング法を適用すると、細胞内を灌流のためシナプス伝達の rundown が生じた (以下、シナプス前細胞、後細胞を同時にホールセルレコーディングすることを、デュアルホールセルレコーディングと記す)。ATP-KMS 溶液を用いた際には、この rundown をある程度防ぐことができた(結果省略)。さらに完全にこの細胞内灌流を防ぐためにパーフォレイトホールセルレコーディング法をシナプス前細胞に適用した。DMSO に溶解した 100mM の nystatin (Sigma)を ストック溶液とし、使用直前に最終濃度 100 $\mu\text{M}$  となるように電極内液に溶かした。パッチ電極の先端から 100 $\mu\text{m}$  程度 nystatin-free 溶液をつめ、後端より NyK 溶液をつめた。ギガオームシールのセルアタッチ状態をつくった後に、過分極方向に 10mV の矩形波を 0.1Hz で加えながら数分から十数分待つと、十分な容量性電流が見られはじめ、脱分極刺激を加えると十分な Na-spike を引き起こすことができるようになる。この場合には 1 細胞由来のシナプス後電流の

rundown は見られず、シールが安定した場合には、1 時間以上にわたって記録が可能であった。EGTA の濃度は、実験の目的に応じて 0.5~5mM まで変えたものを用いた

### 刺激と記録

用いた記録電極は GD1.5(thick wall)(Narishige,Japan)で、微小電極作成装置(PP-83,Narishige)を用いて先端径 1 $\mu$ m 程度のものを作成した。電極内液をつめた状態で電極抵抗は 4~7M $\Omega$  であった

600 倍倒立顕微鏡(IMT-2,Olympus) 下にて、ホールセルレコーディング法をシナプス後細胞に適用した(Hamill, et al. 1981)。パッチ電極を液面につけ界面電位を補正した。細胞に接触させた後軽く吸引しギガオームシールを形成させた。このときに電極の容量性分を補正した。信号は CEZ-2300 (Nihon Koden; Japan)を用い電流電圧変換し増幅し、1kHz の低域ろ波フィルターを通して、pClamp6、axotape (Axon; USA)のデータ取得プログラムを用いて記録した。サンプリング周波数は、evoked EPSC を記録する際は 20kHz で、SSC、Mini の時は 5kHz または event trigger mode にて 20kHz で行った。電極の記録中のシリーズ抵抗をモニターするために、5 から 10mV の過分極パルス( $V_{step}$ )を加えた。記録終了後に、5-10 回の平均ステップ応答より 90%-10%の減衰時間( $T_D$ )、定常状態の電流( $I_m$ )、充電した電荷( $Q$ )を実測し、細胞の膜容量( $C_m$ )、膜抵抗( $R_m$ )、シリーズ抵抗( $R_s$ )を推定した。この際に、細胞を 1 つの容量性分で近似した。

$$R_s = V_{step}T_D / \ln 9 \times Q$$

$$R_m = V_{step} / I_m$$

$$C_m = Q / V_{step}$$

1 つの神経細胞由来の evoked EPSC を記録するためにシナプス前細胞と後細胞を同時にホールセルレコーディング法を用いた (デュアルホールセルレコーディング法)。上述の通り、シナプス前細胞にホールセルレコーディング法を適用する

と EPSC の振幅の rundown が生じ、安定した記録がとれなかった。そこでこの問題を解決するために次の方法をとった。1 つは、細胞外刺激電極を用いる方法、2 つめは、ATP 再構成系の入った電極内液を用いる方法、3 つめは、perforate whole cell recording 法を使うことである。細胞外刺激電極法は、先端径 8-12 $\mu\text{m}$  の記録外液が入ったガラス電極を、シナプス前細胞と思われる細胞に軽く押しつけ、duration が 200-500 $\mu\text{s}$  で 20-50 $\mu\text{A}$  の電流を流し刺激する方法である。刺激電極先端をわずかに動かすことにより、反応が消失することより、この方法はほぼ確実に 1 つの神経細胞を刺激することが可能である。しかしながら、10 分以上に安定して記録を行うことは、困難であった。ATP 再構成系を用いる方法は、ホールセルレコーディング状態になってから、およそ 5-10 分まで EPSC の rundown が見られ、その後安定するが徐々に減少してしまう。パーフォレイトホールセルレコーディング法は、成功すれば安定した記録が得られるが、記録を得られる状態になるまで時間がかかる方法である。以上のメリット、デメリットを考慮して、長時間に安定した記録をとるために次の手続きをとった。

- i. 1 つの神経細胞をホールセルレコーディングし、電位固定する。
- ii. 局所細胞外刺激電極で、シナプス入力している神経細胞を顕微鏡下にて探す。
- iii. シナプス前細胞が特定できたら、 $\text{NyK}$  が充填されているパッチ電極を用い、パーフォレイトホールセルレコーディングを行った。
- iv. 十分な容量性電流がシナプス前細胞において確認できた後、evoked EPSC の記録を始める。

#### evoked EPSC と SSC の解析

立ち上がり時間( $T_R$ )、減衰時間 ( $T_D$ )、peak amplitude は pClamp6、axonograph (axon instrument)を用いて半自動的に決めた。 $T_R$ 、減衰時間は EPSC の振幅の 10%から 90%の大きさになるのにかかる時間とした(詳細なアルゴリズムに関しては、pclamp6 の manual)。SSC や Mini は目でみて peak を判断した。その記録時のノイズに依存するが基本的に振幅が 5pA 以上のものを計測した。特記しない限りデー

タの表記は、平均値±標準誤差 (標本数)である。

### グルタミン酸投与

グルタミン酸応答を記録するために、N<sub>2</sub>ガス圧式インジェクター (picopump, WPI) を用いて、ホールセルレコーディングした神経細胞に、または、out-side out patch したものに対して、グルタミン酸投与を行った。A/K-R はすぐに脱感作するので流れのある灌流液中にて行えるように実験を配置した (Fig. 14a)。100μM-1mM のグルタミン酸を先端径 5-10μm の投与用電極に充填し、先端径 50-100μm の灌流用電極から、50cm の高さから自由落下により流れる記録外液の流れの中に、細胞、もしくは out-side out patch したものを配置し、2~5psi の圧力で刺激幅 5-50ms の投与を行った。

## IV 免疫化学的組織染色

Banker らの方法に従った (Banker and Goslin 1991)。培養基質としてカバーガラスを用いた (matunani, No1, O.D.=18,22mm)。培養する前に、濃硫酸で 48 時間洗浄、その後水酸化ナトリウムにて中和し、さらに 1 N の水酸化ナトリウム中にて 24 時間放置、ミリ Q 水でよく洗浄した。その後、オートクレーブして使用した。1mg/ml の poly-L-lysine で 1 晩コートして、洗浄、乾燥後に使用した。細胞を培養後、4% ホルマリンを含むリン酸緩衝液にて固定した。室温で 1 時間もしくは 4℃ で 1 晩放置して、リン酸緩衝液にて洗浄した。10% 牛血清を含むリン酸緩衝液でブロッキングを 1 時間して、1 次抗体と 0.5% Triton を含むリン酸緩衝液を入れ、4℃ で 1 晩放置した。リン酸緩衝液でよく洗浄し 2 次抗体をいれ 3 時間後、余分な 2 次抗体をよく洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。対象実験として、1 次抗体なしの試料を用意して比較した。用いた抗体は抗グルタミン酸受容体 1 抗体 (2μg/ml) と抗 NMDA-R 1 抗体 1μg/ml (共に Chemicon International INC.) をもちいた。これらの抗原はクローニングされた配列をもとにして合成したペプチドを抗原としたものである。2 次抗体は FITC で標識した抗ウサギ抗体 (Jackson INC.) を用いた。以下にペプチド抗体の抗

原配列を以下に示す.

**GluR1**

**Sre-His-Sre-Sre-Gly-Met-Pro-Leu-Gly-Ala-Thr-Gly-Leu**

**NR1**

**Leu-Gln-Asn-Gln-Lys-Asp-Thr-Val-Pro-Arg-Arg-Ile-Glu-  
Arg-Glu-Glu-Gly-Gln-Leu-Glu-Leu-Cys-Ser-Arg-His-Arg-  
Glu-Ser**

## 第3節 結果

### I E.E.Days 17 の神経細胞におけるデュアルコンポーネントシナプス

E.E.Days 17 の神経細胞が、デュアルコンポーネントシナプスで伝達を行っているかを確認した。この実験は抑制性の GABA 作動性シナプス入力の混入を防ぐため 25 $\mu$ M の picrotoxin を記録外液中に存在させた。一つの神経細胞をホールセルレコーディングし、膜電位固定した。対物 40 倍の顕微鏡下において、周囲の神経細胞を局所細胞外刺激電極で刺激し、興奮性シナプス入力をしている神経細胞を探した。典型的な興奮性シナプス後電流を Fig. 1a に示す。1つのシナプス前細胞を 10 秒間隔で刺激しながら、シナプス後細胞の膜電位を -60、-40、-20、0、20、40、60mV に変化させ evoked EPSC を記録した。Evoked EPSC は、負の膜電位で 1ms 程度の立ち上がり時間と 3ms 程度の減衰時間を持ち、正の膜電位では、これに遅い減衰時間成分の電流が加算された波形で、減衰時間が 50ms 以上に及ぶものであった。これは今までの報告と同じような時間応答と膜電位依存性を示すものであり、明らかに A/K-R と NMDA-R を持つデュアルコンポーネントシナプスにおける応答であると考えられる。A/K-R 成分は刺激後 4.8ms、NMDA-R 成分は 14ms 後の振幅として図示した(Fig. 1b)。しかし、本実験系は解離培養系であるため、シナプス前細胞と後細胞の細胞種を特定できない。不特定の神経細胞からのシナプス入力が予想される。そこで、巨視的に入力しているシナプスの性質を観るために SSC を測定した(Fig. 2, 3)。-60mV に電位固定した1つの神経細胞では、SSC の立ち上がり時間はおよそ 1 から 2ms の分布にあり、平均で  $1.55 \pm 0.271$ ms (mean $\pm$ S.E.) (n=46) であり、また decay time は、2 から 50ms の分布を持ち、平均で  $13.21 \pm 1.774$ ms (n=46) であった。この立ち上がり時間は evoked EPSC と大差ないのもである。さらに +60mV に電位固定し SSC を記録したところ、立ち上がり時間は負に電位固定した時に観測されるものとおよそ同じ程度であるのに対して、減衰時間が大きく数百 ms 程度の波形になった。次にこの大きな減衰時間を持つ波形が NMDA-R 由来の電

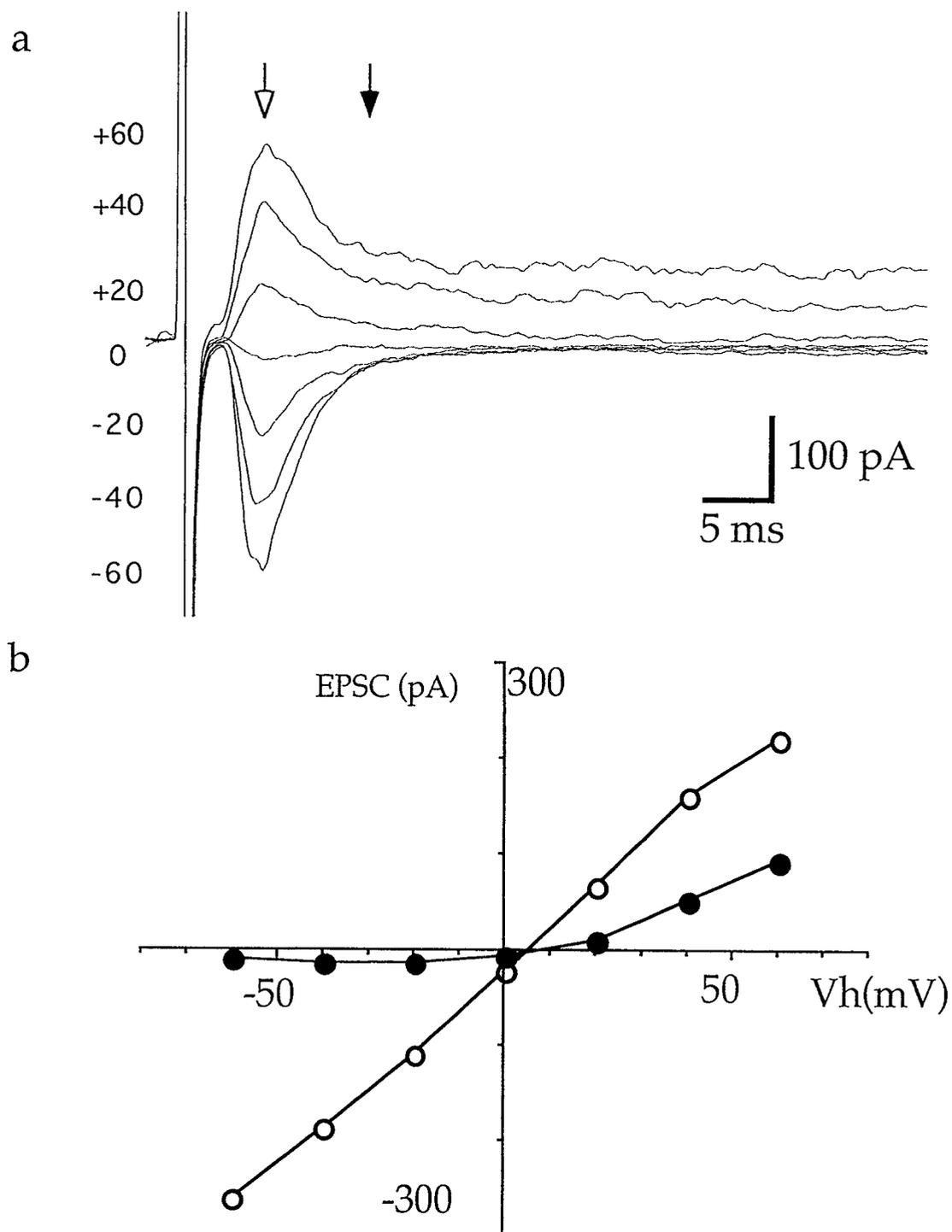


Fig. 1 E.E. Days 17の神経細胞におけるデュアルコンポーネントシナプス I evoked EPSCs の典型例

- 1つのシナプス前細胞の局所刺激によるシナプス後応答の典型例. シナプス後電位を-60、-40、-20、0、+20、+40、+60mVに固定したときのEPSCsを重ね書きしたもの. 各トレースは5回の刺激を平均した.
- A/K-R成分(刺激から8ms:○)とNMDA-R成分(刺激から15ms:●)の電流電圧関係

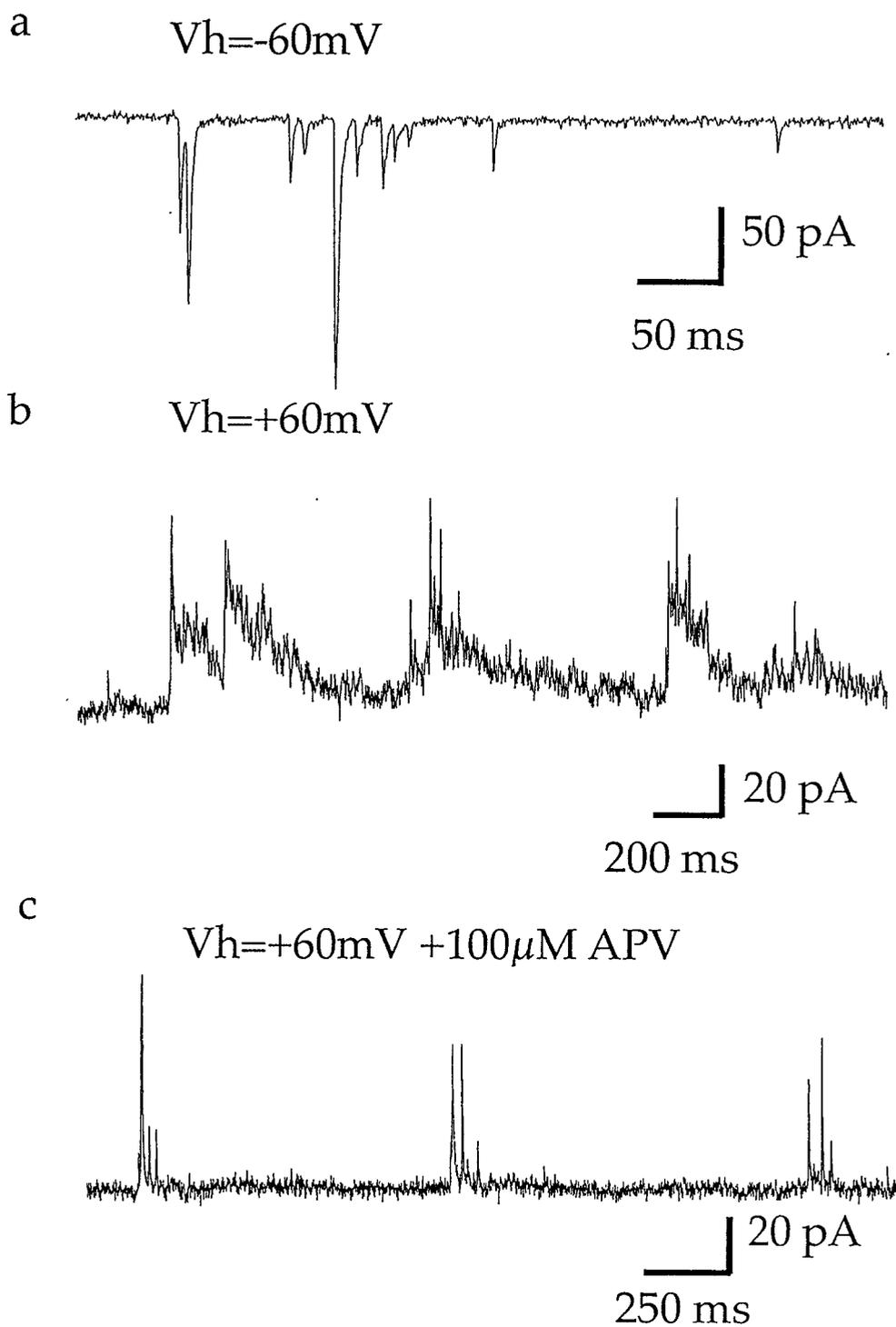


Fig. 2 E.E.Days 17 の神経細胞におけるデュアルコンポーネントシナプス II SSCs の典型例

- a. シナプス後細胞を $-60\text{mV}$ に電位固定
- b. シナプス後細胞を $+60\text{mV}$ に電位固定
- c. b.の状態に記録外液に  $100\mu\text{M}$  の APV を加えた  
(すべて同一の神経細胞からの記録である)

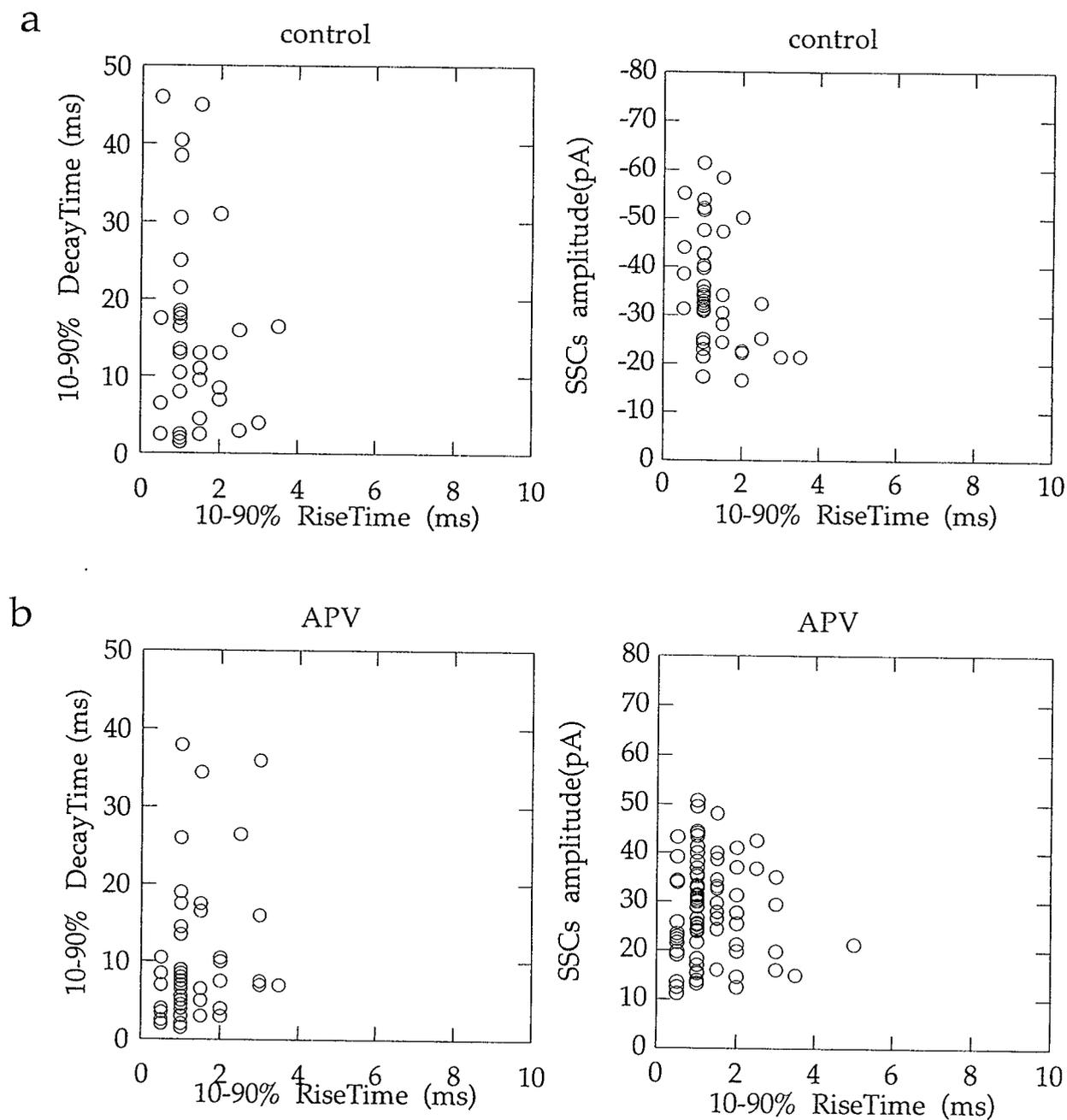


Fig. 3 E.E.Days 17の神経細胞における SSCs の rise time と deacey time の関係  
 a. コントロール (固定膜電位-60mV)  
 b. 細胞外液に 100 $\mu$ M の APV 存在時 (固定膜電位+60mV)  
 (すべて Fig. 2 の神経細胞と同じ記録である)

流であるかを確認するために、APVによる阻害実験を行った。100 $\mu$ MのAPVを記録用外液に加えた。大きな減衰時間を持つ波形は消失し、速い立ち上がり時間(2.37 $\pm$ 0.350; n=66)と減衰時間(22.3 $\pm$ 3.49ms; n=66)をもつ波形となった。CNQXを記録用外液に加えた場合にはSSCは全く観測されなかった。また他の神経細胞においてもSSCの波形は同様の電位依存性を示した。このことは、E.E.Days 17の神経細胞に入力しているグルタミン酸作動性シナプスは両方の受容体を持っているものと考えられる。

神経細胞は通常、神経支配をする際に複数の神経終末を持つ。上記の evoked EPSC もしくは、SSC はシナプス前細胞が活動して惹起されるシナプス後応答である。それ故に evoked EPSC もしくは、SSC の応答よりデュアルコンポーネントシナプスであると判断できても、各神経終末においてもデュアルコンポーネントシナプスであるかは判断できず、2つの可能性が考えられる。1つは A/K-R のみ、もしくは NMDA-R のみの受容体しか持たない各神経終末によって構成されている可能性。2つめは A/K-R と NMDA-R の両方の受容体を持つ神経終末によって構成されている可能性である。そこで、シナプス前細胞の活動に依存しない Mini を用いた。記録外液に 1 $\mu$ M TTX 存在下、-60mV 膜電位固定下において Mini を記録し、さらに NMDA-R を活性化するために記録外液より Mg<sup>2+</sup> を抜いて記録した(Fig. 4)。Mg<sup>2+</sup>-free の記録外液で観測される Mini はコントロールよりもなだらかな波形となり、大きな減衰時間を持っていた。さらに記録外液に APV を加えると、この波形の変化はほぼコントロールで観測されたものに戻った(Table 2)。以上のこと Bekker らの報告 (Bekker and Steven 1989)を考慮するとは E.E.Days 17 の神経細胞の培養では観測されるほとんどのグルタミン酸作動性シナプスには、各神経終末において A/K-R と NMDA-R の両方を持つデュアルコンポーネントシナプスであることをが考えられる。

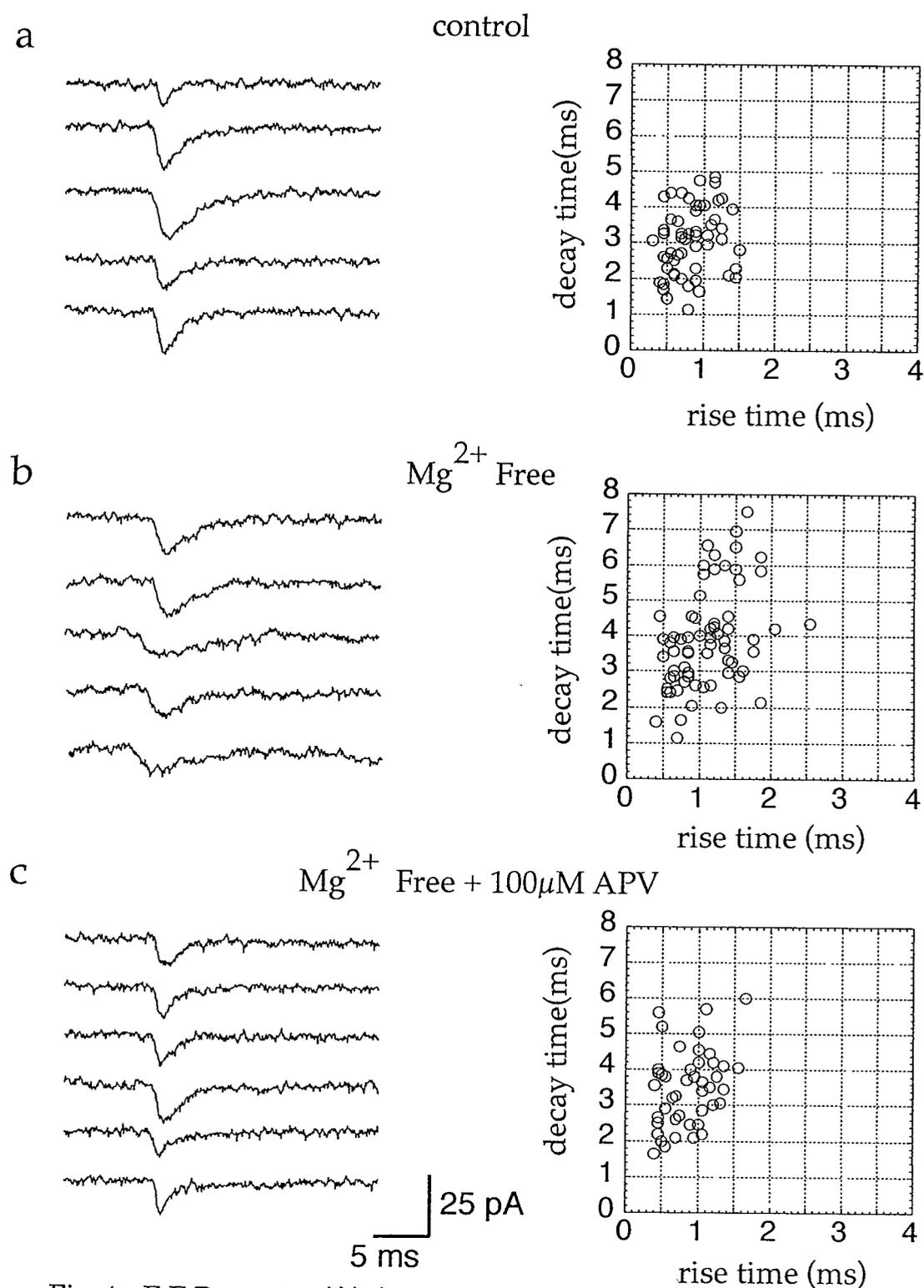


Fig. 4 E.E.Days 17 の神経細胞におけるデュアルコンポーネントシナプスⅢ Minis の典型例

- a. コントロール (-60mV に電位固定)
- b. 細胞外液より  $Mg^{2+}$  を除去した
- c. b. の状態に記録外液に  $100\mu M$  の APV を加えた  
(すべて同一の神経細胞からの記録である)

**Table 1** Mini の波形解析

立ち上がり時間 と減衰時間の NMDA-R の活性化と阻害時における関係  
表示は平均±標準偏差 (標本数) を表す.

	コントロール	Mg <sup>2+</sup> -Free	Mg <sup>2+</sup> -Free +APV
立ち上がり時間(ms)	0.809±0.038(n=70)	1.11±0.05(n=79)	0.889±0.050(n=57)
減衰時間(ms)	2.786±0.130(n=70)	3.72±0.170(n=79)	3.12±0.172(n=57)

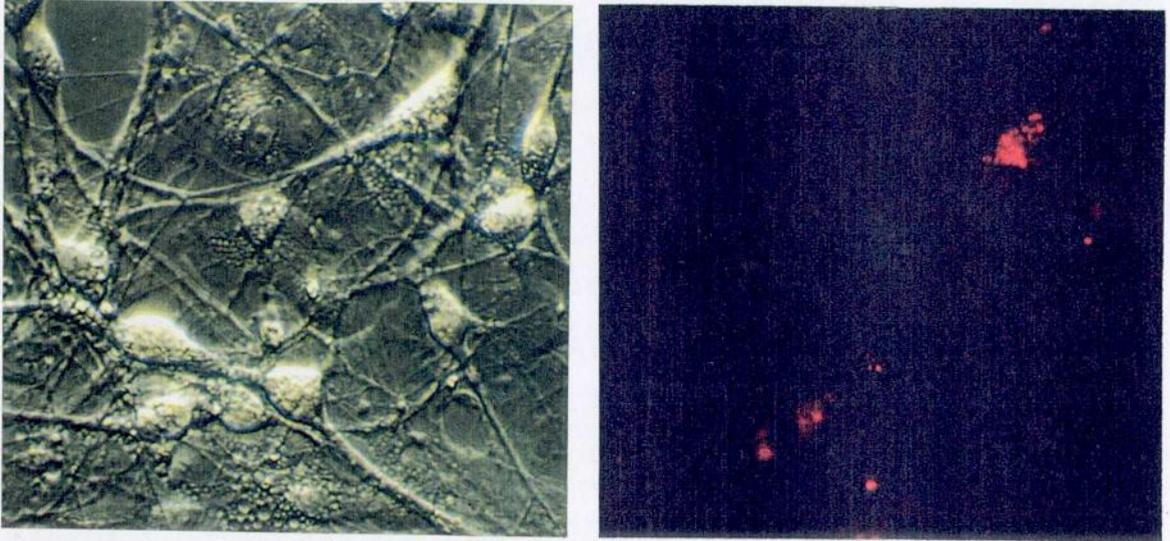
## II グルタミン酸シナプス形成とシナプス後細胞の成熟

我々は以前にグルタミン酸作動性、GABA 作動性の SSC の振幅、頻度の変化より、この培養系においてシナプス形成が E.E.Days に応じて起きていることを報告した(Tokioka, et al 1993). SSC は E.E.Days 13 より現れ、E.E.Days 15 から 17 にかけて急激に大きくなる. このこと実は E.E.Days 13 と E.E.Days 17 の神経細胞でシナプスを形成する能力の成熟度に差があることを示唆する. シナプス形成におけるシナプス後細胞としての成熟度がどのような影響を持つかを調べた.

シナプス後細胞依存的なシナプス形成であるかどうかを調べるために、異胚齢共培養を用いた. この共培養には、十分な E.E.Days 17 の神経細胞(90%)と少量の E.E.Days(10%)の若い神経細胞を培養した. E.E.Days 17 の神経細胞は SSC がすべての細胞で頻度よく観測されることより十分にシナプス前細胞としてまたシナプス後細胞として成熟していると考えられる. そこに少量の未成熟の神経細胞を培養すれば、この神経細胞で観測されるシナプス後応答はシナプス後細胞としての成熟度を反映することが考えられる.

E.E.Days 13 の神経細胞は培養時に脂溶性の蛍光色素 PKH26 で標識し、E.E.Days 17 と E.E.Days 13 の共培養を行った. アッセイ時の神経細胞は Fig. 5 のように見え、十分に判別できた. これら E.E.Days 17 と E.E.Days 13 の神経細胞にデュアルホールセルレコーディング法を適用し、膜電位は-40mV に固定して SSC を

a



b

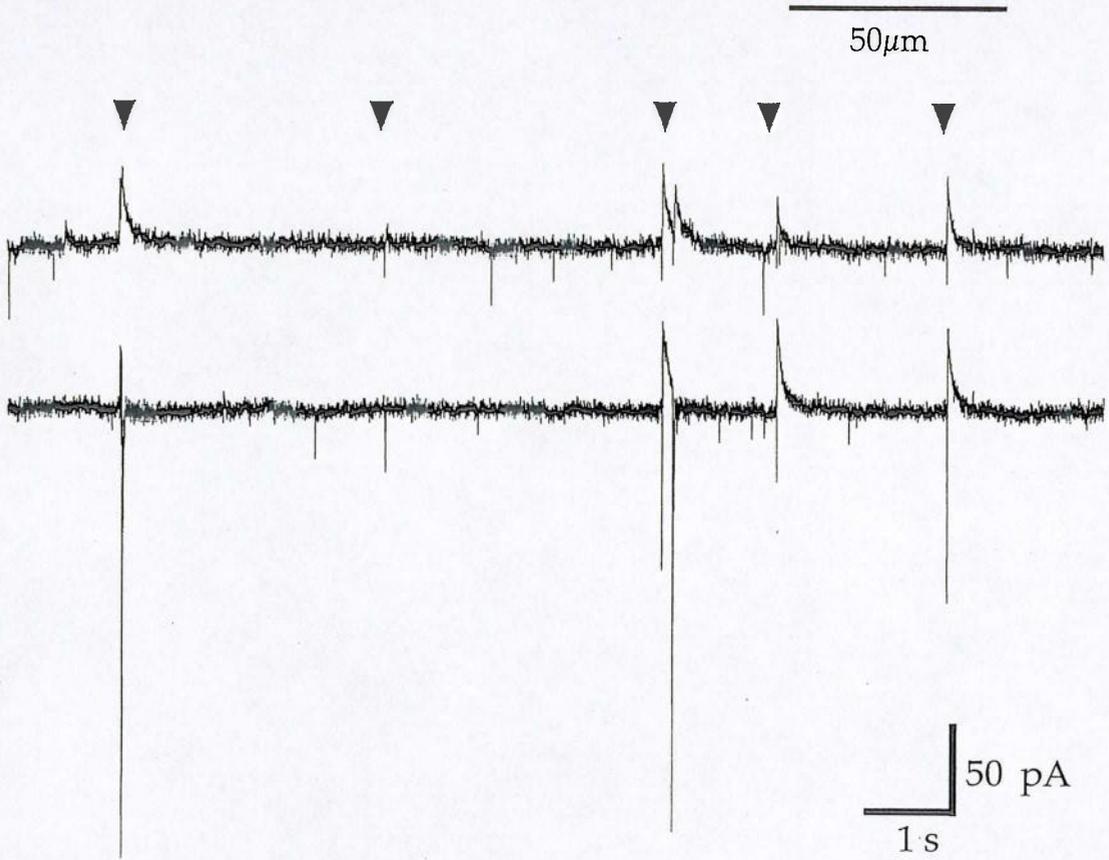


Fig. 5 異胚齢共培養 I

E.E.Days 17 と E.E.Days 13

- a. (左) 培養細胞の明視野像 (600 倍)、(右) 蛍光像、E.E.Days 13 の神経細胞を PKH26 で染色してある (赤色). スケールは  $50\mu\text{m}$  である.
- b. ペアで記録された SSCs の振幅の偏り  
(上) E.E.Days 13 の神経細胞からの記録、(下) E.E.Days 17 の神経細胞からの記録、共に固定電位は  $-40\text{mV}$ .

記録した。細胞内外のイオン組成より Cl 電流は外向き電流として観測される。Fig. 5b のような SSC が頻度よく観測された。グルタミン酸作動性と GABA 作動性の SSC がそれぞれ内向き電流、外向き電流として同期して観測された(矢印)。SSC は、E.E.Days 17 と 13 両方に同期して見られたが、その振幅に差が認められた。そこで、この SSC を 3 分間記録し、振幅、頻度を計測した(Fig. 6)(以下単純に振幅と表示しているものはピークの大きさである)。グルタミン酸作動性の SSC の振幅は E.E.Days 17 には  $127.5 \pm 6.96 \text{ pA}$  ( $n=125$ )、E.E.Days 13 には  $28.47 \pm 2.48 \text{ pA}$  ( $n=65$ ) であり、その差は明らかであった(un-paired t-test:  $p < 0.001$ )。しかしながら GABA 作動性 SSC の振幅は、E.E.Days 17 には  $35.89 \pm 1.89 \text{ pA}$  ( $n=40$ )、E.E.Days 13 には  $32.01 \pm 1.06 \text{ pA}$  ( $n=80$ ) であり、差は無かった。さらにこのシナプス形成を定量し検討するために Max SSC と INPUT SSC を用いた。Max SSC は 3 分間の記録中に観測される SSC の中の最も大きな振幅を表し、また、INPUT SSC は記録されたすべての SSC の振幅とその回数をかけたものを表す。69 ペアの神経細胞に対して SSC の大きさを評価した。結果は前述のものと同じ傾向でグルタミン酸作動性シナプス形成度には差があるが GABA 作動性シナプス形成には差がないことを示す結果を得た。その内の 20 例を Fig. 7 に示した。また単純に Max SSC と INPUT SSC を比較した(Fig. 8)。やはり傾向は同じで統計的にも有意であった(Max SSC では  $p < 0.001$  [E.E.Days 17 (N=77) vs. 13 (N=75)] , INPUT SSC では、 $p < 0.05$  [E.E.Days 17 (N=84) vs. 13 (N=75)] Mann-Whitney's U-test)。以上のことは、E.E.Days 13 の神経細胞が GABA 作動性シナプスの形成能力に関しては同程度であるのに対し、グルタミン酸作動性シナプスの形成能力に差があることを示唆している。

この差がシナプス後細胞としての成熟の差を反映しているのであれば、より E.E.Days の若い神経細胞はよりグルタミン酸作動性シナプスをつくる能力が少ないことが予想される。そこでもっと若い E.E.Days の神経細胞を用いてグルタミン酸作動性シナプス形成度を Max SSC で評価した(Fig. 9)。E.E.Days 9、11 を用いて実験を行ったところ、E.E.Days 13 のものより小さなシナプスコンダクタンスを持つことが明らかとなった。ただし E.E.Days 9 と 11 においては全く SSC が見

Fig. 6

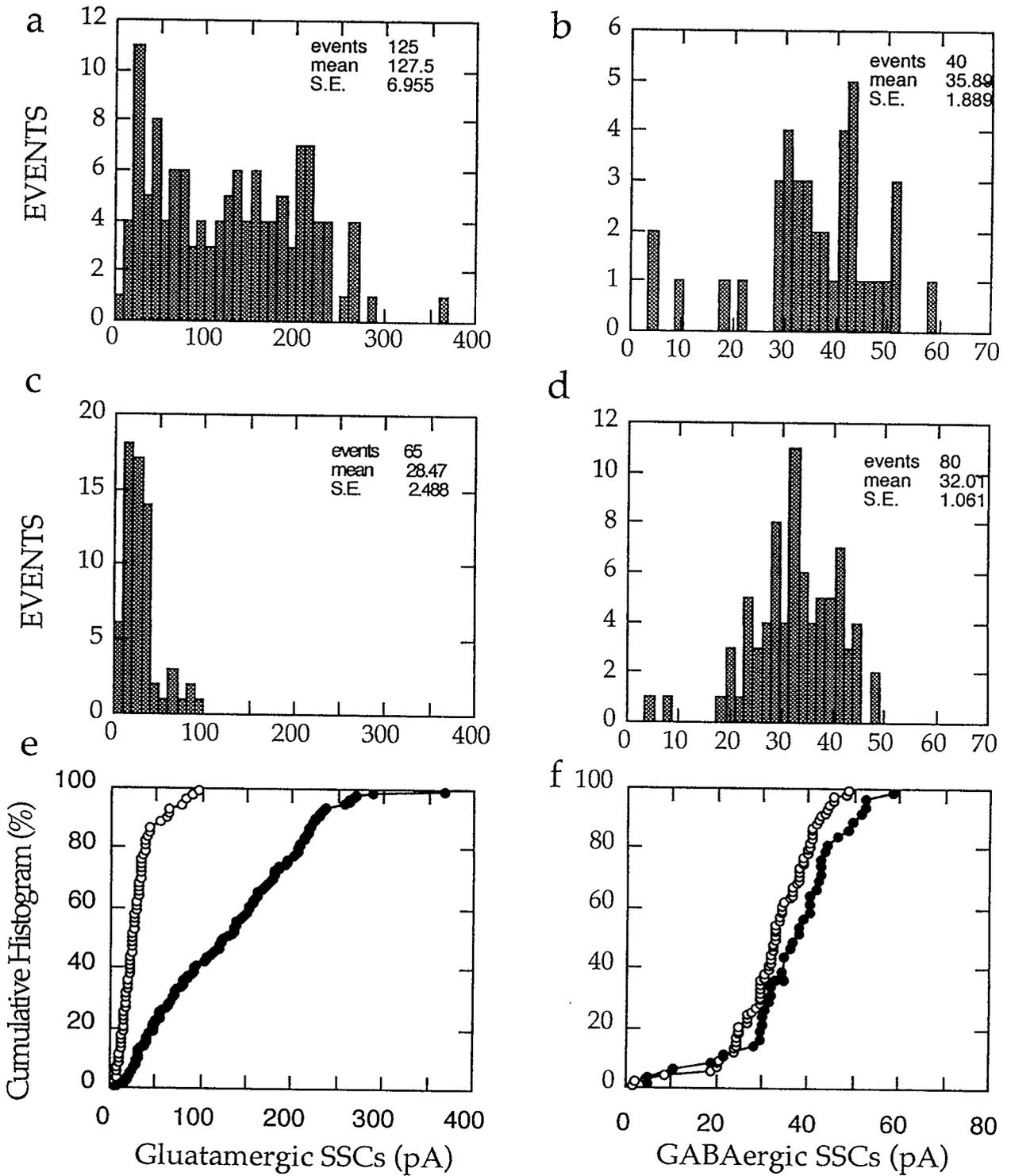


Fig. 6 E.E.Days 17 と E.E.Days 13 における SSCs の解析

a, c, e はグルタミン酸作動性 SSCs、b, d, f は GABA 作動性 SSCs.

a, b は E.E.Days 17 細胞由来のデータ、b, c は E.E.Days 13 細胞由来のデータ

c, f はそれぞれの SSCs の振幅の累積ヒストグラム. E.E.Days 17(●),13(○)

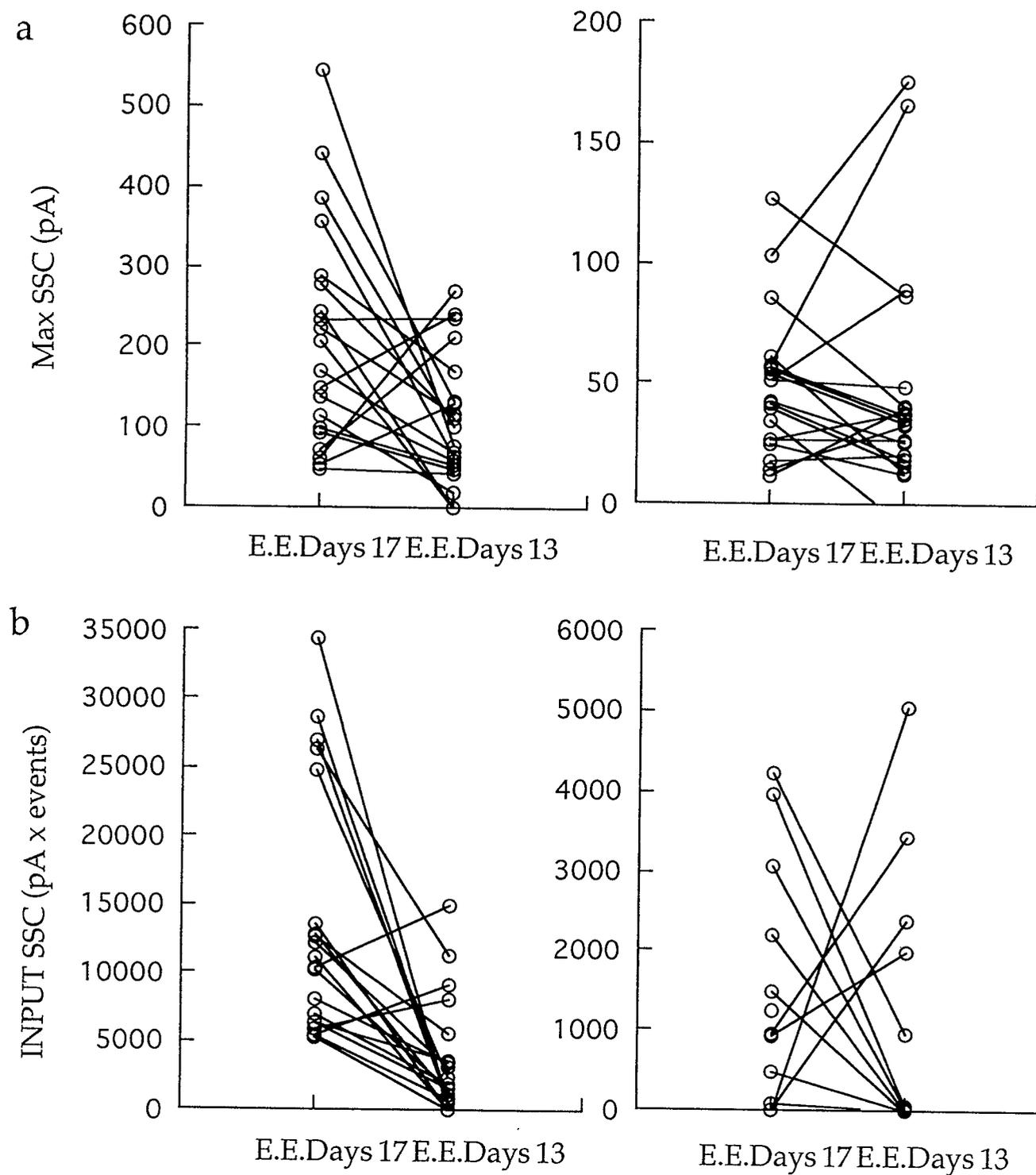


Fig. 7 ペアで記録された SSCs の Max SSC と INPUT SSC を用いた評価  
(20 ペアの神経細胞から得た記録)

- a. Max SSC、(左) グルタミン酸作動性 SSCs、(右) GABA 作動性 SSCs  
b. INPUT SSC (pA x events)、同上、

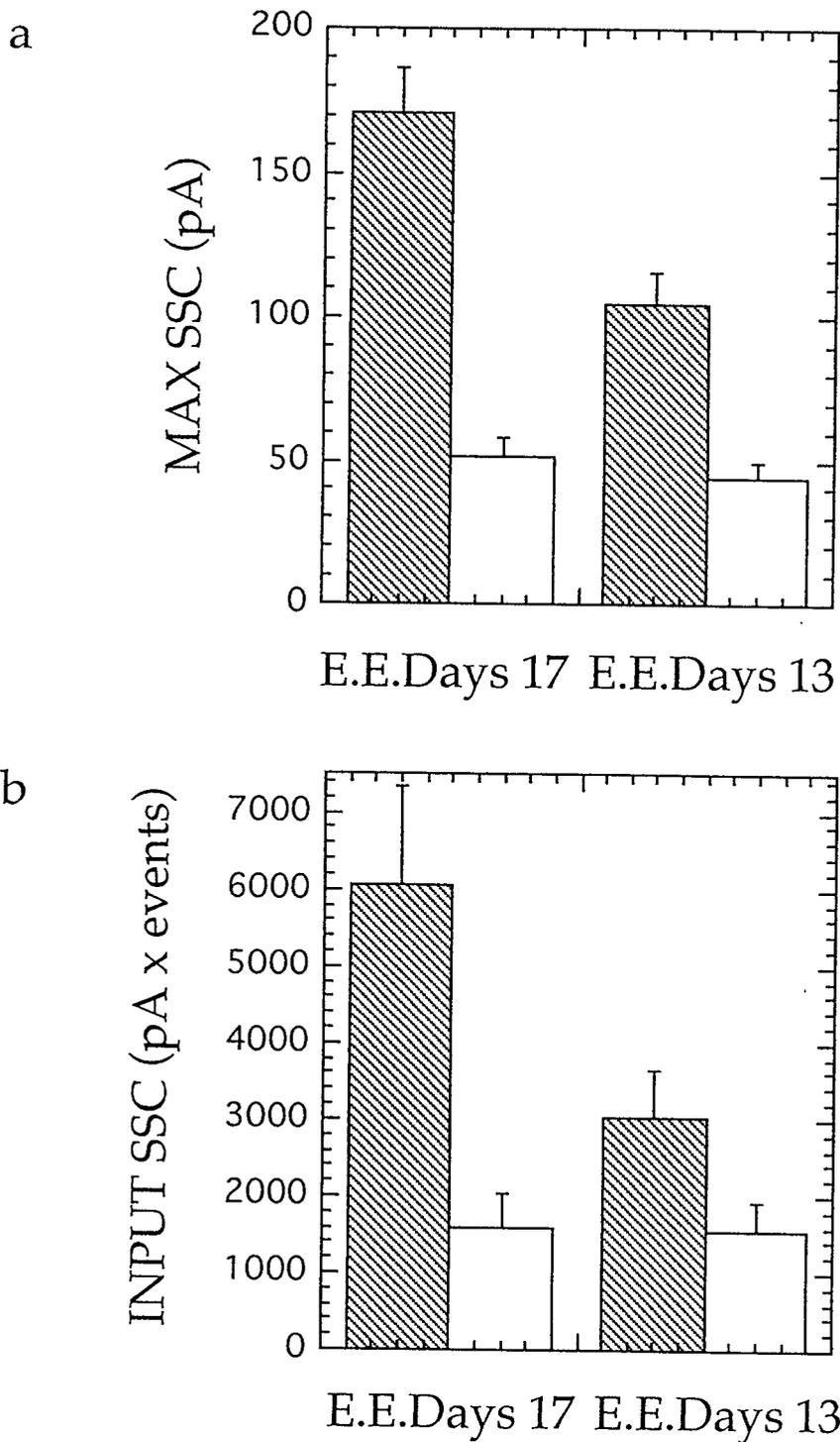


Fig. 8 SSCs の Max SSC と INPUT SSC を用いた評価

a. Max SSC、 E.E. Days 17 (N=77) vs. 13 (N=75)

b. INPUT SSC (pA x events)、 E.E. Days 17 (N=84) vs. 13 (N=75) 、  
 斜線のカラム：グルタミン作動性 SSCs、空のカラム：GABA 作動性 SSCs

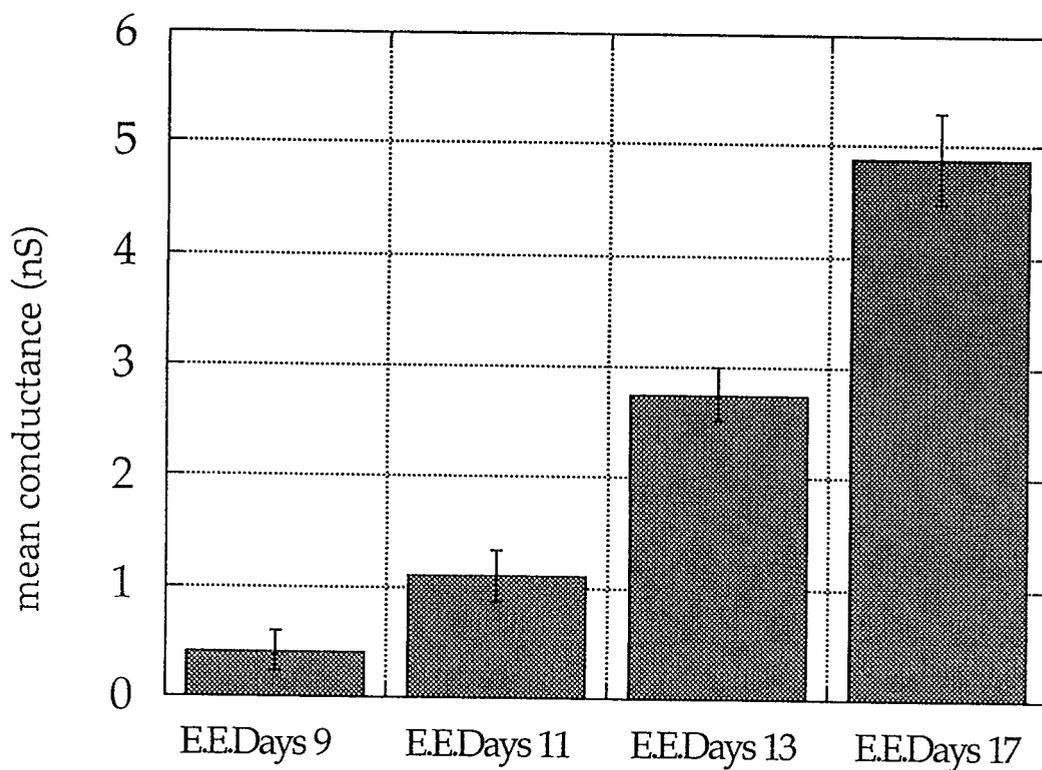


Fig. 9 グルタミン作動性シナプスの E.E.Days に依存したシナプス形成 Max SSC の平均コンダクタンスを示している. E.E.Days 9 (n=6)、11 (n=19)、13 (n=75)、17 (n=105)の平均と標準誤差を表示. ただし E.E.Days 9 と 17 は-60mV で記録した.

られないことが多く、その場合の記録は含んでいない。よって、E.E.Days 9 と 11 のグルタミン酸作動性シナプスの形成はずっと少ないと考えられる。これはやはりグルタミン酸作動性シナプスの形成能力が、少なくとも E.E.Days 11 から 17 の成熟で異なることを示すこと実である。

以上のことは2つのことを示唆する結果である。第一に、シナプス後細胞の成熟度によりシナプス形成が制御されていること。第二に、グルタミン酸作動性、GABA 作動性シナプスで形成に必要とされる成熟が異なり、そのタイミングも異なること。

### III E.E.Days 11 における NMDA-R のみを持つシナプスの形成

主に A/K-R を介する SSC を基に、グルタミン酸作動性シナプス形成能力が、少なくとも E.E.Days 9 から 17 で異なることを明らかにしたが、このグルタミン酸作動性シナプスは E.E.Days 9、11、13 においてもデュアルコンポーネントシナプスであろうか。この実験は抑制性の GABA 作動性シナプス入力の混入を防ぐため 25 $\mu$ M の picrotoxin を記録外液中に存在させた。

E.E.Days 11 と 17 の共培養にホールセルレコーディング法を適用した (Fig.10)。電極内液は CsMS5 を用いた。-60mV に膜電位固定下にして SSC を記録すると、E.E.Days 17 の神経細胞に頻度よく SSC が見られるに対して、E.E.Days 11 の神経細胞ではしばしば全く SSC が見られないことがあった(8/30)、またわずかに Mini 程度の振幅を持ったものしか見られないものもあった(10/30)。しかしながら、これらの細胞の膜電位を+60mV にすると E.E.Days 11 の神経細胞にも十分な SSC が観測された(16/18)。観測された SSC を解析した(Fig. 11)。この脱分極時に見られる SSC は立ち上がりの遅いものばかりであり、E.E.Days 17 が  $1.92 \pm 0.124$ ms (n=65) に対して、E.E.Days 11 では  $25.6 \pm 0.961$ ms (n=62) と 10 倍以上遅いものであった。また減衰時間は、E.E.Days 17 で  $40.83 \pm 5.17$ ms (n=38)、E.E.Days 11 では、 $86.0 \pm 6.00$ ms (n=60) であった。また、この E.E.Days 11 に見られる SSC は、遅い立ち上がり時間

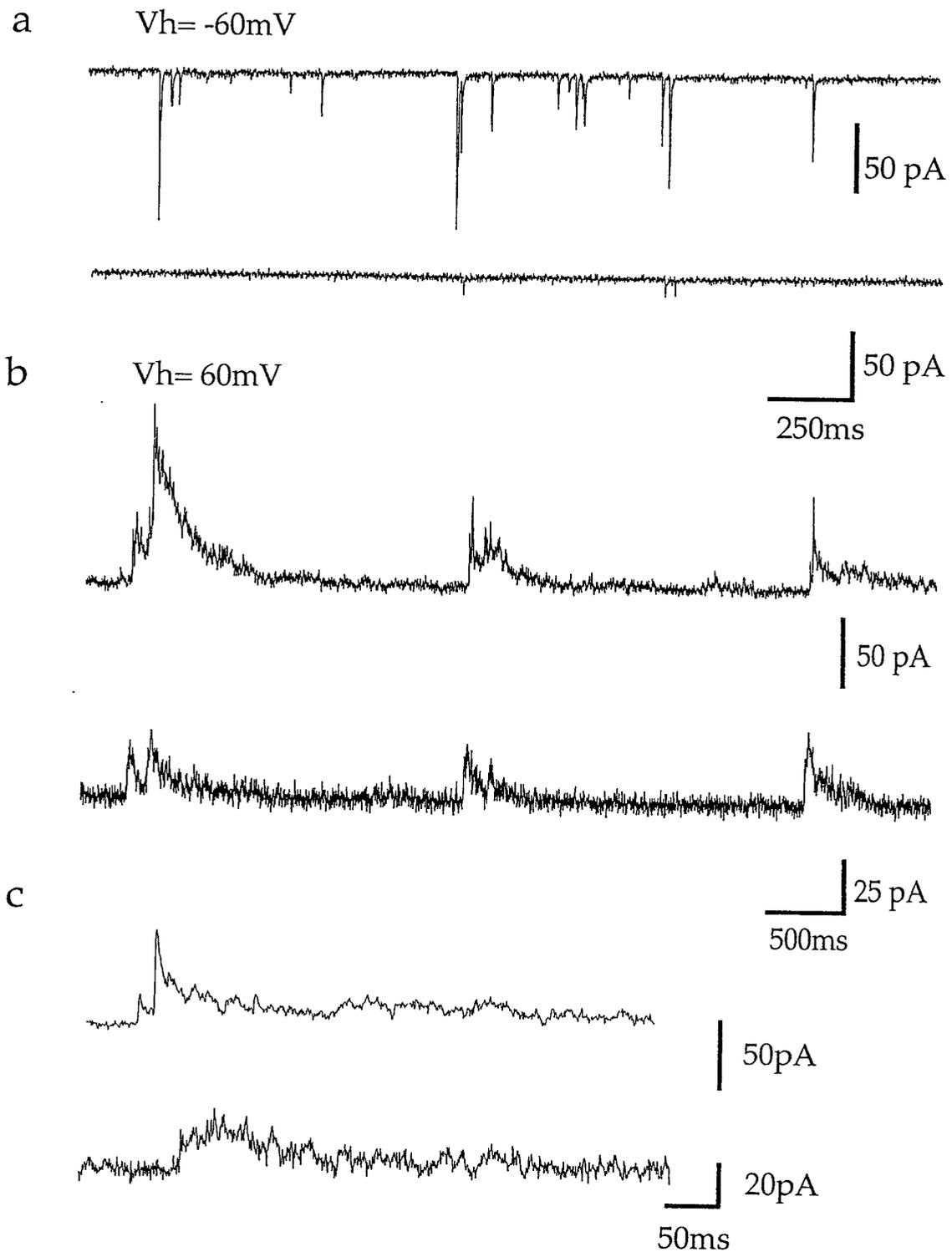


Fig. 10 異胚齢共培養II

E.E.Days 17 と E.E.Days 11 における SSCs

- a. シナプス後細胞を $-60\text{mV}$ に電位固定
- b. シナプス後細胞を $+60\text{mV}$ に電位固定
- c. b.の状態を拡大したもの

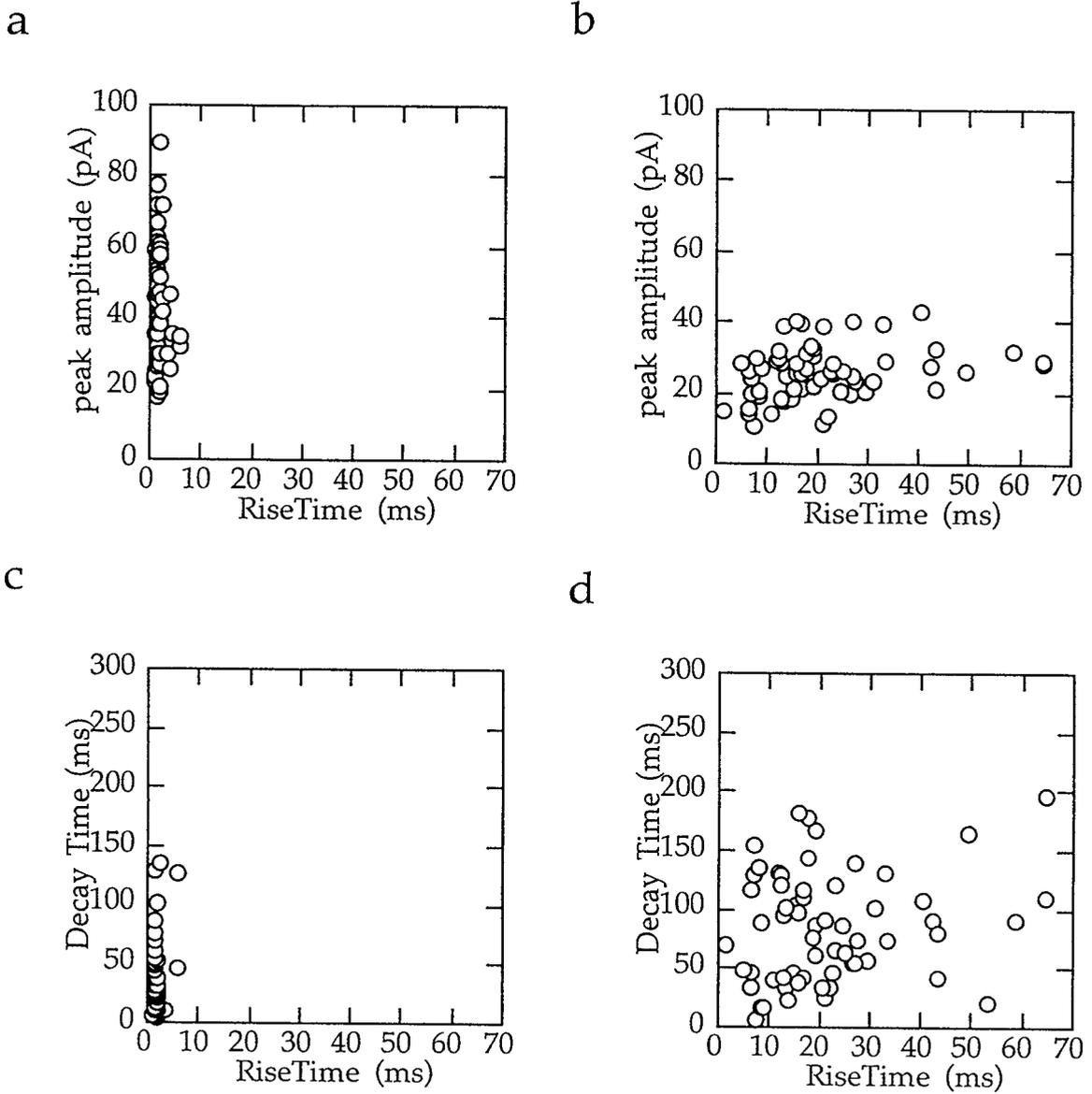


Fig. 11 E.E.Days 17 と E.E.Days 11 における SSCs の波形解析

a, c. E.E.Days 17 由来の SSCs、b, d E.E.Days 11 由来の SSCs  
 a, b. rise time と振幅の関係、c, d. rise time と decay time の関係  
 記録は Fig. 10 と同じ細胞である

と、長い減衰時間を持つ特徴は、NMDA-R を介する電流であることが予想された。そこで APV による阻害実験を行った(Fig.12)。100 $\mu$ M の APV を記録用外液に加え灌流するとすべて消失した(2/3)。残り 1 例は 10pA に満たない Mini のみが残った。以上のことは、E.E.Days 11 の神経細胞は、NMDA-R だけを持つシナプス（サイレントシナプス）が多く存在することを示すこと事実である。

さらに 1 つの E.E.Days 17 の神経細胞を刺激することによる evoked EPSC を記録することにより、サイレントシナプスの存在を確認した(Fig. 13)。silent SSC と同様に過分極時に全く EPSC が見られないのに対して、脱分極させると十分な EPSC が見られた。このことは E.E.Days 17 の細胞が E.E.Days 11 の神経細胞にサイレントシナプスを形成している直接の証拠である。この立ち上がり時間は 18ms で silent SSC と同程度であった。

E.E.Days 9 と 17 を共培養したときには、E.E.Days 9 の多くの細胞で A/K-R 成分も NMDA-R 成分の SSC も見られなかった。このことは E.E.Days E.E.Days 9 の神経細胞の多くがシナプス後細胞として全くシナプスをつくる能力を持っていない可能性を示唆しており、NMDA-R を持つシナプスを形成する能力を E.E.Days 9 から 11 にかけて得ていることを示唆している。

#### IV E.E.Days 11 の神経細胞における A/K-R と NMDA-R の存在

E.E.Days 11 の神経細胞には、サイレントシナプスが多くつくられることを示したが、この結果が A/K-R の発現が欠如しているために見える現象であるかどうかという点について二つの方法を用いて確認した。

一つは電気生理学的手法でグルタミン酸投与を行った。E.E.Days 17 と 11 の神経細胞の細胞体から out-side out patch を得、灌流液中にて 5ms の 100 $\mu$ M のグルタミン酸パルスを与えた。固定膜電位を -60 から +60mV まで 20mV ずつふってその応答を記録した(Fig. 14)。A/K-R 成分の値としては -60mV の電位固定した時に観

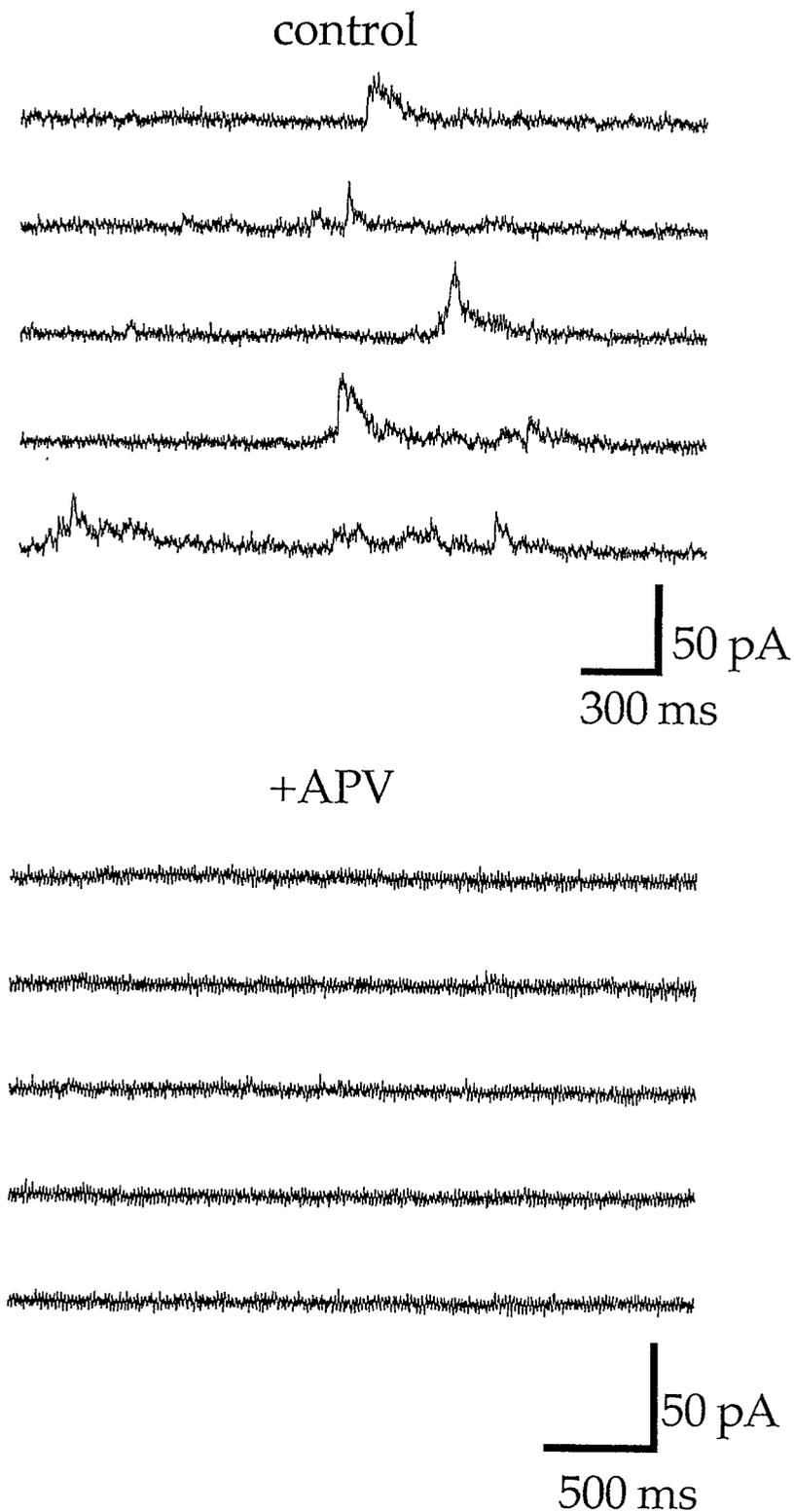


Fig. 12 E.E.Days 11 の脱分極時にのみ観測される SSCs の APV による阻害  
 a コントロール(固定膜電位 +60mV)  
 b. 100 $\mu$ M の APV 存在時(固定膜電位 +60mV)

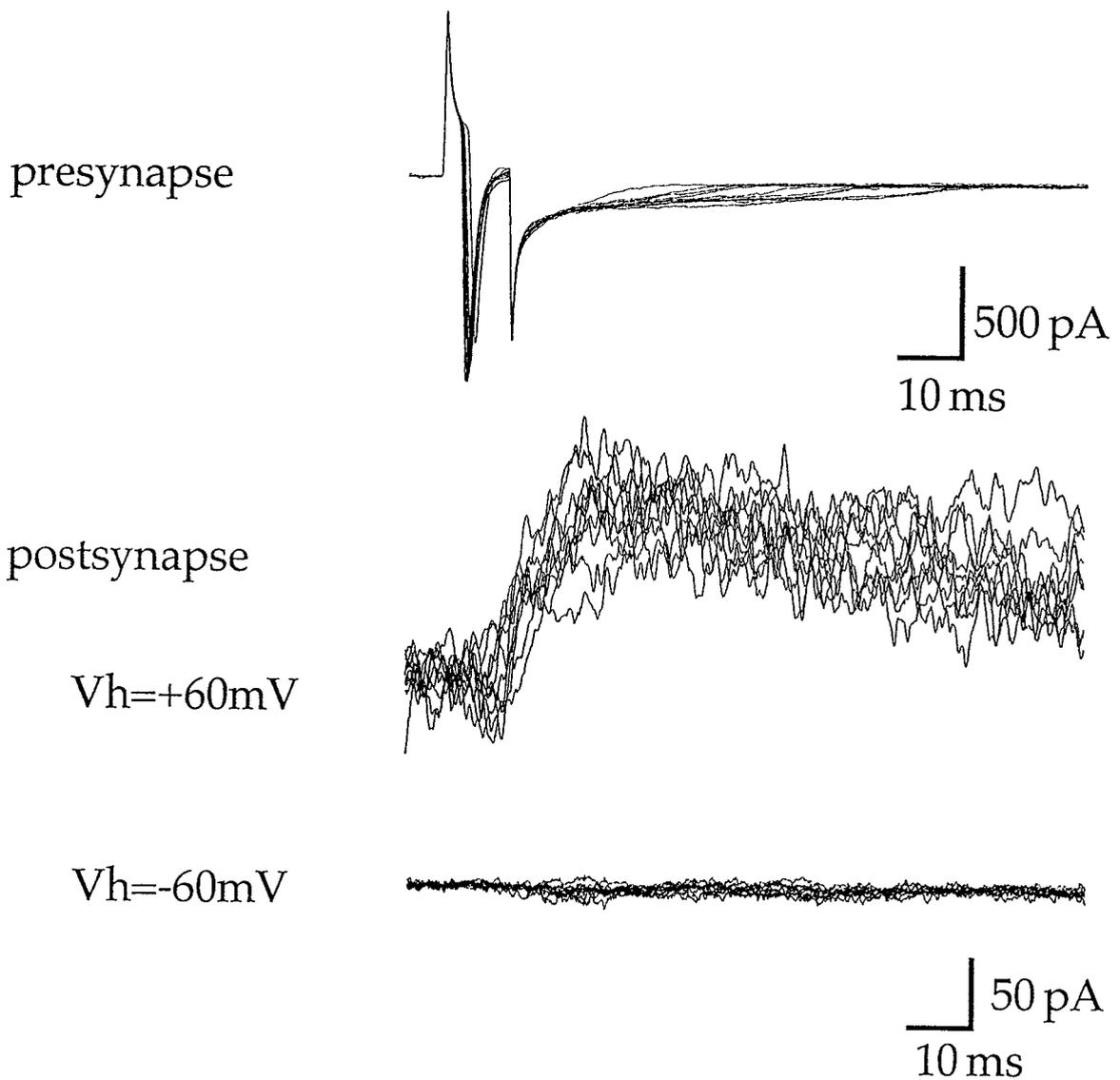


Fig. 13 E.E.Days 11 における silent synapse

upper シナプス前細胞(E.E.Days 17)に-60mV から-20mV まで脱分極刺激を加えた時の 10 トレース

middle 脱分極時のシナプス後応答 (膜電位固定+60mV)

lower 過分極時のシナプス後応答 (膜電位固定-60mV)

それぞれ 10 トレースを重ね書きした.

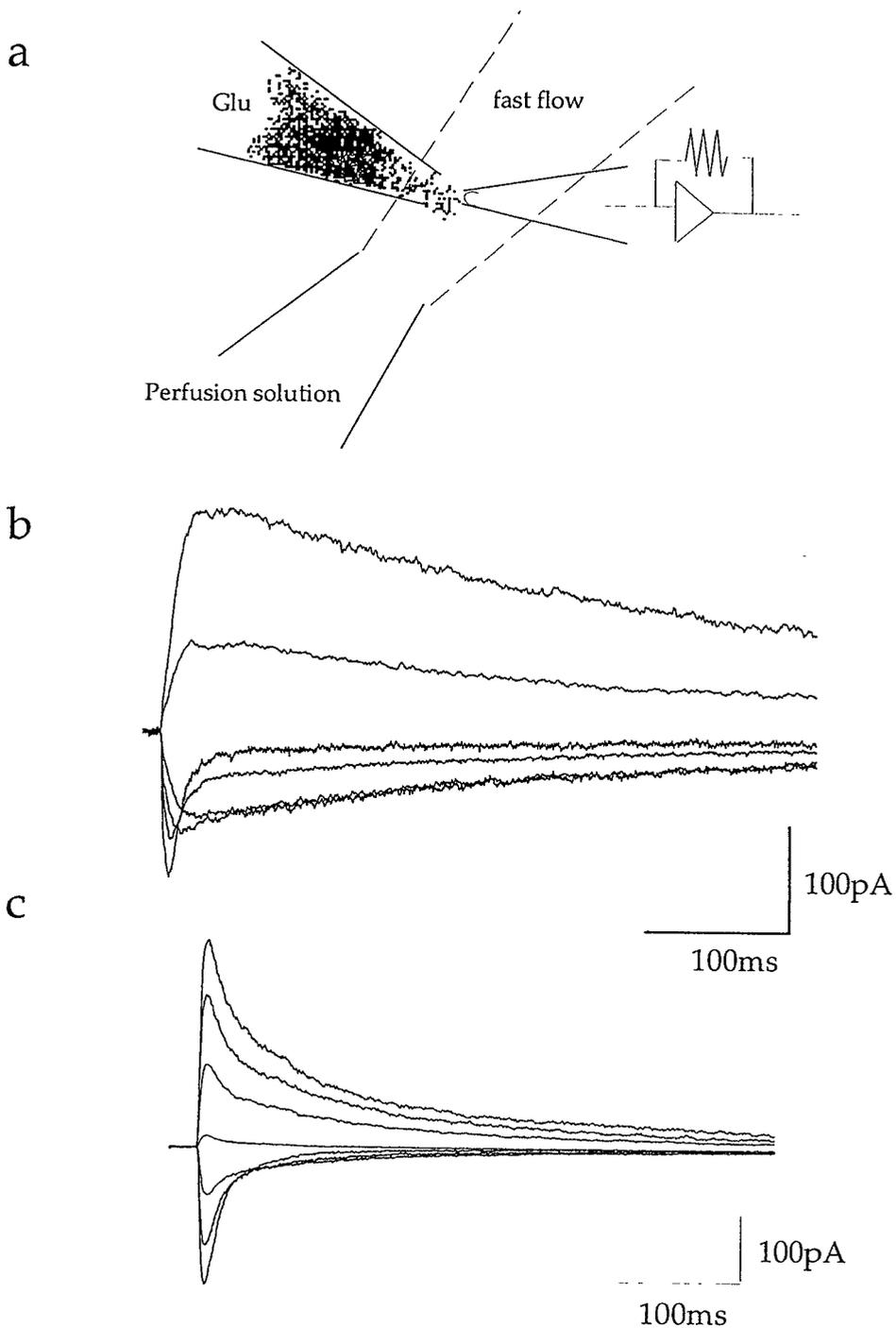


Fig. 14 out-side out patch 膜へのグルタミン酸投与

a. glutamate application の配置図

b. E.E.Days 11 由来の patch 膜のグルタミン酸応答

c. E.E.Days 17 由来の patch 膜のグルタミン酸応答

5ms のグルタミン酸パルスを与えたときの各固定膜電位下の応答を重ね書きした。

測されるピークを与える時間の振幅とし、NMDA-R 成分は A/K-R 成分がピーク値の 10%になる時刻の振幅とした。そのときの電圧電流関係は Fig. 15 に示した。過分極に電位固定したときには、E.E.Days 17、11 とともに速い立ち上がりと速い減衰時間を持つ応答をした。これは A/K-R を介する電流と思われる。この電流応答は、連続 10 個の E.E.Days 11 の神経細胞から得ることができた。このことは E.E.Days 11 の神経細胞に少なくとも細胞体には機能的な A/K-R が発現されていることを示している。また電圧電流関係をプロットした際に E.E.Days 11 の神経細胞においては NMDA-R 成分が A/K-R 成分より大きいことが認められた(3/3)。

二つ目は免疫組織化学的手法を用いてグルタミン酸受容体の染色を行った。ニワトリの A/K-R は精製もクローニングもされてなく情報がなかったが最近ハトのグルタミン酸受容体が 2 種類クローニングされた。これらはラットの GluR2 と 3 と相同性が非常に高いことが明らかになった。そこで相同性が高いことを仮定して、ラットの GluR1 と NR1 の C 末端の配列を抗原としてつくられた抗体を用いて蛍光抗体染色した(Fig.16) (Wenthold, et al. 1992)。GluR1 抗体は E.E.Days 17 も 11 の神経細胞を区別無く染色した。細胞体、神経突起が染まったが、さらに神経突起上に輝度の高いスポットが多く観測された。Craig らの報告に一致し、GluR1 の染色像と考えられる (Craig, et al. 1993)。NR1 抗体もどちらの神経細胞もよく染色し、GluR1 のような輝度の高いスポットは観察されなかった。以上の結果は A/K-R、NMDA-R をともに発現していることを強くしめしている。このことは、E.E.Days 11 の神経細胞が機能的な A/K-R を発現しているにも拘わらず、NMDA-R のみのシナプスを形成することを示唆している。

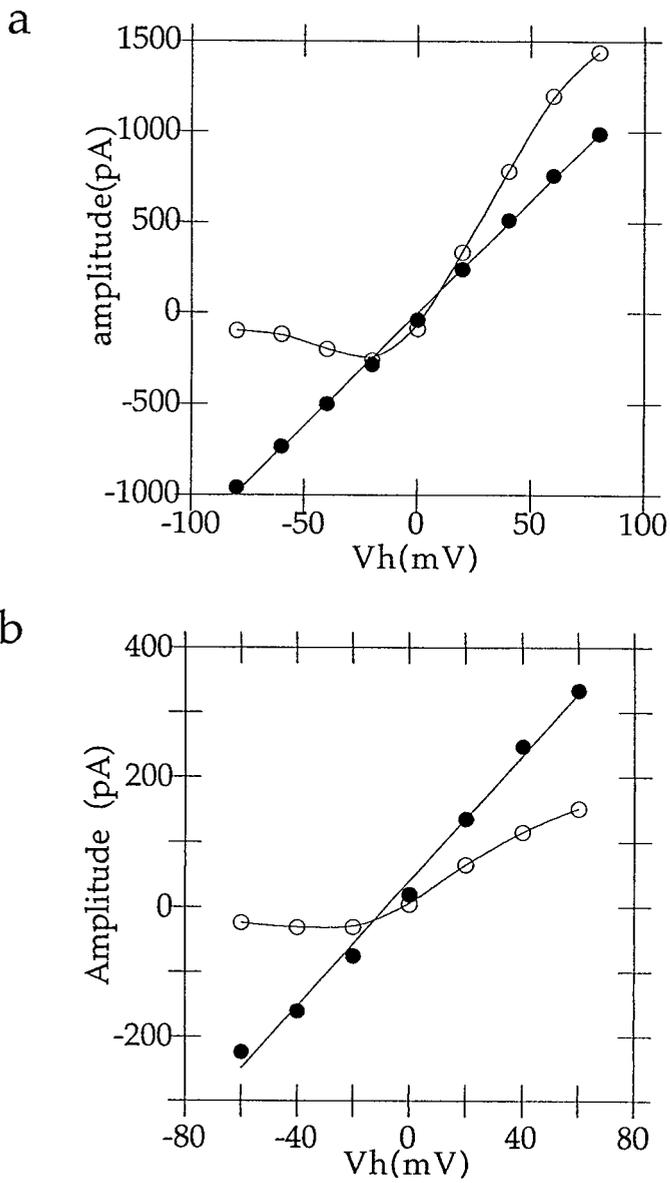


Fig. 15 out-side out patch 膜へのグルタミン酸応答の電圧電流関係  
 Fig. 14 の鍍の時間における振幅をプロットした。  
 a. E.E.Days 11 由来の patch 膜のグルタミン酸応答  
 b. E.E.Days 17 由来の patch 膜のグルタミン酸応答

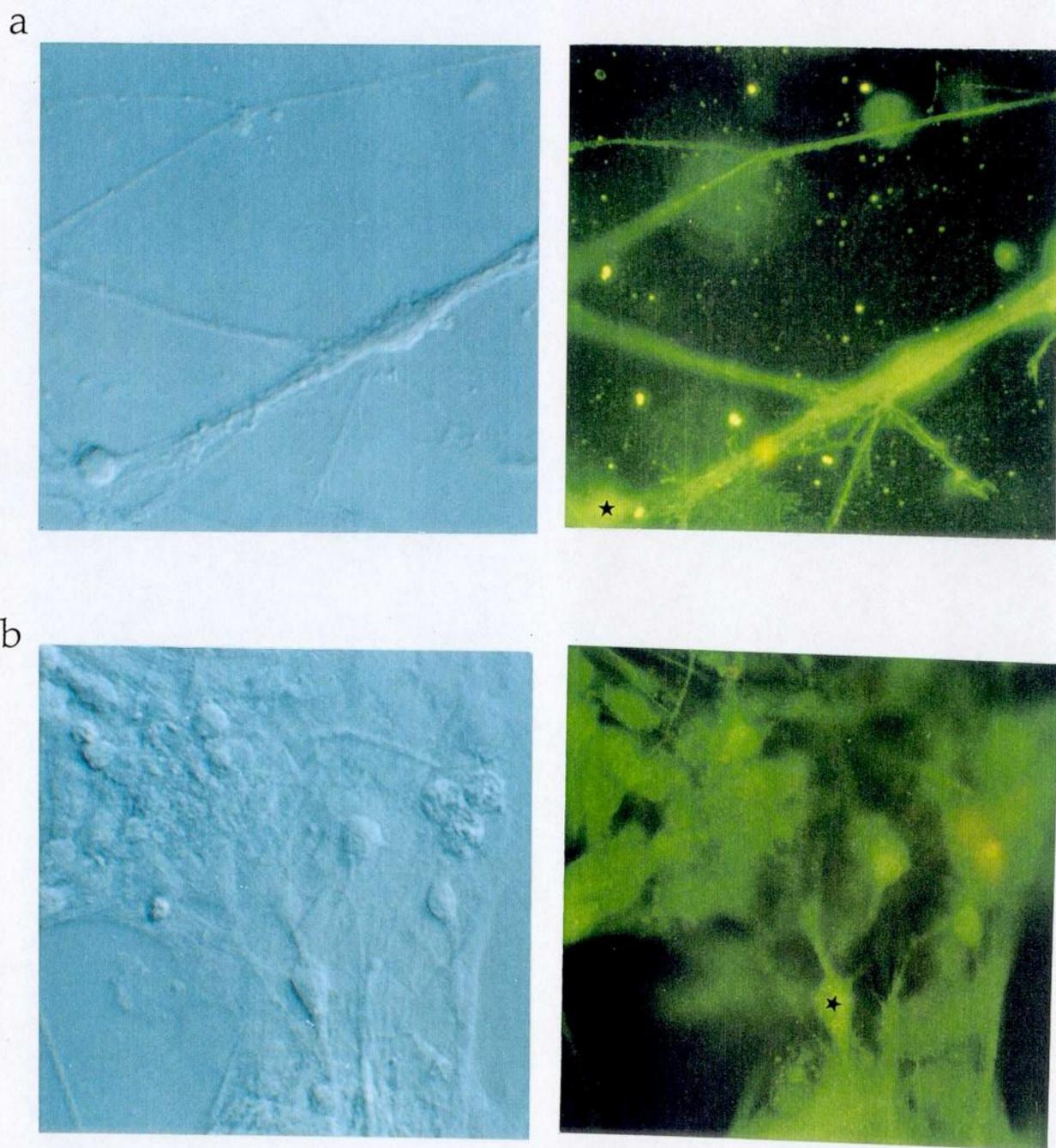


Fig. 16 抗 GluR1,抗 NR1 抗体を用いた間接蛍光抗体染色  
a. 抗 GluR1 抗体による染色像 (E.E.Days 11 は★で標識)  
b. 抗 NR1 抗体による染色像 (E.E.Days 11 は★で標識)

## 第4節 考察

本研究の結果をまとめると、次の通りである。ニワトリ胚終脳解離培養系におけるシナプス形成は、シナプス後細胞の成熟度に依存していた。E.E.Days 13の神経細胞に対するグルタミン酸作動性シナプスと GABA 作動性シナプスの形成は、それぞれ異なっていた。また、E.E.Days 17の神経細胞はデュアルコンポーネントシナプスを形成したのに対して、E.E.Days 11の神経細胞は、機能的な A/K-R を発現しているにもかかわらず、サイレントシナプスを形成した。さらに E.E.Days 9の多くの神経細胞は全くグルタミン酸作動性シナプスを形成していなかった。

### I 異胚齢共培養を用いたアッセイについて

シナプス前細胞になる能力を十分にもつ神経細胞が大多数あり、その中にシナプス形成に関して不明な能力を持った細胞が少数ある系を考えてみる。このとき少数の細胞から記録される SSC はその細胞のシナプス後細胞としての能力を反映することが期待される。結果、E.E.Days 17と13に A/K-R を主に介する SSC の振幅に大きな差を発見した。この差は E.E.Days 13の神経細胞の持つシナプス後細胞としての能力の差を反映していると考えることが出来る。しかしこの結果はグルタミン酸作動性のシナプス前細胞が E.E.Days 13に対して特異的に接触しないことに起因する現象である可能性がある。光学顕微鏡の分解能における形態的な判断からは接触が特異的に避けられている様子は見うけられなかった(Fig. 5)。また結果は記述していないが、E.E.Days 17と13の神経細胞を凝集培養を行った場合に、特異的に E.E.Days 13の神経細胞が E.E.Days 17の神経細胞の凝集群から排斥されていることも見られなく、全く E.E.Days 13と17の神経細胞の凝集に区別は出来なかった。さらに、A/K-R を介する電流は小さいが NMDA-R の電流は十分に観察された。以上より、主に A/K-R を介する SSC の振幅に大きな差は細胞間の特異的な排斥によるものではないといえる。やはり、この結果はシナプス後細胞としての能力の差を反映している。では、どの様な能力の差にあるのだろうか？ Fletcher らは、ラット

海馬の解離培養系を用いて培養日数の異なる細胞間のシナプス形成をシナプトファイシンの抗体を用いて評価している(シナプトファイシンの塊をシナプス終末と仮定して)。培養日数の長い神経細胞は、同じ培養日数の神経細胞に対しての接触部位で抗体反応が見られるが、短い培養日数の神経細胞に対しての接触部位では、全く抗体反応が見られない。このことはシナプス前細胞がシナプスを形成する能力を持っていても、シナプス形成は後細胞に依存することを示している(Fletcher, et al. 1994)。この結果は、本研究で得た結果と矛盾していない。さらにこのことはシナプス後細胞が何か標的分子を膜表面に提示していて、軸索がこれを認識してシナプスをつくることが想起される。Craigらは海馬培養神経を用いて GluR1 と GABA<sub>A</sub>R beta 2/3 subunits に対する抗体を用いて免疫組織化学的研究を行っており、GluR1 のクラスターと GABA<sub>A</sub>R beta 2/3 subunits のクラスターがそれぞれ異なる神経突起のもとに形成されており、それぞれの伝達物質を持つプレシナプス終末に対応してクラスターが形成されていることを明らかにしている。さらに活動電位にともなう伝達物質放出を長期的に阻害してもこのクラスター形成が阻害されないことから、活動電位に依存したシナプス伝達に依存せずに、何か特異的な分子間の相互作用によりシナプス形成可能性を示唆している(Craig, et al. 1993)。それは、神経筋接合部における s-laminin のような分子がその候補になるかも知れない(Martin, et al. 1995)。また、Xenopus の筋細胞の膜を運動神経の成長円錐に接触させると、ACh の放出が増え、シナプス後細胞にシグナル分子があることを示唆する結果が報告されている(Xie and Poo 1986)。以上は、シナプス後細胞によってシナプス形成が制御されていることを示唆している。

## II サイレントシナプスの形成について

E.E.Days 11 の神経細胞は A/K-R を発現していながら、サイレントシナプスを多く持つことを明らかにした。このことは最も興味深い点である。神経細胞の age によってシナプスにおける A/K-R と NMDA-R の存在比が変化している。これは、Crairらの結果とも矛盾しない。我々も IMHV 領域の age に対応して A/K-R に

対する NMDA-R の電流比を測定した。結果は加齢と共に比は減少するものだった (結果省略)。よって培養系のみの特異な現象とは考えにくい。

サイレントシナプスはシナプス後細胞が静止状態では電気的な信号を伝えることは考えにくい。そこでシナプスとして特異化するにはシナプス前細胞と後細胞で何らかの情報伝達が必要である。これもまた上記の様な標的分子があることを示唆する。しかしながら、他の可能性もある。メタボトロピックグルタミン酸受容体(mGluR)の関与の可能性である。mGluR の活性化による細胞内 G 蛋白系の活性化がそのメカニズムに関与しているかも知れない。E.E.Days 9 以前より培養液に mGluR の阻害剤を含む培養液で培養しシナプス形成を評価すれば、この可能性は検討できる。

デュアルコンポーネントシナプスにおける機能的な A/K-R と NMDA-R の存在比の E.E.Days に依る違いは機能的な受容体のシナプス部位への組み込みのメカニズムが異なることを予想させる。E.E.Days 11 はサイレントシナプスを選択的に形成するのは何故であろうか。決して機能的な A/K-R の欠損によるものではないことはグルタミン酸の投与で明らかにした。A/K-R をシナプスに組み込むメカニズムが欠損もしくは活性が低いことが考えられる。または組み込まれてはいるが、不活性型である可能性が考えられる。後者の場合の検証は、E.E.Days 11 のサイレントシナプス部位に蛋白質としての A/K-R が存在する事を確認すればよい。A/K-R と NMDA-R の抗体を用いた 2 重染色共焦点レーザー顕微鏡法を、現在検討中である。前者の場合、十分な検討が必要であるが、GluR1 の抗体染色で E.E.Days 11 の細胞上にもクラスターと考えられるものが観察されているので、クラスターをつくる能力はあるが、シナプス部位にクラスターをつくることに問題があるかも知れない。また、中枢神経系での受容体クラスター形成については、gephelin という蛋白質がグリシン受容体をクラスター形成に関与していることが報告されている (Froehner 1993)。グルタミン酸受容体についての機構に関しては全く報告がないが、類似の蛋白質の存在で細胞内骨格との関連が予想される。

神経細胞の成熟の違いによってサイレントシナプスをつくることは、生理的

に有用な機構であると考えられる。たとえば、網膜から外側膝状体への投射、体性感覚野におけるバレル構造の形成で、発生のはやい段階で投射してきた軸索と接触した若い神経細胞はまずサイレントシナプスをつくる。その後シナプス前細胞と後細胞の同期した活動により、正しく同期した神経細胞間のみサイレントシナプスが非サイレントシナプスになり神経回路が形成される可能性が考えられる。実験を検討したい点である。

### III グルタミン酸受容体について

out-side out patch にグルタミン酸の投与を行い、グルタミン酸応答を記録した。E.E.Days 11 においては、NMDA-R 応答が A/K-R の応答より大きい結果を得た。この結果は、受容体の発現数の差、またはチャネルのカイネティクスの差と解釈できる。単純に A/K-R と NMDA-R の発現数の比が違っていると解釈可能であるが、Fig. 13 の減衰時間は明らかに E.E.Days 17 のものより遅いことが見受けられる。減衰時間は A/K-R と NMDA-R の存在比によって変わるため正確な議論は出来ないが、発生段階で NMDA-R の減衰時間が変化していることが報告されているので (Hestrin 1992b)、その可能性が高い。サイレントシナプスにある NMDA-R の性質を詳細に検討することはシナプス形成とシナプス可塑性の両方の観点から興味深い問題である。

### 第三章 ニワトリ胚終脳解離培養系を用いたシナプス伝達依存的なシナプス成熟

第1節 序論 .....	46
第2節 材料と方法 .....	47
第3節 結果 .....	47
第4節 考察 .....	53

## 第1節 序論

脳の高次機能を理解するためには、シナプス可塑性の分子メカニズムを解明することは必要不可欠である。シナプスの発生、これは、シナプスの形成、成熟、除去の過程を含むものであるが、この過程に含まれるメカニズムがシナプスの可塑的変化が起きるときに再び動員されると仮定することは根拠のないことではない。シナプス形成の分子、細胞メカニズムは、主に神経筋接合部において研究されてきた。そのメカニズムは活動依存的であると考えられてきた(Nelson, et al. 1990; Sanes and Takacs 1993; Azfra, et al. 1990; Dahm and Landmesser 1990)。しかし中枢神経系においては、その組織の複雑さゆえに研究はあまり進んでいない。中枢神経系のシナプス形成の過程を詳細に解析するには、解離培養系は有用な方法であり、我々はシナプス発生の解析ができる系を開発してきた(前章参照)。この培養系で、SSCはE.E.Days 13より見られはじめ、E.E.Days 15から17にかけて急激にその頻度、振幅が大きくなる。すなわちシナプス成熟の過程が観測できる。

シナプス成熟には神経細胞の活動状態に依存したメカニズムが存在すると考えられている。そこで、我々はそのような活動のシナプス伝達に着目し、その活動とシナプス成熟の関係を解析した。シナプス伝達には大きく2種類ある。活動電位にともなうシナプス伝達と、自発的なシナプス小胞の放出による伝達である。これらのシナプス伝達がシナプス形成に与える影響を、ニワトリ胚終脳神経細胞の解離培養系に対して電気生理学的手法を用いて解析した。この2種類の活動を阻害するために tetrodotoxin (TTX) と 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) を用いた。

## 第2節 材料と方法

第2章を参照

この章の実験に用いたニワトリ胚はすべて孵卵10日であり、E.E.Days 15、16、17はそれぞれ培養5、6、7日目である。

電気生理学に用いた電極内液は、KMS1である（第2章第2節参照）。記録外液にはすべて25 $\mu$ MのPTXを入れ抑制性シナプスを阻害した。

## 第3節 結果

この解離培養系において、SSCの頻度、振幅はE.E.Days 15からE.E.Days 17にかけて増加し、およそ頻度は20倍に、振幅は4倍に増加する。この増加が神経活動に依存しているかを検討するために、この期間に2種類の阻害剤、TTXとCNQXを加えた。

E.E.Days 15の培養に対する阻害剤の効果を確認した。1 $\mu$ MのTTXの投与により、自発的な発火は見られなくなり、また、膜電位固定下において、30msの幅の-60mVから0mVまで脱分極刺激を加えても、電位依存性のナトリウム電流の発生を完全に阻害した。また-60mVに電位固定して記録を行った場合、同期したSSCは完全に見られなくなったが、Miniは十分に観察された。5 $\mu$ MのCNQXを記録外液に入れると、自発的な細胞の発火もMiniも見られなくなった(結果省略)。これらのことはTTXは活動電位にともなうシナプス伝達を阻害し、CNQXはA/K-Rを介するシナプス伝達すべてを阻害したことを示している。

TTXとCNQX含む培養液でE.E.Days 15から17にかけて培養を行った。まず2日後に阻害剤がその効果を保っているかを確認した。TTX処理(TTXを含む培地で2日間培養したもの)では、E.E.Days 15の時と同様にNaスパイクを引き起こすことは出来なかった。培養液を完全に通常の記録外液に交換すると、先と同じ脱分極刺激により十分なNaスパイクを引き起こすことが出来た。CNQX処理

(CNQX を含む培地で 2 日間培養したもの) では、培地交換前は自発的な発火、SSC、Mini のすべてが見られなかったが、培養液を完全に通常の記録外液に交換すると見られるようになった(結果省略) . -60mV に電位固定して SSC を各条件で処理した神経細胞から記録した. コントロールの神経細胞からの SSC の振幅が最も大きく、TTX 処理、CNQX 処理の順番であった(Fig. 1). 観測される振幅の大きさに差は見受けられたが、統計的に有為な差はなかった (unpaired t-test,  $p=0.15$ : CNQX 処理 neurons,  $p=0.6$ : TTX 処理) . この SSC の振幅のばらつきは、それぞれの神経細胞がどのような活動状態にある神経回路網の中にあるかに依存するためであろう.

より正確にこれら阻害剤の効果を調べるために、evoked EPSC を記録した. evoked EPSC は 1 つの細胞由来のシナプス結合の強さであり、SSC の様に神経回路網の時間的な活動度に依存しない. 21 個の E.E.Days 16 の神経細胞と 83 個の E.E.Days 17 の神経細胞を記録に用いた. E.E.Days 17 で観測された各条件での evoked EPSC の典型例を Fig. 2a(1-3)に示す. E.E.Days 16 で観測された平均振幅は、コントロールで  $184 \pm 42.2$  pA (mean  $\pm$  S.E.,  $n=5$ )、TTX 処理で  $96.0 \pm 13.3$  pA ( $n=5$ )、CNQX 処理で  $77.4 \pm 20.1$  ( $n=11$ )であった. TTX 処理、CNQX 処理の振幅増加の抑制効果はコントロールの振幅増加に対して、同程度であった(control vs. TTX, CNQX: unpaired t-test,  $p<0.08$ , TTX vs CNQX;  $p<0.6$ ). E.E.Days 17 では、コントロールで  $311 \pm 35.6$  pA ( $n=26$ )、TTX 処理で  $190.0 \pm 38$  pA ( $n=25$ )、CNQX 処理で  $49.7 \pm 8.13$  pA ( $n=32$ )であった. E.E.Days 17 では、阻害剤の振幅抑制効果は大きかった. CNQX の抑制効果は TTX のものより効果的であった(TTX vs CNQX: unpaired t-test,  $p<0.001$  ). この効果は E.E.Days 16 では観測されなかった. evoked EPSC の振幅の差は、シナプス部位の空間的分布によっても左右される. シナプス部位が細胞体から電気緊張的距離的に遠いと、EPSC の波形の変化をともない振幅が小さくなる. しかしながら、記録された EPSC の立ち上がり時間、減衰時間は各処理によらず、振幅の差と相関はなく同程度であった(Fig. 2C). 実際に CNQX 処理した神経細胞から得られた波形(Fig. 2A3)をコントロールの振幅とあわせて比べた(Fig. 2A4). これ

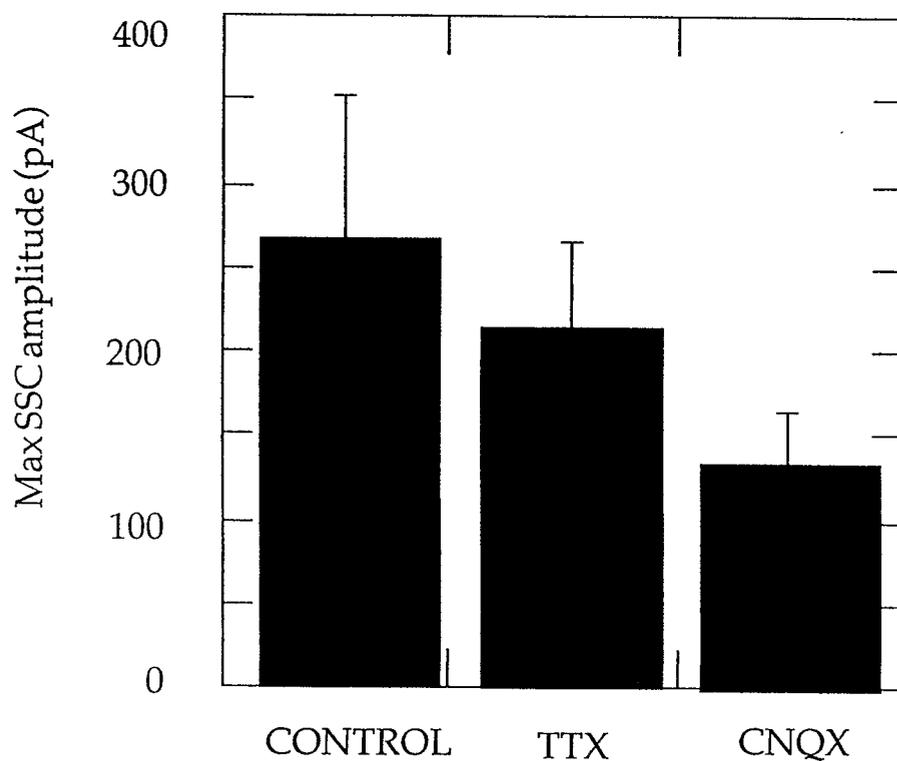


Fig. 1. TTX と CNQX の SSCs の振幅増加に対する効果

TTX (1  $\mu$ M), CNQX (5  $\mu$ M)を E.E.Days 15 に加え、E.E.Days 17 に完全に阻害剤を含む培地を記録外液と交換した。膜電位を-60mV に固定し3分間、SSCs を記録した。

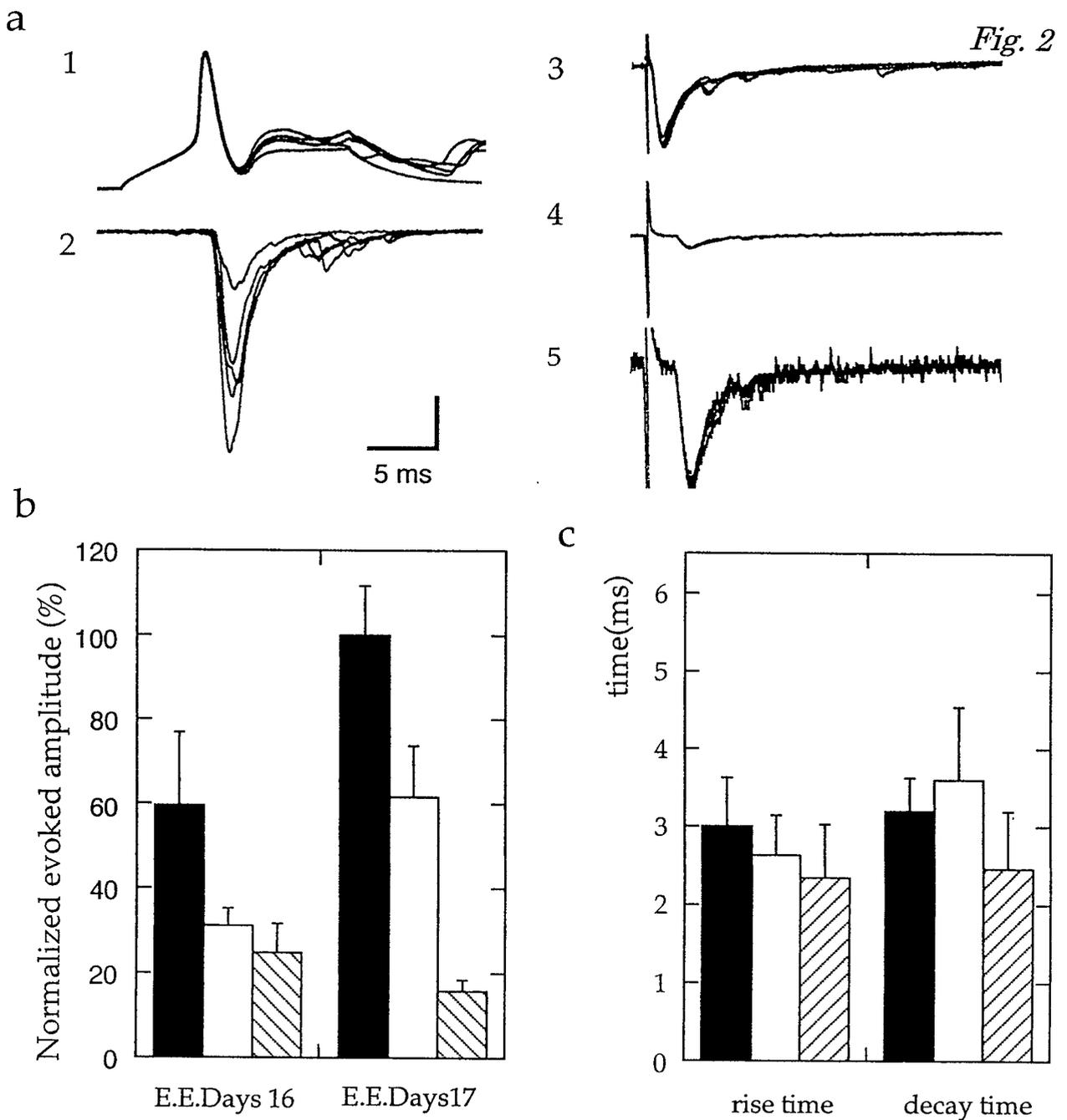


Fig. 2. TTX と CNQX の evoked EPSCs の振幅増加に対する効果

- a1 デュアルホールセルレコーディング法を用いた記録した E.E. Days 17 の神経細胞間の evoked EPSCs の典型例. 膜電流固定下で記録したシナプス前細胞の活動電位 (上) と膜電位固定下で記録したシナプス後応答. a2, 3 TTX 処理(a2)、CNQX 処理(a3)した神経細胞からの局所細胞外刺激によって誘導した EPSCs (スケール: 100 pA). a4 a3 のトレースを縦軸に伸ばしたもの (スケール: 10pA)
- b evoked EPSCs のコントロールに対する平均振幅. E.E. Days 17 のコントロールの平均振幅を 100%とした.
- c E.E. Days 17 における evoked EPSCs の平均 risetime と half decay time 黒いカラム (コントロール)、白いカラム (TTX 処理)、斜線のカラム (CNQX 処理)

らの結果は2つのシナプス伝達、活動電位にともなう伝達と自発的な伝達がシナプスの成熟に関して異なった方法で寄与していることを示唆している。

シナプス形成におけるこの二つの伝達の影響を詳細に調べるため、Miniを解析した。解析には22個のE.E.Days 16と131個のE.E.Days 17の神経細胞を用いた(Fig. 3A)。E.E.Days 16で観測されたMiniの平均振幅は、コントロールで $17.1 \pm 1.95$  pA (mean  $\pm$  S.E., n=7)、TTX処理で $13.8 \pm 2.37$  pA (n=5)、CNQX処理で $13.5 \pm 1.21$  pA (n=10)であった。E.E.Days 17では、コントロールで $19.2 \pm 0.871$  pA (n=68)、TTX処理で $14.3 \pm 0.947$  (n=42)、CNQX処理で $13.0 \pm 0.707$  pA (n=21)あった。E.E.Days 17では、TTX処理、CNQX処理のMiniの振幅増加を有意に抑制した(unpaired t-test,  $p < 0.005$ )。さらにこの二つの処理には有為な差は見られなかった。これらの結果は主に活動電位をともなうシナプス伝達が量子サイズを制御していることを示唆している

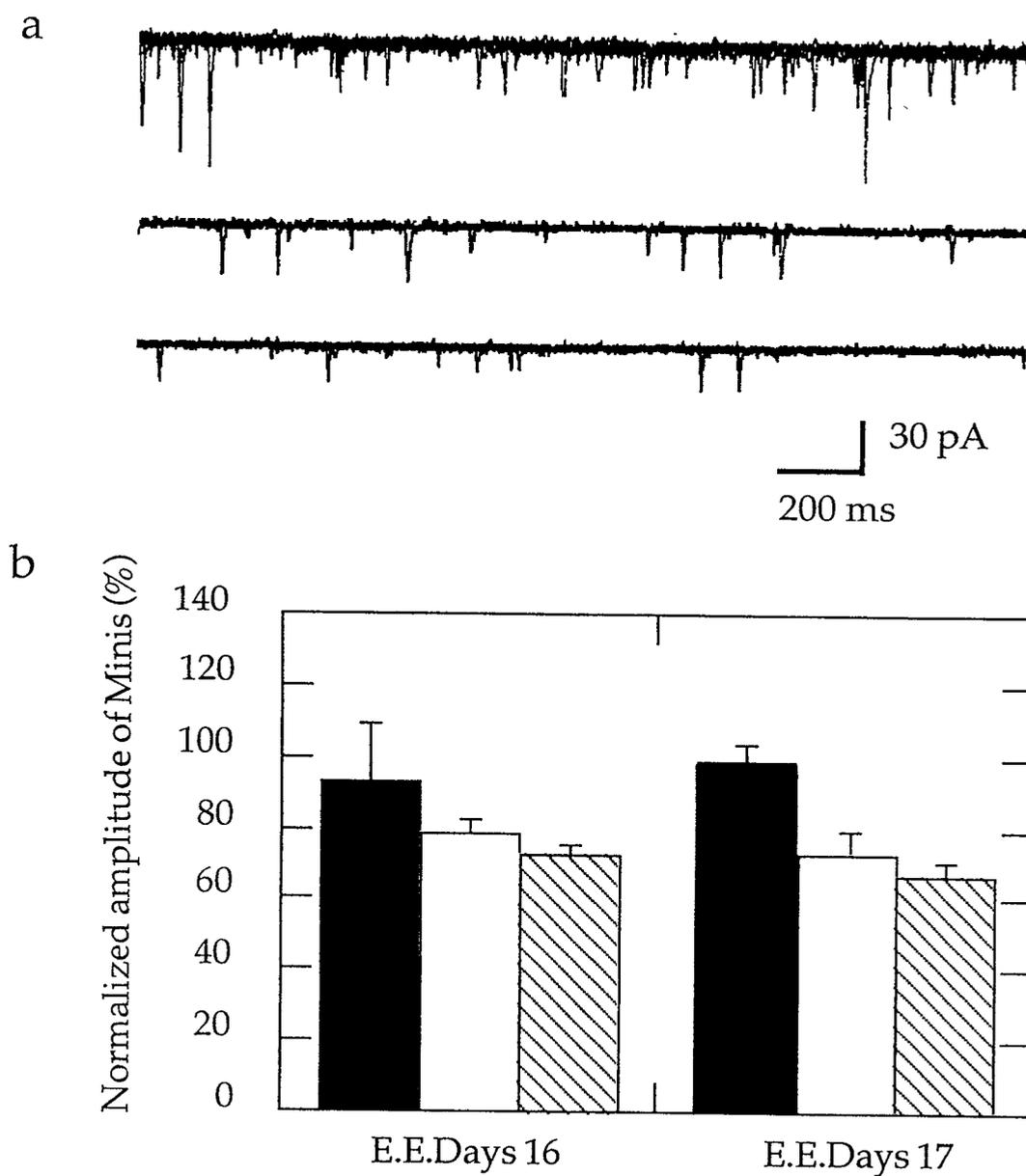


Fig. 3. TTX と CNQX の Minis の振幅増加に対する効果

a Minis の例、コントロール(上)、TTX 処理(中)、 CNQX 処理 (下)

b Minis のコントロールに対する平均振幅

Minis は E.E. Days 16 と 17 に膜電位固定下 3 分間記録し、平均した  
 黒いカラム (コントロール)、白いカラム (TTX 処理)、斜線のカラム  
 (CNQX 処理)

## 第4節 考察

培養中枢神経細胞のシナプスの発生が、2種類のシナプス伝達活性に、異なった依存をしていることを示した。この2つの伝達は、活動電位をともなうシナプス伝達と自発的な放出による伝達である。結果から考えうるモデルを Fig. 4 に示した。前者はシナプス部位の大きさを、後者はシナプス部位の数をそれぞれ制御していると考えられる。

シナプス小胞内に含まれる伝達物質の数は数千分子で、シナプス間隙では数 mM になる。一方、受容体はシナプス後細胞の1つのシナプス部位に受容体数は数十から数百個しかないと言われている。このことは1つのシナプス小胞の放出によりそれに対応するシナプス後細胞の受容体は飽和していることが予測される。こと実これを示唆する報告もある(Tang 1994)。また1つのシナプス部位には1つの active site (シナプス小胞の放出部位) しかないとの報告もある(Korn, et al. 1982; Perkael and Nicoll 1993)。このことを考慮すると、Mini の振幅は主にシナプス部位の A/K-R の数によって決められていると考えられる。TTX と CNQX の効果が Mini の振幅増加に同程度しか効果がないことより(Fig. 3B)、活動電位をともなう伝達がこの Mini の成長を制御していると考えられる。また EPSC の立ち上がり時間、減衰時間に違いがないことは(Fig. 2C)、Mini の成長はシナプス間隙内での伝達物質濃度が変化したのではなく、受容体数が増加していることを示唆している(Major 1993)。

evoked EPSC の振幅を決めている要因としては以下の4つが考えられる。

①1つのシナプス部位の大きさ、②ひとつのシナプス部位にある伝達物質放出機構の数 (active zone の数)、③発火に対するシナプス終末での伝達物質放出確率、④シナプス部位の数である。evoked EPSC の振幅増加の抑制は、上記の4つ差を見ている可能性を持つ。Mini の振幅は TTX と CNQX で同程度抑制されていたので、1番目の可能性は除外され、evoked EPSC の TTX と CNQX における抑制効果の差は、残りの3つの可能性に絞られる。1つのシナプス部位には1つの active zone しかないとの報告が多数あることより、2番目の可能性も除外される。よって、TTX と

CNQX の抑制効果の差は伝達物質放出確率がシナプス部位の数に依存することが考えられる。

ここで、各シナプス部位での伝達物質放出確率が同じであると仮定すると、ひとつの細胞由来のシナプス部位の数を推定することが出来る。E.E.Days 17 でそれぞれの条件での平均シナプス部位は、コントロールでは 17.5 個、TTX 処理では 13.3 個、CNQX 処理では 3.8 個であった。Fig. 3A に見られる Mini の頻度の差は、シナプス部位数の差を反映している可能性がある。ショウジョウバエの神経筋接合部で、シナプス活動に欠損を持つ突然変異体を用いた研究では、シナプス部位の数に差があることが報告されている(Jai, et al. 1993; Budnik, et al. 1990; Zhong, et al. 1992)。これらのこと実は間接的ではあるが、CNQX 処理による抑制効果がシナプス部位の増加の抑制を含んでいる可能性を示唆する。また、シナプス後細胞の受容体の阻害がシナプス部位の形成に影響することは交感神経系における NGF(Campenot 1987)や海馬における BDNF(Zafra, et al. 1990)といった逆行性のメッセンジャーの関与も考えられる。

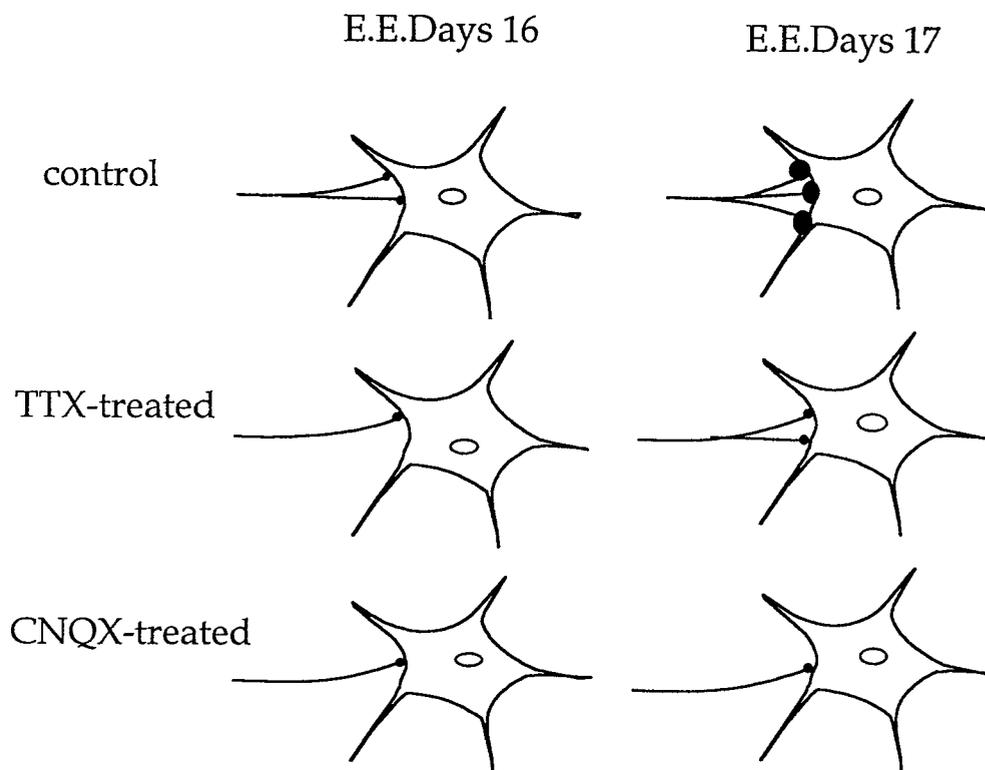


Fig. 4. シナプス伝達依存のシナプスの成熟  
シナプス部位の大きさ (Minis の大きさ : 黒い円) と神経終末の分枝の数  
に注目

## 第四章 生後直後のヒヨコ IMHV 領域における長期増強

第1節 序論.....	57
第2節 材料と方法.....	59
I 脳切片の準備.....	59
II 溶液と薬剤.....	59
III 記録と解析.....	59
第3節 結果.....	62
I IMHV 領域のシナプスの同定.....	62
II 長期増強の誘導.....	62
III NMDA-R 成分のより大きい増強.....	67
IV 増強されないMini の振幅.....	72
V IMHV 領域におけるサイレントシナプスの存在.....	72
第4節 考察.....	75
I <i>fast LTP</i> と <i>slow LTP</i> に関して.....	75
II 発現部位について.....	76

## 第1節 序論

記憶のモデルとして海馬の長期増強が研究されているが、その解明は未だ混迷の中である (Bliss and Collingridge 1993) . さらに海馬の働きが個体レベルで脳高次機能とどのように結びつくかははっきりとしていない. ヒトにおいて、海馬に重大な障害があると、それ以後の記憶はできないが以前の記憶は思い出せることから、記憶形成の作業領域として働いているとする説があるがその真偽は不明である. 我々は、記憶現象が明確で、発生学的かつ電気生理学的アプローチができる対象として、鳥類のインプリンティング現象に注目した. この現象は、鳥類が孵化直後に見た動くものを親鳥として記憶する現象として知られており、時期特異的な、行動に関連した記憶である (Bolhuis 1991).

この現象には多くの研究が行われてきた. まず、この現象は脳の *intermediate and medial part of hyperstriatum ventral (IMHV)* の活動に依存していることが以下の2つの実験結果より示された. この現象に伴い、蛋白質、mRNA の代謝活性が上昇すること (Bateson 1972; Kohsaka 1979). IMHV 領域の破壊により特異的にこの現象が阻害される (McCabe 1981; McCabe 1982) . また、視覚入力から、この領域への伝達も確認されている. 反対側の眼よりの入力はまず *optic nucleus of the thalamus* へ入り、さらに *Wulst* をへて IMHV に入力している. さらに聴覚、嗅覚からも入力があることが示されている. また、IMHV 領域では孵化後 30 日にわたり細胞密度が減少し、一方、樹状突起状のスパインにおける電子密度の上昇がおきている. さらにインプリンティングに伴いシナプスの形態変化も観察されている (Bradley, et al. 1985). 以上のことはインプリンティングに伴い蛋白、細胞、シナプスレベルで可塑的变化が起きていることを示唆している.

IMHV 領域を切り出した研究においては、電気刺激をインプリンティング刺激の代わりに用いて研究がおこなわれてきた. 5Hz/300 発の刺激に対して、電場電位は2時間以上の上昇を示し、この増強が NMDA-R の活性化に依存していることが示された (Bradley, et al. 1993; Bradley, et al. 1992; Bradley, et al. 1991a) . また長

期増強の誘導率が age に依存しており、孵化後 1 から 4 日にそのピークがあり、その後はほとんど誘導することが出来ないことが示されている。この長期増強の誘導はインプリンティングの時期特異性と一致している。さらに、電気刺激による長期増強はヒヨコの視覚経験に依存していることが明らかにされた (Bradley, et al. 1991b; McCabe and Horn 1991) 。暗室で飼育されたヒヨコは明るいところで飼育されたヒヨコよりもずっと遅くまで、長期増強の誘導が可能であった。さらにこの刺激により PDS(postsynaptic density)の増加が電子顕微鏡を用いた研究で明らかにされている (Bradley 1985; Horn, et al. 1986) 。これらの報告はシナプスの形態変化とシナプス伝達の電氣的伝達の変化が伴って起こっていることを示唆している。この IMHV 領域における可塑的变化は、形態的变化を伴うシナプスの可塑的变化を研究するのに、魅力的な対象である。

以上の報告はこの IMHV 領域において、形態的变化を伴う長期増強が起きている可能性を示している。しかし、電気生理学的研究で 1 つの神経細胞で何が起きているかは詳細には捕らえられていない。我々は詳細にこの現象を記述するために、ホールセルレコーディング法を用い、シナプスの同定、長期増強の誘導と発現メカニズムを調べた。

## 第2節 材料と方法

### I 脳切片の準備

孵化後 0 から 3 日目のヒヨコを用いた。脳切片の用意は Edwards らの方法に準拠した(Edwards, et al. 1989)。深麻酔したヒヨコを断頭し、5%CO<sub>2</sub>/95O<sub>2</sub>に飽和させ、氷冷した Kreb's solution につけ十分に冷やした(2min)。頭骨をはさみで切り、丁寧に大脳を取り出し、さらに 1 分間冷やした。使用する左脳の吻側を 3 ミリほど切りトリミングし、スライサーの試料用トレイに瞬間接着剤にて固定した。力学的な変形を防ぐために、脳ブロックの三方を 4%程度の寒天ブロックにて固定した。スライサー(D.S.K-1000, 堂阪)を用いて厚さ 300 $\mu$ m の coronal slice を切り出した。IMHV 領域を含むスライスは 37°Cに加温し、5%CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub> で飽和させた Kreb's solution 中にて一時間インキュベートし、電気生理学的実験を行った。

### II 溶液と薬剤

Kreb's solution の組成は次の通りである(mM)。120 NaCl, 3 KCl, 12 MgCl<sub>2</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 23 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 glucose。記録には抑制性の入力を阻害するために、100 $\mu$ M の Picrotoxin を加えたものを用いた。

パッチ電極内液の組成は次の通りである(mM)。

CsMS0.5 : 130 CsCH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>, 10 KCl, 0.2 CaCl<sub>2</sub> , 2 MgCl<sub>2</sub> , 0.5 EGTA, 2 Mg-ATP, 10 HEPES-Cs (pH=7.2)

CsMS5 : 130 CsCH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>, 10 KCl, 0.2 CaCl<sub>2</sub> , 2 MgCl<sub>2</sub> , 5 EGTA, 2 Mg-ATP, 10 HEPES-Cs (pH=7.2).

その他、用いた薬剤等は、tetrodotoxin (TTX: Wako)、D,L-2-aminophosphonovalerate (APV: Sigma)、cyano-nitroquinoxaline-dione (CNQX, Sigma)である。

### III 記録と解析

Edwards らの方法に準拠した(Edwards, et al. 1989)。スライスを自作の記録

チャンバー(容量 200 $\mu$ l)にのせ、100 $\mu$ m 以下の太さに引き延ばしたポリプロピレンの繊維をコの字型に曲げた直径 0.9mm の銀線に 2mm 程度の間隔で張ったもので押さえた。対物 4 倍の顕微鏡下にて IMHV 領域を同定し、40 倍の水浸対物レンズ(Olympus,作動距離 1.8mm)で神経細胞を見ながら、ホールセルレコーディング法を適用し、膜電位固定下において EPSC を記録した。刺激には Krebs's solution をつめた先端径 20 $\mu$ m ほどのガラス電極を用い、シナプス後細胞の周囲(100 $\mu$ m 程度)に刺激電極を置き、両分極性の電流刺激を 5 秒間隔で行った。刺激条件は Jonas らの方法に準拠した(Jonas, et al 1993)。刺激幅は 250 $\mu$ s で、電流強度は EPSC を誘導できる最低の刺激強度の 120%程度にした(およそ 5~15 $\mu$ A)。これにより 1 つ、もしくは 2, 3 のシナプス前細胞を刺激することができる(Fig. 1)。EPSC は Dagan 3900A を用いて増幅し、1KHz の 4 pole bessel filter をとおし、pClamp6(Axon.Inst.)を用いてアイソレーター(A356, WPI)を制御して刺激を行い、サンプリング周波数 20kHz で記録した。データ解析は実験終了後に行った。用いた電極は GD1.5(thick wall)(Narishige,Japan)で、微小電極作成装置(PP-83,Narishige)を用いて先端径 1 $\mu$ m 程度のものを作成した。電極内液をつめた状態で電極抵抗は 4~7M $\Omega$ であった。記録中は 1-2ml/min の流速で灌流した。

シリーズ抵抗、膜抵抗、膜容量は刺激前に 5mV、30ms の過分極の矩形波を加え、そのステップ応答により推計した(第二章参照)。平均値の表記は平均 $\pm$ 標準誤差(標本数)とする。

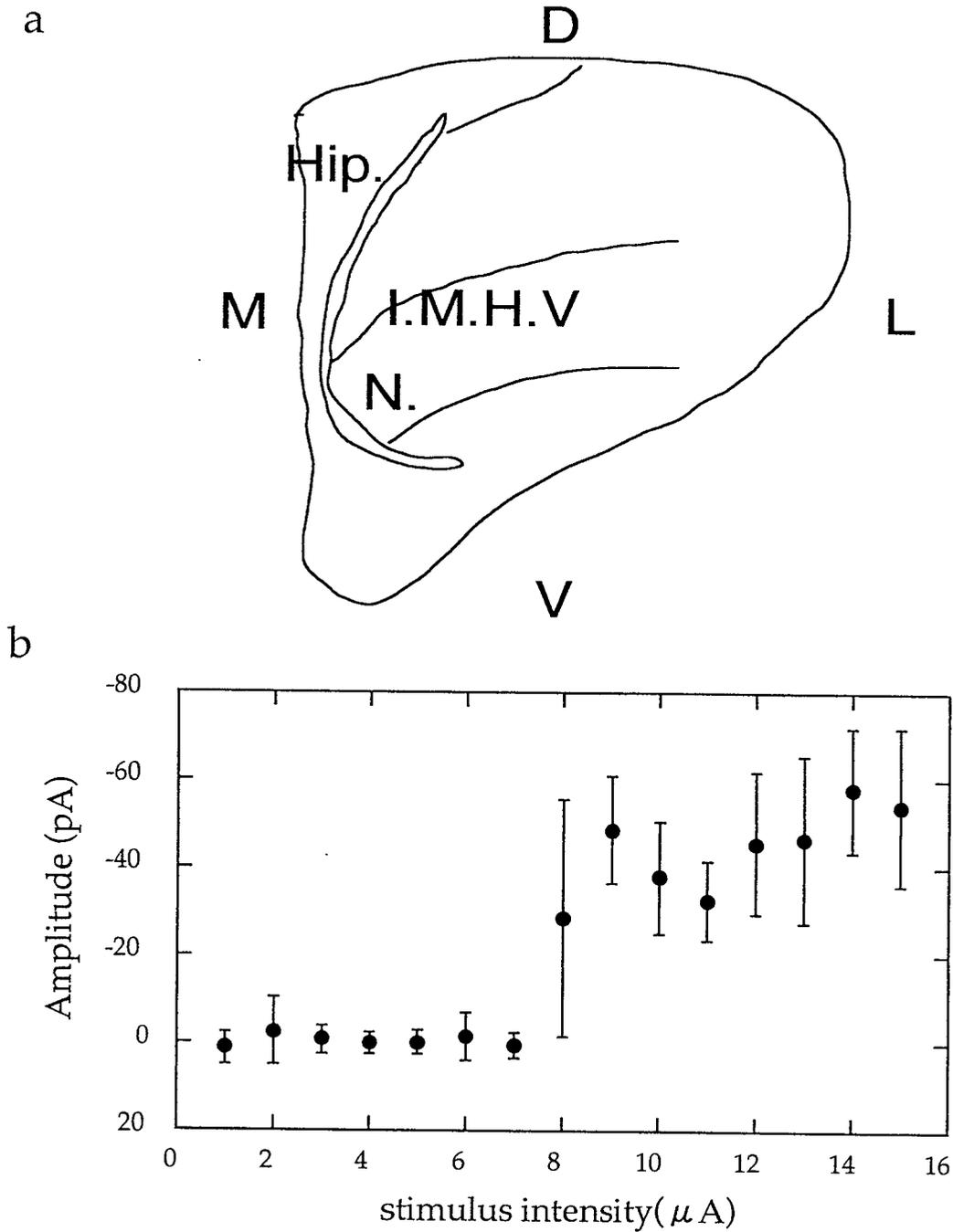


Fig. 1 coronal slice の模式図と刺激電流決定のプロトコル

- a. coronal slice の模式図、Hip: hippocampus; N: neostriatum;  
 b. 刺激電極に流す電流を徐々に大きくしたときのシナプス後応答の平均振幅をプロットしたもの (各 12 回刺激した) エラーバーは標準偏差を示す

## 第3節 結果

### I IMHV 領域のシナプスの同定

IMHV 領域の神経細胞にホールセルレコーディングし、周囲の細胞を刺激することにより容易に EPSC を誘起することができた。まず、この領域において使われているシナプスの同定を試みた。膜電位を  $-70\text{mV}$  に固定して、刺激を行うと内向き電流のシナプス後応答が記録できた。多くの場合において、膜電位を  $-40\text{mV}$  に固定すると、内向き電流の後に外向き電流が続くシナプス後応答が得られた。この外向き電流は  $-50\text{mV}$  あたりで内向きから外向きに反転することより、 $\text{Cl}^-$  電流と考えられる(Nernst の式より本実験系のイオン組成から  $\text{Cl}^-$  の平衡電位は  $-49\text{mV}$  である)。そこで  $100\mu\text{M}$  の PTX を含む灌流液に換えると、この外向き電流は GABA 作動性シナプスであることが確認できた(結果省略)。また、残った内向き電流は  $5\mu\text{M}$  の CNQX と  $200\mu\text{M}$  の APV により完全に阻害できた。このシナプスがグルタミン酸作動性シナプスであることを示す結果である(Fig. 2)。また同一のシナプスにおいて CNQX 存在下と APV 存在下で電圧電流関係を測定した。この関係は他の中枢神経系で見られるグルタミン酸シナプスと同じでデュアルコンポーネントシナプスであった。以後の実験においては、抑制性シナプス入力の混入をさけるため、常時  $100\mu\text{M}$  の PTX を記録外液に加えた。

### II 長期増強の誘導

電場電位の刺激応答で長期増強は確認されているが、一つの神経細胞での確認は未だ為されていない。まして、その発現メカニズムに関して情報は得られていない。

5Hz/300 発の刺激によって長期増強が誘導できると報告があるので、この刺激条件を用いて single cell での長期増強の誘導を試みた。実際に用いた条件刺激は、5Hz/300 発とシナプス後細胞の  $0\text{mV}$  への脱分極を組み合わせたものを使った。

5 分間テスト刺激を加え得られた EPSC の平均振幅に対し条件刺激後 10 分

Fig.2

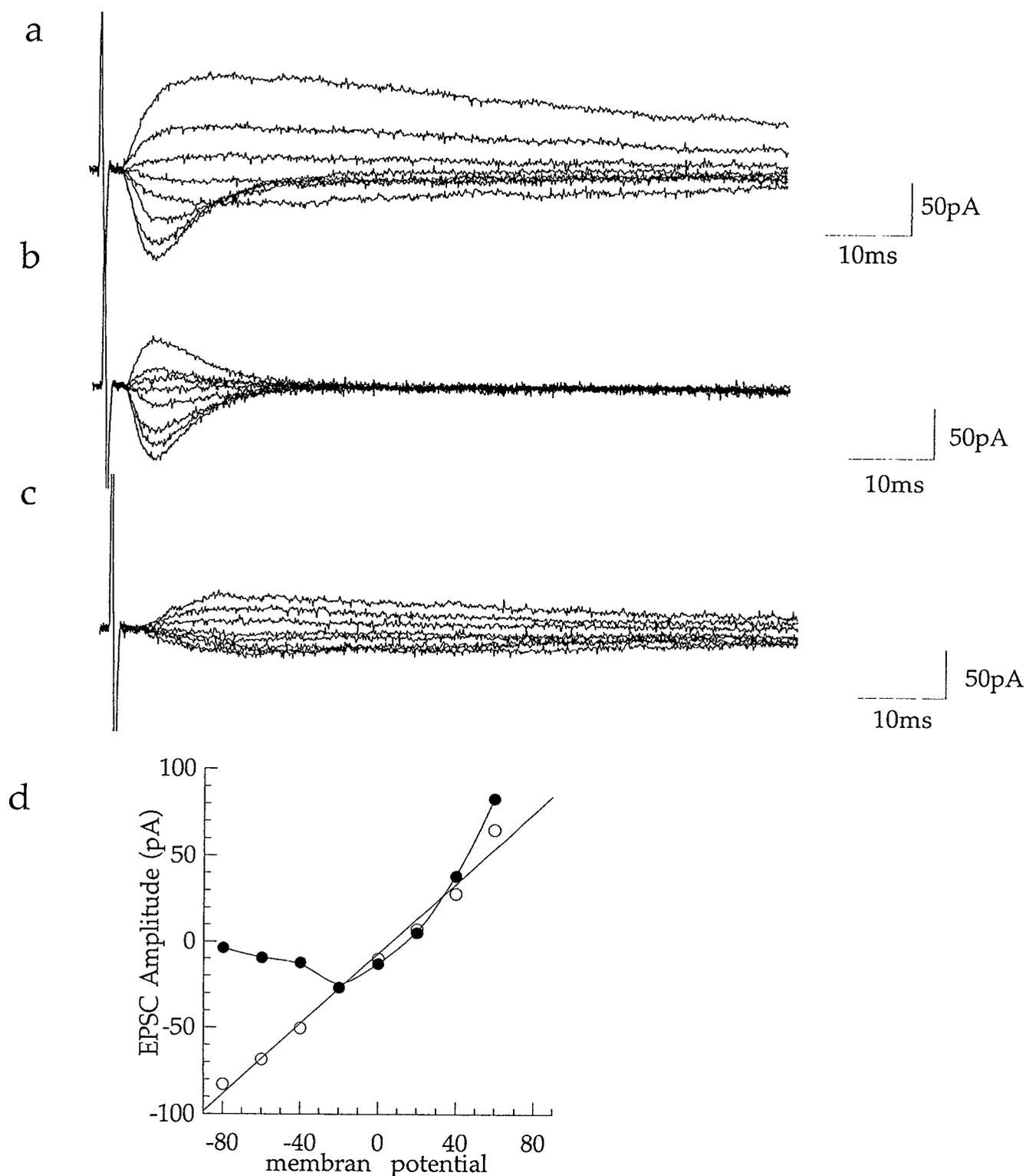


Fig. 2 興奮性シナプス後電流の性質  
膜電位を-80 から+60mV まで 20mV ずつ変えたときのシナプス後応答  
各トレースは 5 トレースの平均

- コントロール
- 100μM の APV を含むの記録外液に置換
- 5μM の CNQX を含むの記録外液に置換
- EPSCs の A/K-R 成分(立ち上がりより 4.5ms:○)と NMDA-R 成分(立ち上がりより 13ms:●)を電圧に対してのプロット

の平均振幅で有意に上昇したものを、長期増強に成功したものとした。はじめのテスト刺激に対する応答が安定しないデータは棄却した。またシリーズ抵抗が減少したデータはすべて棄却し、増加したものの内振幅上昇の判断が困難なものも棄却した。以上の条件を満足した記録中、長期増強の誘導に成功したものは 68% (16 例中 11cell) であった。また何も条件刺激を加えないものは 0% (5 例中 0) の上昇度であった。

誘導できた長期増強は、条件刺激後の振幅上昇の仕方が異なっており、大きく 2 種類に分類できた。ゆっくり 5 分から 10 分かけて振幅が上昇するものと、すぐに上昇するものであった。簡便のため前者を slow LTP、後者を fast LTP と記す。誘導できた長期増強のうち 4 例が fast LTP であり、7 例が slow LTP であった。

Slow LTP の典型例を Fig. 3 に示す。a は条件刺激前、刺激後 2 分、36 分における 12 トレースの EPSC の加算平均を重ね書きしたものである。刺激前 5 分間の平均振幅は  $-250.24 \pm 8.277 \text{ pA}$  ( $n=60$ ) でこれに対し、20 分～25 分の平均振幅は  $-373.94 \pm 9.427 \text{ pA}$  ( $n=60$ ) となり、およそ 49% の上昇であった。この記録はギガオームシールが続く限り増強は続いた。b は peak の振幅で正規化したものを重ね書きしたものである。増強後に波形が大きく変わっていた。特に減衰時間が大きくなっており、条件刺激前の減衰時間は、 $9.94 \pm 0.202 \text{ ms}$  ( $n=60$ ) に対し、長期増強後は  $12.1 \pm 0.249 \text{ ms}$  ( $n=60$ ) となった。この波形の変化は 7 例中 6 例において観察された。また、7 例の slow LTP の振幅の変化を平均したものを Fig. 6 に示す。増強は条件刺激の終了後をより、緩やかに大きくなり始め、20 分でおよそ一定状態になった。そのときの上昇度はおよそ 50% であった。

Fast LTP は刺激後すぐに EPSC が増強されたもので、1 例を示す (Fig. 4)。条件刺激前の 5 分間の平均振幅は  $-161.5 \pm 4.39 \text{ pA}$  ( $n=60$ ) で、これに対し、20 分から 25 分にかけての振幅は  $-208.0 \pm 4.27 \text{ pA}$  ( $n=60$ ) に上昇し、その上昇率はおよそ 28.8% であった。4 例の平均の変化を Fig. 6 に示すが、およそ上昇率は 20% であった。また、この例においては、あまり明らかな波形の変化を見ることはできないが、4 例中 2 例において、slow LTP と同様の減衰時間の変化が見られた。

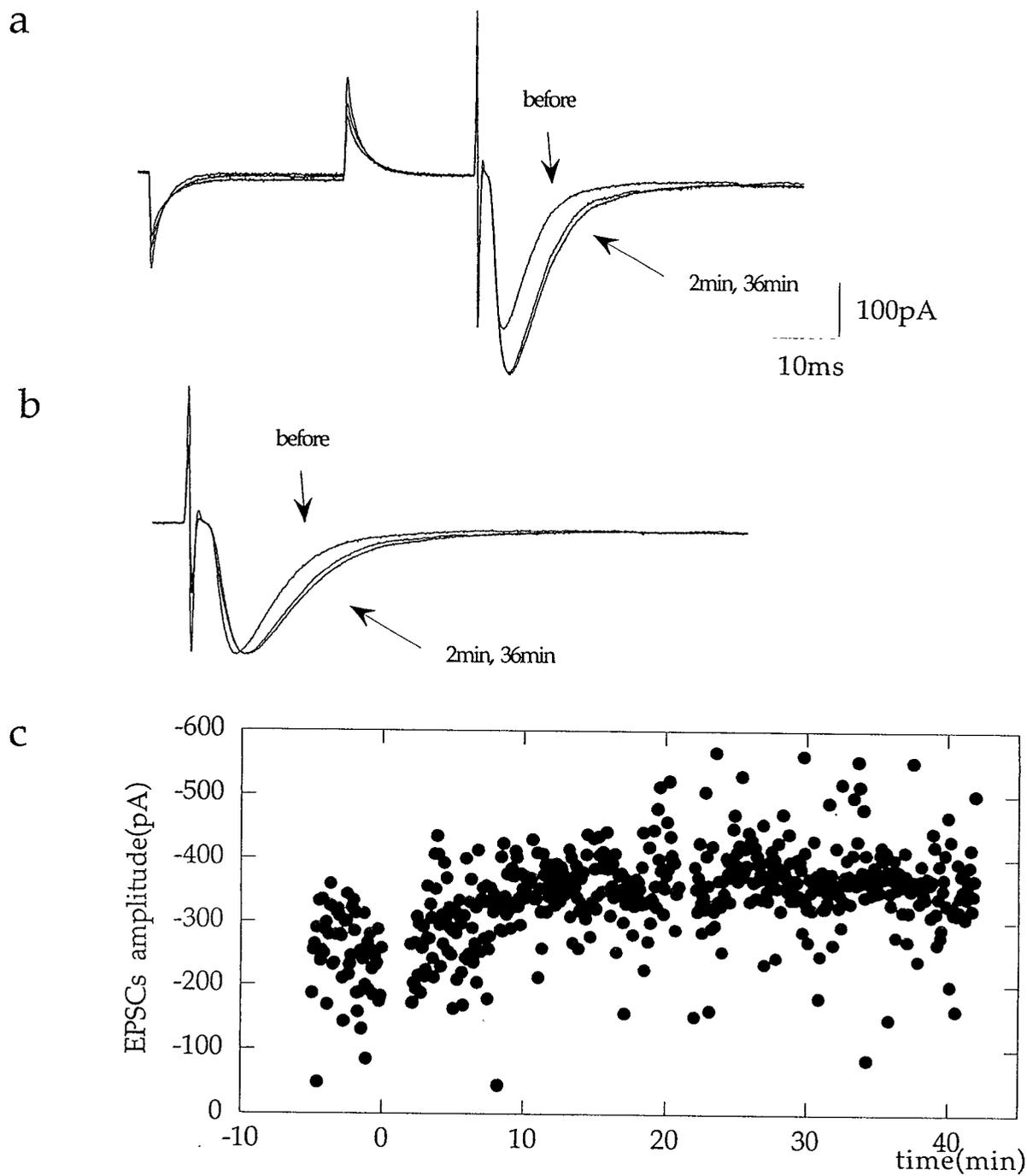


Fig. 3 slow LTP の 1 例

時刻 0 に 5Hz/300 発と脱分極を組み合わせ刺激を行った

- 条件刺激前と刺激後 2 分、36 分のトレースの重ね書き  
トレースは各時刻の 1 分間の平均
- EPSC のピーク振幅で正規化したトレースの重ね書き
- EPSC のピーク振幅の変移

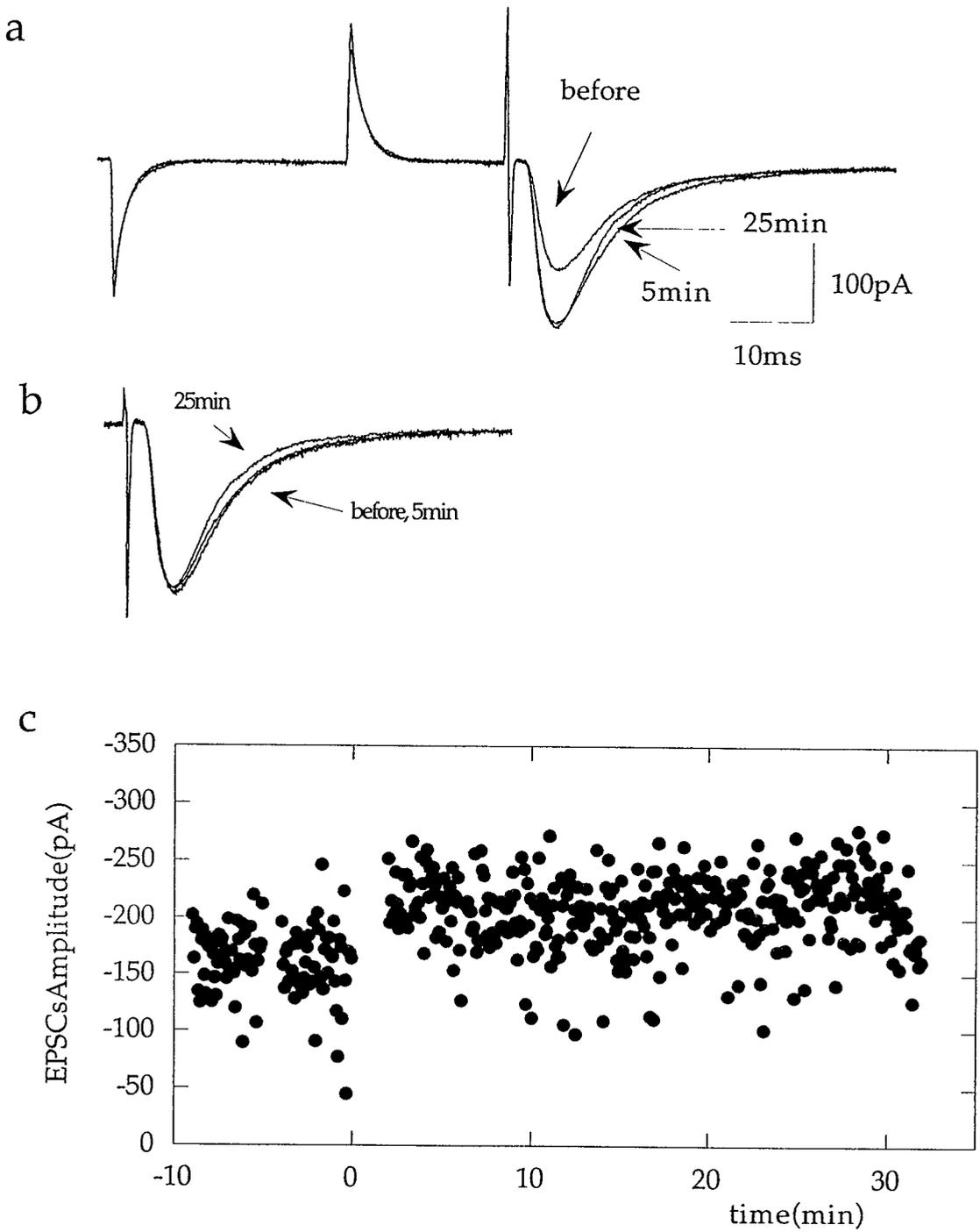


Fig. 4 fast LTP の 1 例

時刻 0 に 5Hz/300 発と脱分極を組み合わせ刺激を行った

- a. 条件刺激前と刺激後 5 分、25 分のトレースの重ね書き  
トレースは各時刻の 1 分間の平均
- b. EPSC のピーク振幅で正規化したトレースの重ね書き
- c. EPSC のピーク振幅の変移

条件刺激を加えないものに関しては大きな振幅の変化も、波形の変化も見られなかった(Fig. 5). また上昇した結果の平均を Fig. 6 にしめす.

先の分類に関わらず、11例中8例において、EPSCの波形に減衰時間が多少の差はあるが、大きくなる変化が見られた. この減衰時間の増加には次の可能性が考えられる. 1つはNMDA-R成分の増加によるもの. 2つめは、A/K-Rのチャンネル開閉のカイネティクスの変化によるもの、シリーズ抵抗の増加によるものである. 以下にその可能性について検討した.

### III NMDA-R成分のより大きい増強

長期増強を誘導することに成功したが、これらの変化が何の変化に起因するものかをさらに検討した. 増強できた11例中8例において明らかな波形の変化が確認でき、これが、NMDA-R成分の特異的増強である可能性がある. そこで、A/K-RとNMDA-Rを介する電流が増強前後で変化しているかを検討した. 条件刺激前に-70mVと+70mVにおいて記録をとり、増強誘導後にもう一度各電位において記録した(Fig. 7). aは-70mVにおけるEPSCで正規化すると僅かにではあるが増強後の波形に減衰時間が大きくなるという変化が確認できた. さらに+70mVでの波形を比較すると、増強後の波形の減衰時間が明らかに大きくなっていた(b). これは、NMDA-Rを介する電流が大きくなっていることを示唆するものである. さらにA/K-Rを介する電流はほぼ線形な電圧電流関係を持つので、+70mVの波形から-70mVの波形を減算することによりNMDA-Rを介する電流が推定できる. この推定したNMDA-R電流をcに示す. NMDA-R電流も大きくなっていることが示された. しかしながら、正規化した波形に増強前後に変化はなかった. このことはチャンネル自体の特性が変わっていないことを示唆するものである. -70mVで観測されるEPSCのピークでの電流はNMDA-Rの時間的開閉特性から、ほとんどA/K-Rを介するものである. ピークでの振幅は、170.5pAが22分後には217.4pAと増加し、約24%の上昇率であった. これに対し推定NMDA-R電流は97.94pAが132.7pAへと増加し35%の増強であった. A/K-R、NMDA-Rを介するシナプス後電流はと

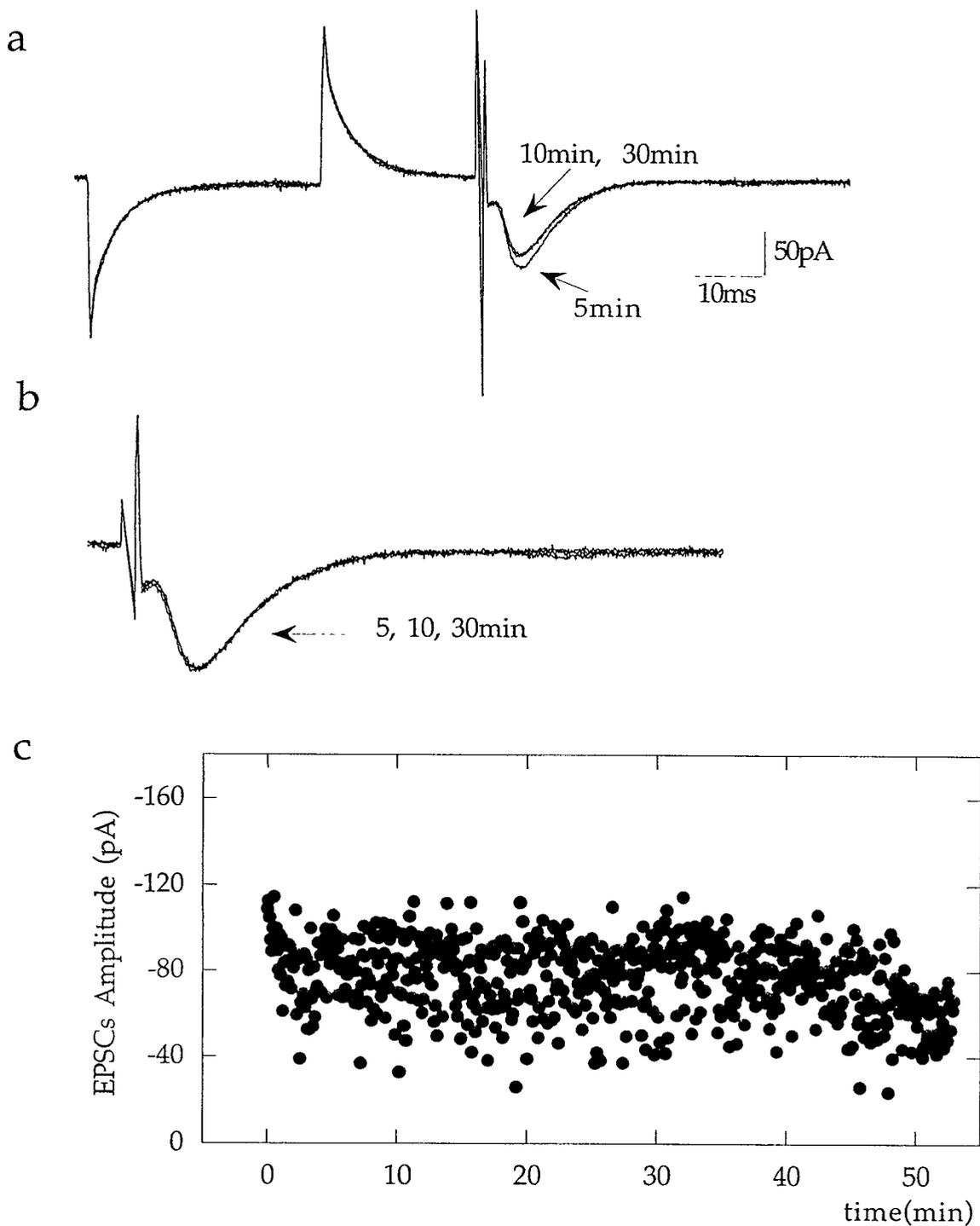


Fig. 5 コントロールの1例

テスト刺激のみを行った

- a. テスト刺激開始後5分、10分、30分のトレースの重ね書き  
トレースは各時刻の1分間の平均
- b. EPSCのピーク振幅で正規化したトレースの重ね書き
- c. EPSCのピーク振幅の変移

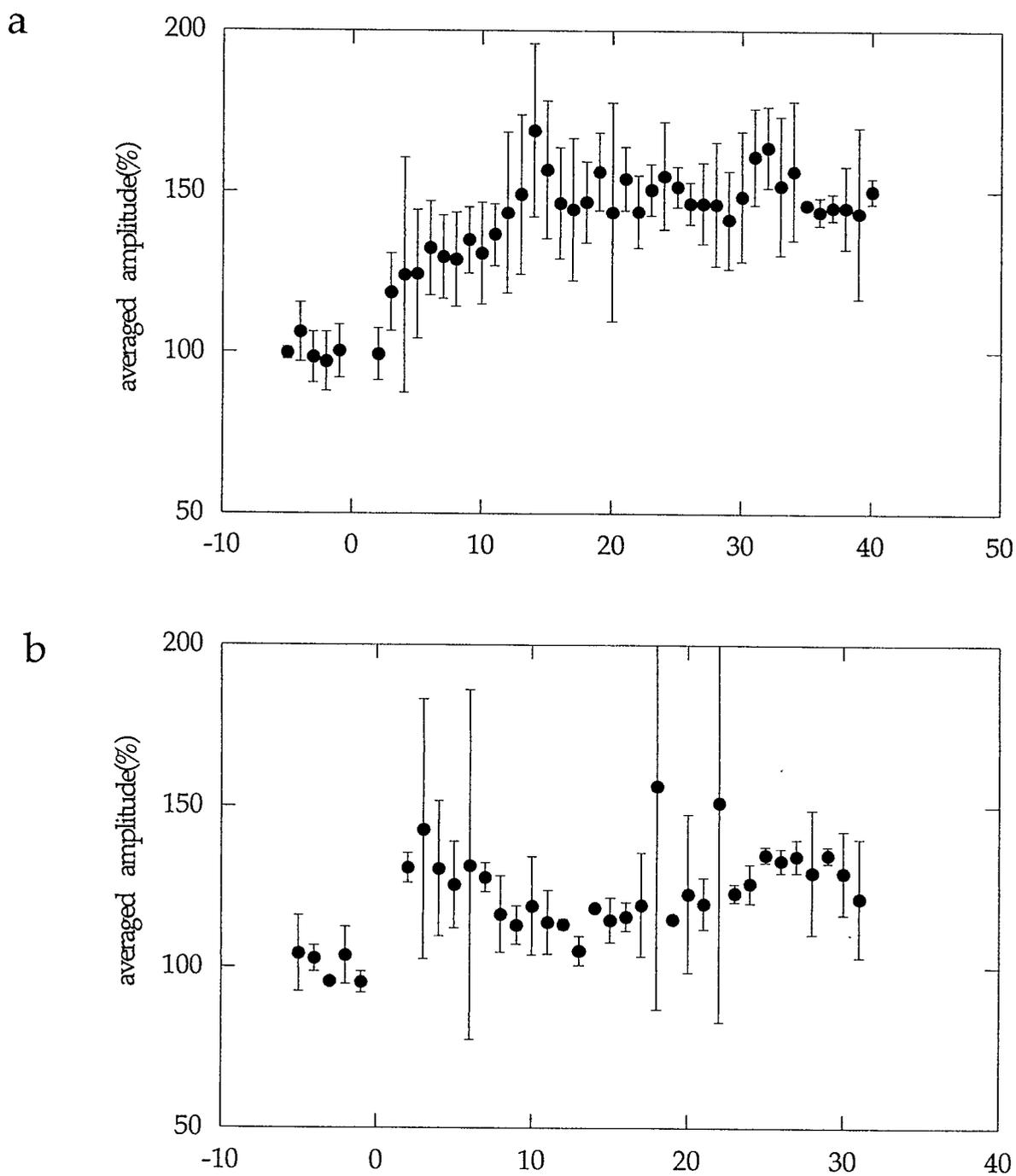


Fig. 6 slow LTP と fast LTP のまとめ

a. slow LTP (n=7)

b. fast LTP (n=4)

各細胞の記録の1分間の平均を細胞間で平均した

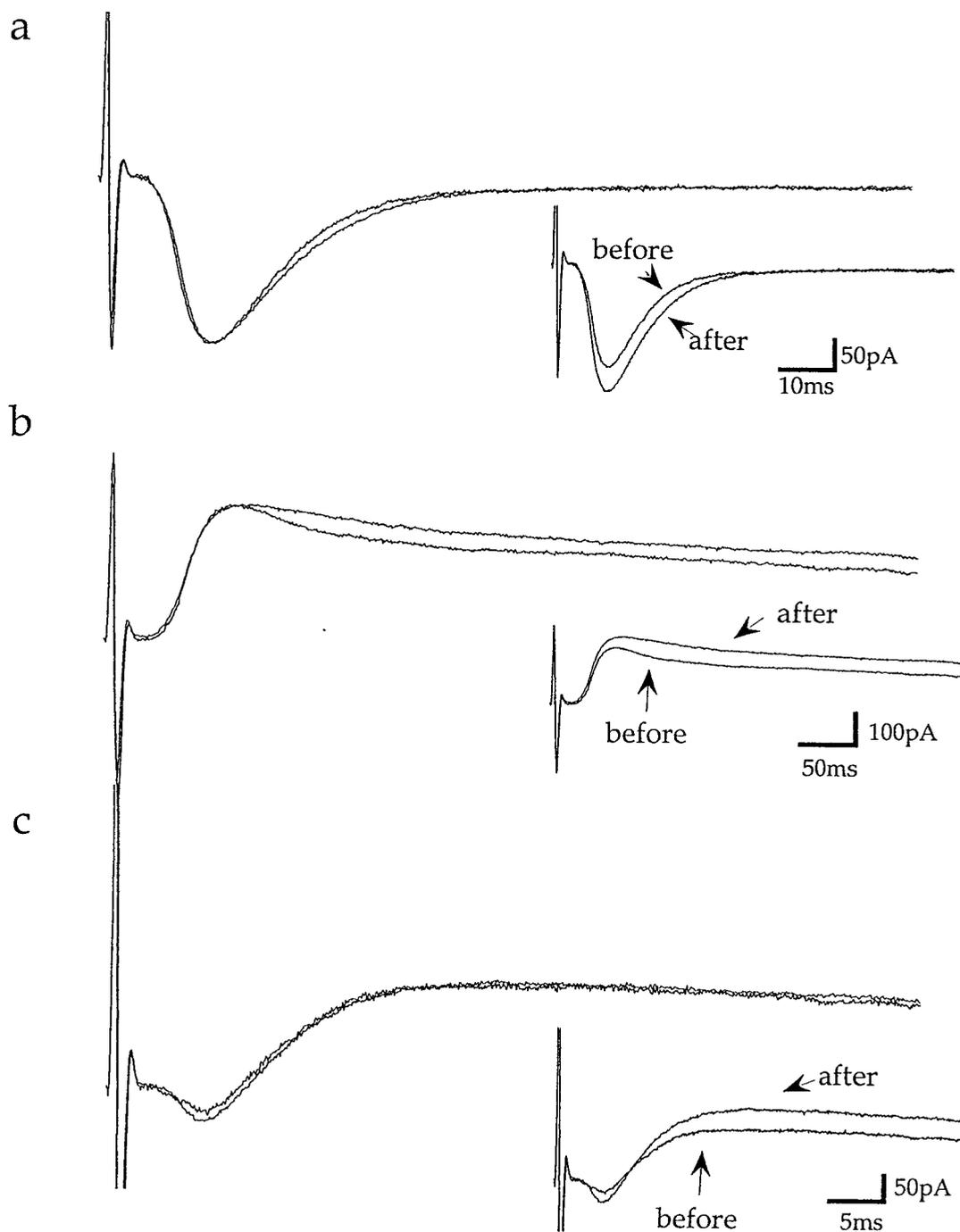


Fig. 7 長期増強の前後の A/K-R と NMDA-R 成分の比較

条件刺激を行う前と 22 分後の波形の比較・正規化波形 (left)、通常の重ね書き (right)

- a. 膜電位-70mV での EPSC
- b. 膜電位+70mV での EPSC
- c. b と c を加算したもの

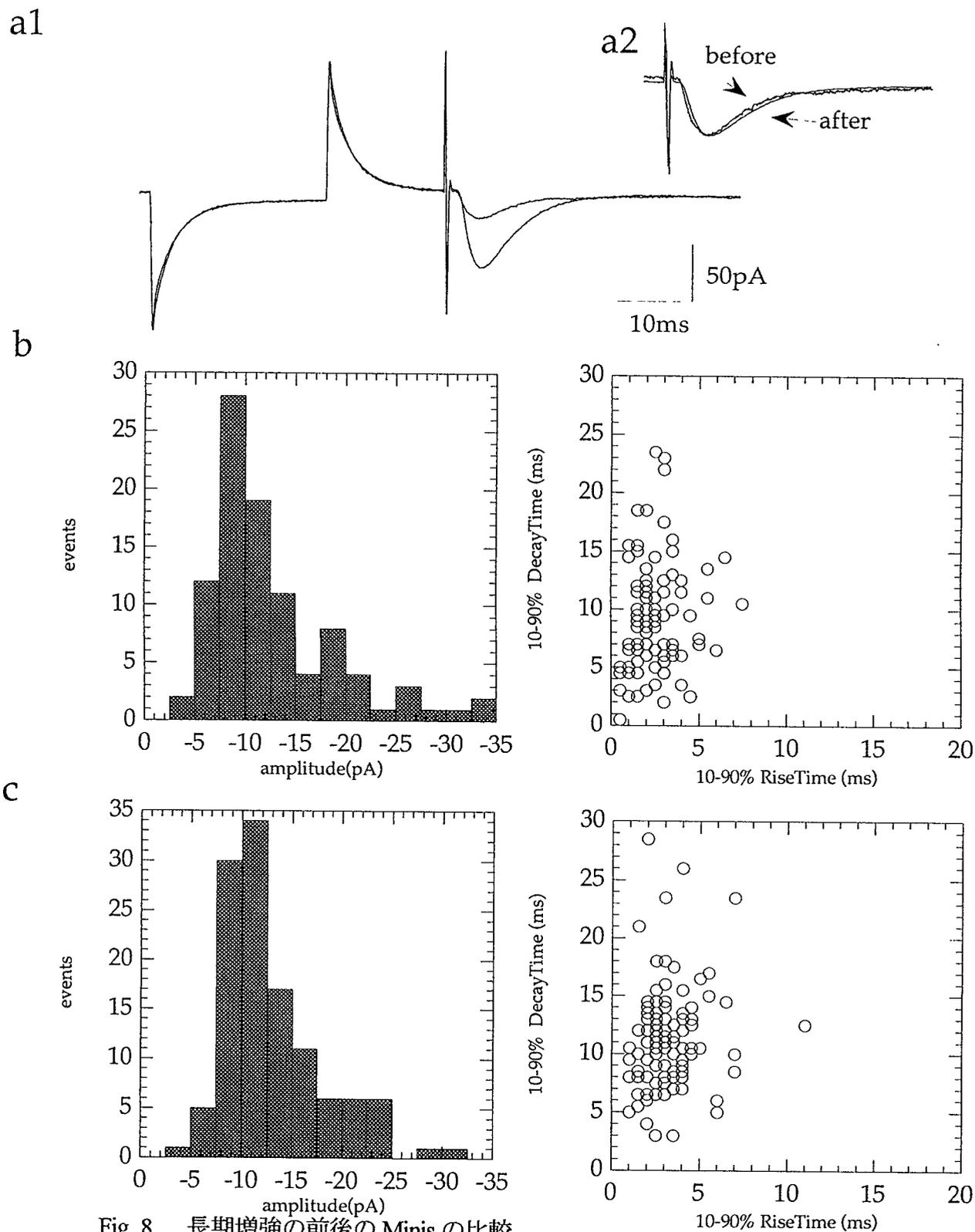


Fig. 8 長期増強の前後の Minis の比較

- a1. 増強前後のトレースの重ね書き
- a2. 増強前後の正規化したトレースの重ね書き
- b. 増強前の Minis(36 秒間)の振幅と rise time と decay time の関係
- c. 増強後の Minis の関係

もに大きくなっているが、NMDA-R を介するシナプス後電流が A/K-R を介するシナプス後電流よりもより増強を受けていることが明らかとなった。この結果は、伝達物質放出確率が大きくなったことだけでは説明がつかず、少なくともシナプス後細胞で機能的な NMDA-R の数が増えていることを示唆する結果である。この解析は 2 例中 2 例に同様の結果を得た。

#### IV 増強されない Mini の振幅

さらに Mini を用いて解析を試みた。増強したシナプスの Mini だけを測定することは不可能である。我々の用いたスライス標本では、picrotoxin を存在させているため、burst が 0.1Hz 程度で混入してくる。これを避けるために、テスト刺激後 1 秒間に含まれる Mini のみを選び、3 分間測定した。海馬スライスの実験系では、テスト刺激のみで Mini の頻度が 2 倍程度増加することが知られている (Manabe, et al 1992)。我々の系においても、テスト刺激後は Mini の出現頻度が増加していることを確認している(結果省略)。増強が誘導できたものに対して Mini を測定した (Fig. 8)。EPSC の増強前の振幅は  $-22.9 \pm 13.0$  pA (12 traces)であったのに対し、 $-70.3 \pm 26.8$  pA (12 traces)へと 200%の上昇を観測できた。このときの、Mini の平均振幅は、条件刺激前が  $-12.708 \pm 6.413$  pA (n=96)、刺激後が  $-13.053 \pm 5.018$  pA (n=118)であった。約 103%の変化であり、振幅には明らかな変化はなかった。しかし、Mini 波形には EPSC で見られたのと同様に、減衰時間の増加が観測された。EPSC の減衰時間が  $11.2 \pm 2.06$  ms (12 traces)が増強後に  $13.3 \pm 0.561$  (12 traces)となり、約 20%の増加であった。Mini の減衰時間は、条件刺激前が  $9.536 \pm 0.472$  ms (n=96)、刺激後が  $11.847 \pm 0.528$  ms (n=118)であり、およそ 24%の増加であった。計測した残り 2 例に関しても同様であった。このことは、この増強は、Mini の振幅増加を主要因としない増強であることが明らかになった。

#### V IMHV 領域におけるサイレントシナプスの存在

最近の報告で、海馬 CA1 の錐体細胞に対する入力シナプスでの長期増強で

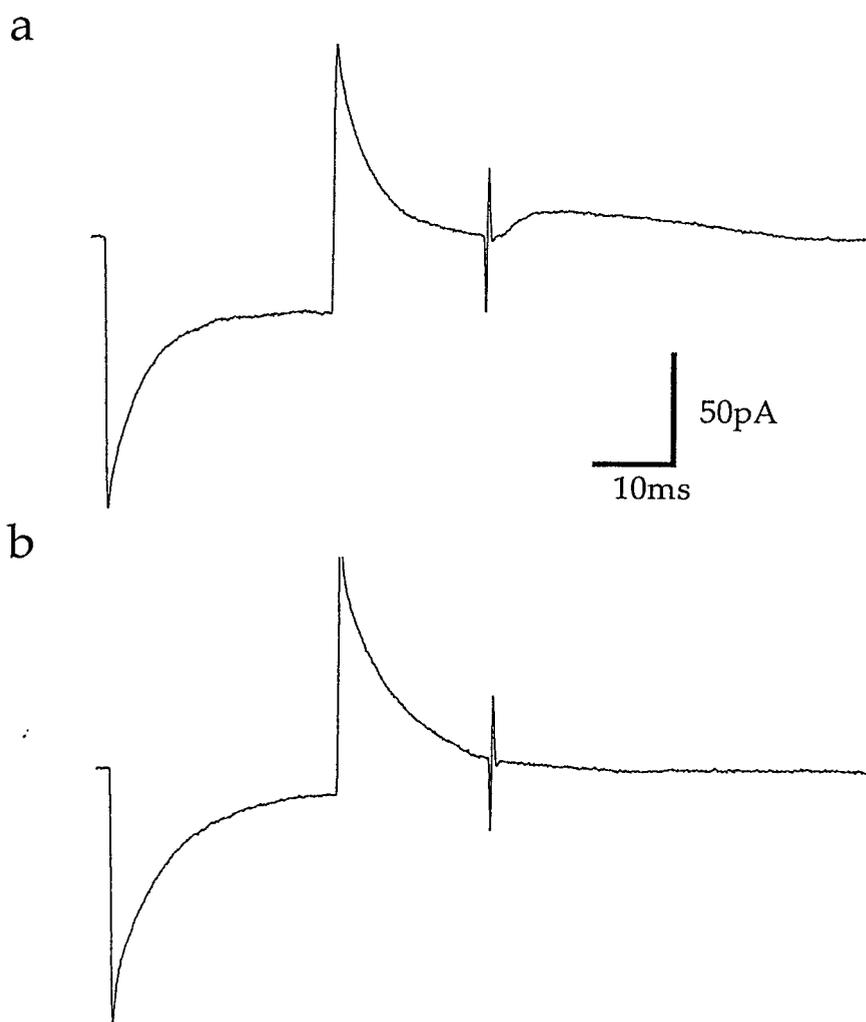


Fig.9 サイレントシナプスの存在

刺激の電流強度を徐々に強くして $3\mu\text{A}$ で惹起したシナプス後応答

a. 膜電位 $+70\text{mV}$ のシナプス後応答 (トレースは1分間の平均)

b. 膜電位 $-70\text{mV}$ のシナプス後応答

は、サイレントシナプスにおいて A/K-R が組み込まれる、もしくは活性化されることにより発現していることが示された(Issac, et al. 1995; Liao, et al. 1995). 我々の観測している長期増強の発現メカニズムにもサイレントシナプスが関与している可能性がある. そこでサイレントシナプスの有無を調べた. CsMS5 電極内液を用い、+60mV に電位固定した. 刺激電流量を徐々に増加させてシナプス後応答を測定した. 通常、-60mV にてシナプス後応答を記録するためには通常 5 から 10 $\mu$ A の電流を必要とするが、2 から 3 $\mu$ A の電流でなだらかな立ち上がりのシナプス後応答を記録することに成功した(Fig. 9). このシナプス後応答は過分極に電位固定した際には見られなかった. 遅い立ち上がりと大きな減衰時間より NMDA-R を介したものと考えられる. +60mV に長時間電位固定し記録をすることは困難なため、阻害剤による確認は行っていない. また、このサイレントシナプスは比較的簡単に探すことが可能であった.

## 第4節 考察

ヒヨコ IMHV 領域における主な興奮性シナプス伝達はグルタミン酸作動性シナプスで A/K-R、NMDA-R を持つデュアルコンポーネントシナプスであることを確認した。このシナプスにおける長期増強を 5Hz/300 発とシナプス後細胞の脱分極刺激により誘導することが出来た。増強の変化の仕方は2種類に分類したが、分類に関わらず多くの増強例において、EPSC の減衰時間の増加が観察できた。また、増強の前後で A/K-R を介する電流と NMDA-R を介する電流を比較したところ、NMDA-R を介するシナプス後電流の方がより増強されていることがわかった。さらに Mini の解析により、A/K-R 電流を介する電流が大きくなっていないことが明らかとなった。

### I fast LTP と slow LTP に関して

5Hz/300 発の刺激により長期増強を誘導でき、増強の仕方は2種類に分類できた。しかしながら現段階においてその差を生むメカニズムに関しては不明である。発生期に見られる長期増強として報告があるのは、視蓋から外側膝状体への入力シナプス(Mooney, et al. 1993)、視床から大脳皮質体性感覚野への入力シナプス(Crair and Malenka 1995)である。これらの長期増強における増強の時間経過は、ゆっくりとしたものであり、我々が今回観測した slow LTP と同様である。しかもともに NMDA-R 依存的な発現機構であることも一致している。海馬の LTP の発現にはキナーゼによる A/K-R 等のリン酸化が第一ステップであると有望視されているが、このゆっくりとした時間経過は、単純なチャンネル等のリン酸化によるものにしては時間がかかりすぎていると考えられる。新しくシナプスを形成する、シナプス部位の数が増加する、または現存のシナプスの密度が変わるといった形態的变化を伴うために時間を要している可能性がある。これに関しては、今後検討を要する点である。また fast LTP は海馬で見られる長期増強と同じような時間経過である。IMHV で両方のタイプの長期増強が見られる原因は不明であるが、1つにどの種類

の細胞間のシナプスを見ているかが同定できていないためであると思われる。我々の用いた刺激方法では IMHV 領域内を刺激しているため領域外からなのか、領域内の細胞間のシナプスなのかは正確には区別できない。スライスの切断方向から考えると領域外からの投射は切断されていることが考えられるが、正確な 3 次元的投射地図が明らかになっていない現状では、断言できない。slow と fast LTP の発現の差は見ている細胞種間の違いによるものかも知れない。現在、DiI を用いて逆行性に標識することにより、入力繊維の 3 次元マップの作成を試みている。

## II 発現部位について

増強の前後の波形より、NMDA-R を介するシナプス後電流が A/K-R を介するシナプス後電流より大きくなっている結果を得た。この現象は単純に伝達物質放出確率の上昇だけでは説明できない。通常 A/K-R と NMDA-R のグルタミン酸に対する親和性は NMDA-R の方が 100 倍程度高い。またシナプス間隙内のグルタミン酸濃度は数 mM 程度であることが推測されている。各受容体  $K_d$  値から考えて、同じシナプス部位内に伝達物質が放出される範囲内においては、NMDA-R の応答が、A/K-R の応答を上回ることはあり得ない。また、NMDA-R 電流の振幅が増強されているにも関わらず、波形に変化がないことは、チャンネル自体の開閉のカイネティクスが変化していないことを示唆すること実である。ただし、チャンネルコンダクタンスの増加に伴い開閉のカイネティクスが変化しないことはあり得ないことを仮定している。以上のより考察から、NMDA-R の数が増加したと考えるのが適当である。この数の増加は 1 つのシナプス部位における増加、もしくは、NMDA-R を持つシナプス部位の増加でもよい。

A/K-R 成分は、Mini の振幅が大きくなっていないことより、残される可能性は、伝達物質放出確率の上昇かシナプス部位の増加のいずれか、もしくは両方である。しかしながら Mini の出現頻度の顕著な増加は観測されなかったことから、シナプス部位の増加の可能性が高い。また、サイレントシナプスの存在を確認しており、海馬におけるサイレントシナプスの活性化と同様のことが起きているとすれ

ば、サイレントシナプスに機能的な A/K-R の組み込みによって、シナプス部位の増加が起きることになる。サイレントシナプスに条件刺激を行い、非サイレントシナプスに換えることが出来るかを検討中である。

-70mV において観測される EPSC の減衰時間の増加は、何に起因するのであるか。可能性としては、シリーズ抵抗の上昇、NMDA-R の寄与増大、チャンネルのカイネティクスの変化と電位固定の問題である。上記した通り、脱分極時の波形が大きく変化していることより、NMDA-R が増加していることは確実であるが、このことが過分極時に見られる減衰時間の増加を引き起こすであろうか。Fig. 2 に示した通り過分極では全く電流を流さない訳ではない。この成分が増加した際に EPSC の減衰時間に影響を及ぼすことは十分に考えられる。またシリーズ抵抗の上昇も関与していると考えれる。シリーズ抵抗は一貫して上昇の傾向を持っている。しかしながら Fig. 3 の場合、条件刺激前は推定シリーズ抵抗は  $36\text{M}\Omega$  から刺激後は  $39\text{M}\Omega$  に増加している(8%)。Major らは、モデルセルを使って、シリーズ抵抗の減衰時間に及ぼす影響を見積もっている (Major 1993) 。この場合、シリーズ抵抗と減衰の時定数は線形の関係になることを示している。従ってこの場合、時定数は 108% の増加が予想される。しかしながら実際の減衰時間は  $9.94\text{ms}$  から  $12.1\text{ms}$  へと増加した(22%)(時定数は  $6.39\text{ms}$  から  $8.19\text{ms}$  で 28%)。この増加は、シリーズ抵抗だけの变化では説明できない。チャンネルカイネティクスが変化した場合にこの変化が説明できるかについてであるが、Ambros-Ingerson らは A/K-R を 5 状態と仮定してシュミレーションを行い、開閉速度の増加、伝達物質濃度の増加、脱感作と再感作の rate の減少が起きた際にどのような波形の変化として現れるかを計算している (Ambros-Ingerson and Lynch 1993) 。その結果、振幅が大きくなり、減衰時間の増加として現れるのは、開閉速度の増加と脱感作と再感作の速度の減少が同時に起こった時に起こりうることを示している。故に、我々の結果は A/K-R のカイネティクスが変化したためであるとも説明可能である。しかしながら、彼らの計算では必ず振幅が大きくなるので、Mini の振幅が変化していない我々の結果と矛盾を起こす。よって、チャンネルカイネティクスの変化を主たる要因とは判断できない。つぎに電

位固定の問題がある。IMHV の神経細胞は非常に発達した樹状突起を持つマルチポラーである。シナプス部位が細胞体より遠いところであると完全に電位固定が出来ていない可能性がある。実際、主要な陽イオンが  $K^+$  の細胞内液を用いた場合には、強いシナプス入力に対してはナトリウムスパイクが観察されることもあった。これは、電位固定が十分に出来ていないことを示唆するものである。本研究で用いた電極内液は  $Cs^+$  が主要イオンであり、電位固定の問題は大きく改善されているはずである ( $Cs^+$  を用いての細胞の膜抵抗は 500 から 1000  $M\Omega$  であった) (Spruston, et al. 1994) . しかしながら、樹状突起のケーブル特性と固定電流のシリーズ抵抗による電位降下による膜電位上昇、それに伴う NMDA-R の活性化が起こり、EPSC の波形の変化を引き起こしている可能性がある。しかしながら、10pA 程度の Mini の波形にも減衰時間の差が現れるので、電位固定の問題だけでは説明できない。しかし、これは Fig. 8 の EPSC と Mini の減衰時間の差を生む原因になりうる。以上、明白に要因を限定することは困難であるが、NMDA-R の寄与が、大きな要因であると考えられる。

以上、長期増強の発現機構の解析結果をまとめると、「A/K-R を含むシナプス部位が増え、伝達物質放出によって活性される NMDA-R の数がふえる」である。以上をもとにモデルを Fig. 10 にしめす。

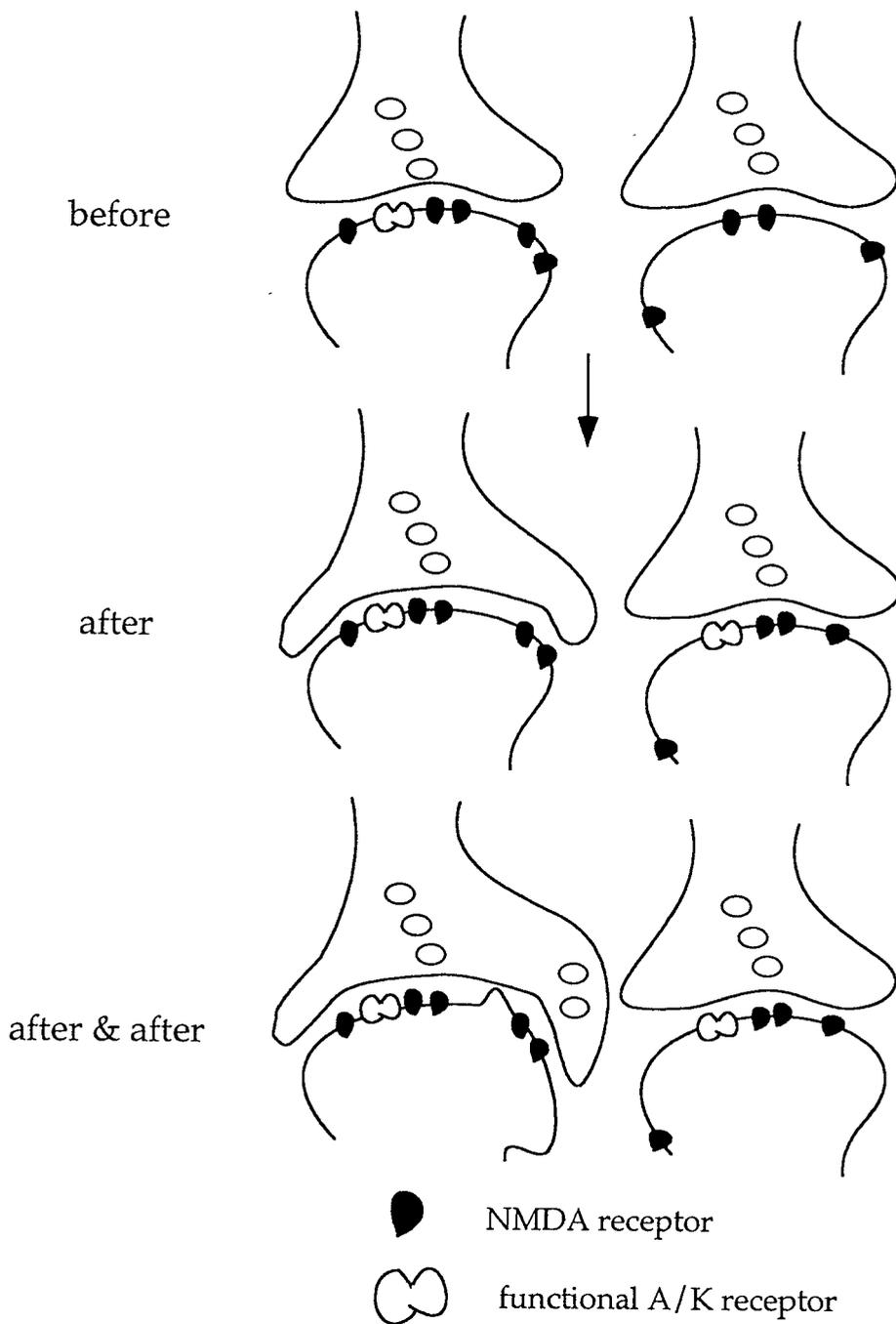


Fig.10 長期増強のモデル

増強後にサイレントシナプスが非サイレントシナプスになる事と、シナプスの形態変化によって NMDA-R を介するシナプス電流が増える、さらにこの NMDA-R の存在部位がシナプスとなる。

## 第五章 総括

デュアルコンポーネントシナプスのシナプス形成と可塑性について研究を行い、要約すると以下の結果が得られた。

### ニワトリ胚終脳解離培養系をもちいての研究

1. 機能的なシナプス形成は、シナプス後細胞の E.E.Days に依存する。
2. E.E.Days 11 の神経細胞は、機能的な A/K-R を発現しているにも関わらず、サイレントシナプスを形成しうる。
3. E.E.Days 15 から 17 にかけての A/K-R を介するシナプス電流の増加は、2種類のシナプス伝達（活動電位を伴うシナプス伝達と自発的なシナプス小胞の放出による伝達）に依存した異なる成熟過程による

### ヒヨコ IMHV 領域を含むスライス標本を用いての研究

4. 5Hz/300 発とシナプス後細胞の脱分極を組み合わせた刺激により長期増強を誘導できる。
5. 長期増強においては NMDA-R と A/K-R を介するシナプス後電流の両方が増強されたが、前者の方が増強度は大きい。
6. サイレントシナプスが存在する。

長期増強において、NMDA-R の増加が実験結果から示唆されたが、これは NMDA-R のシナプス部位における増加、もしくは、サイレントシナプスの形成を示唆している。一方、シナプス形成の解析において、サイレントシナプスの形成が、シナプス後細胞の成熟に依存している結果を得た。この2つの現象には関連が考えられる。このサイレントシナプスが培養系で解析できる事は、シナプスの可塑的な現象の分子レベル、細胞レベルのメカニズム解明に有用であり、今後の解析が重要な知見を提供するものと期待される。

## 第六章 論文発表と学会発表

### 論文発表

- 1 Tokioka, R., Matsuo, A., **Kiyosue, K.**, Kasai, M., Taguchi, T.  
Synapse formation in dissociated cell cultures of embryonic chick cerebral neurons. Dev. Brain Res. (1993)74: 146-150.
- 2 Taguchi, T., Bo, X-X, Taniguchi, H., **Kiyosue, K.**, Kudoh, S., Yumoto, N., Tatsu, Y., Yamamoto, H., Kasai, M., Yoshikawa, S.  
Analysis of synaptogenesis in vitro by peptides relating to cell adhesion. Peptide chemistry (1995) 1994: 145-148.
- 3 Sato, S. B., **Kiyosue, K.**, Taguchi, T., Kasai, M., Toyama, T.  
Okadaic acid gives concentration-dependent reciprocal effects on the fluid phase endocytosis activated by Ca<sup>2+</sup> and phorbol, 12-myristate-13-acetate. J. Cellular Physiology (1995) in press
- 4 **Kiyosue, K.**, Kasai, M., Taguchi, T.  
Two modes of activity-dependent synaptogenesis of cerebral neurons *in vitro*. NeuroReport (1996) in press
- 5 **Kiyosue, K.**, Kasai, M., Taguchi, T.  
Prior existence of NMDA receptors in early developmental stage of dual component synapse. (1996) submitted
- 6 **Kiyosue, K.**, Shimabayashi, E., Kasai, M., Taguchi, T.  
Enhancement of NMDA-R mediated synaptic currents with expression of long term potentiation in chick IMHV region. (1996) to be submitted

### 国際学会発表及び国際誌要旨掲載の学会発表

- 1 Tokioka, R., Matsuo, A., **Kiyosue, K.**, Taguchi, T., Kasai, M.  
Synapse formation in chick cerebral neurons.  
Neuroscience Res. (1992) 17, s91.
- 2 Taguchi, T., **Kiyosue, K.**, Kudoh, S., Kasai, M.

- Analysis of synapse formation in dissociated chick cerebral neurons.  
First East Asian Symposium on Biophysics (1994) p141
- 3 Taguchi, T., Kudoh, S., Matsuo, A., **Kiyosue, K.**, Kasai, M.  
Long-term change of synaptic efficacy in dissociated cerebral neurons.  
Neuroscience Res. (1993) 18, s151.
- 4 Taguchi, T., **Kiyosue, K.**, Kudoh, S., Kasai, M.  
Synaptogenesis and synaptic plasticity in dissociated chick cerebral neurons.  
Society for Neuroscience abstracts (1994) 20: 450.12.
- 5 Bo, X-X, **Kiyosue, K.**, Kudoh, S., Kasai, M., Taguchi, T.  
Synapse formation in vitro under glia-free condition.  
Neuroscience Res. (1994) 19: s45.
- 6 **Kiyosue, K.**, Kasai, M., Taguchi, T.  
Activity-dependent synaptogenesis in dissociated cell culture of chick cerebral neurons.  
4th IBRO World Congress of Neuroscience (1995) B2.10.
- 7 Bo, X-X, Taniguchi, H., **Kiyosue, K.**, Kudoh, S., Kasai, M., Yoshikawa, S.,  
Taguchi, T.  
Synaptogenesis in glia-free neuronal culture systems.  
4th IBRO World Congress of Neuroscience (1995) B2.6.
- 8 Kudoh, S., **Kiyosue, K.**, Kasai, M., Taguchi, T.  
Long-term increase in synaptic activity of dissociated chick cerebral neurons  
induced by Mg<sup>2+</sup>-free solution.  
4th IBRO World Congress of Neuroscience (1995) B3.48.
- 9 **Kiyosue, K.**, Shimabayashi, E., Kasai, M., Taguchi, T.  
Analysis of long term potentiation in chick IMHV region.  
IBRO Satellite Symposium (1995) 40.
- 10 **Kiyosue, K.**, Kasai, M., Taguchi, T.  
Postsynapse-dependent synaptogenesis in dissociated cell culture.

- Society for Neuroscience 25: 324.13(1995)
- 11 Shimabayashi, E., Kiyosue, K., Kasai, M., Taguchi, T.  
Analysis of long term potentiation in the chick IMHV region.  
Society for neuroscience 25: 712.18 (1995)
- 12 Kudo, S., Kiyosue, K., Kasai, M., Taguchi, T.  
Synaptic plasticity in dissociated chick cerebral neurons induced by Mg<sup>2+</sup>-free medium.  
Society for neuroscience 25: 523.3 (1995)
- 13 Synapse-formation in a glia-free culture of dissociated chick cerebral neurons.  
Taguchi, T., Bo, X.-X., Taniguchi, H., Kiyouse, K., Kudoh, S., Murase, S.  
Society for neuroscience 25: 701.9 (1995)

#### 国内学会発表

- 1 時岡良、松尾明、清末和之、田口隆久、葛西道生  
ニワトリ胚培養大脳皮質神経細胞のシナプス形成の解析  
第16回日本神経科学学会 (1992) 大阪
- 2 清末和之、葛西道生、田口隆久  
In vitro におけるシナプス成熟とカルシウム関与  
第31回日本生物物理学会 (1993) 名古屋
- 3 田口隆久、工藤卓、松尾明、清末和之、葛西道生  
培養神経細胞系におけるシナプス伝達効率の長期変化  
第17回日本神経科学大会 (1993) 名古屋
- 4 田口隆久、薄暁雪、谷口弘志、清末和之、工藤卓、湯本昇、達吉郎、山本仁、吉川暹  
Analysis of synaptogenesis in vitro by peptides relating to cell adhesion.  
第32回ペプチド化学討論会 (1994) 福岡
- 5 薄暁雪、清末和之、工藤卓、葛西道生、田口隆久  
グリア非存在下でのシナプス形成  
第18回日本神経科学大会 (1994) 東京

- 6 工藤卓、清末和之、葛西道生、田口隆久  
Mg<sup>2+</sup>-free 溶液により誘導される培養大脳神経細胞の長期増強現象  
第34回日本生物物理学会 (1994) 横浜
- 7 清末和之、嶋林英子、葛西道生、田口隆久  
ヒヨコ IMHV 領域における長期増強の解析  
第35回日本生物物理学会 (1995) 札幌

## 第七章 参考文献

- Ambros-Ingerson, J., and Lynch, G. (1993). Channel gating kinetics and synaptic efficacy: A hypothesis for expression of long-term potentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 7903-7907.
- Banker, G., and Goslin, K. (1991). *Characterization and studying neuronal cultures. Culturing nerve cells.* The MIT Press. London, pp75-109
- Basarsky, T.A., Parapura, V., and Haydon, P.G. (1994). Hippocampal synaptogenesis in cell culture: developmental time course of synapse formation, calcium influx, and synaptic protein distribution. *J. Neurosci.* 14, 6402-6411.
- Bashir, Z.I., Alford, S., Davis, S.N., Rndall, A.D., and Collingridge, G.L. (1991). Long-term potentiation of NMDA receptor mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 349, 156-158.
- Bateson, P.P.G., G.Horn, G. and Rose, S.P.R.(1972). Effect of early experirnce on regional incorporation of precursors into RNA and protein in the chick brain. *Brain Research* 39, 449-465.
- Bekker, J.M., and Stevens, C.F. (1989). NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus. *Nature* 341, 230-233.
- Betz, H., Kuhse, J., Schmieden, V., Malosio, M.L., Langosch, D., Prior, P., Schmitt, B., and Kirsch, J. (1991). How to build a glycinergic postsynaptic membrane. *J Cell Sci Suppl* 15, 23-5.
- Bliss, T.V.P., and Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
- Bolhuis, J.J. (1991). Mechanisms of avian imprinting: a review. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 66, 303-345.
- Bradley, P.M. (1985). A light and electron microscopic study of the hyperstriatum ventrale in the chick. *Dev.Brain Res.* 41, 83-88.
- Bradley, P.M., Burns, B.D., King, T.M., and Webb, A.C. (1993). NMDA-receptors and potentiation in an area of avian brain essential for learning. *Neuroreport* 5, 313-316.
- Bradley, P.M., Burns, B.D., Titmuss, J., and Webb, A.C. (1992). Protein kinase activity and

synaptic plasticity in a chick brain slice. *Neuroreport* 3, 227-230.

Bradley, P.M., Burns, B.D., and Webb, A.C. (1991a). Potentiation of synaptic responses in slices from the chick forebrain. *Proc. R. Soc. Lond. B* 243, 19-24.

Bradley, P.M., Davis, D.C., and Horn, G. (1985). Connection of the hyperatrium ventrale of the domestic chick. *J.Anat.* 140, 577-589.

Bradley, P.M., Delisele, B.B., and Webb, A.C. (1991b). The effect of age and visual experience on potentiation of responses in slices from the chick forebrain. *Proc. R. Soc. Lond. B* 243, 25-30.

Budnik, V., Zhong, Y., and Wu, C. (1990). Morphological plasticity of motor axons in *Drosophila* mutants with altered excitability. *J. Neurosci.* 10, 3754-3768.

Campenot, R.B. (1987). Local promotion of neurite sprouting in cultured sympathetic neurons by nerve growth factor. *Dev. Brain Res.* 37, 293-301.

Clements, J.D., Lester, R.A.J., Tong, G., Jahr, C.E., and Westbrook, G.L. (1992). The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258, 1498-1501.

Cline, H.T., and Constantin-Paton, M. (1989). NMDA receptor antagonists disrupt the retinotectal topographic map. *Neuron* 13, 413-426.

Collingridge, G.L., Herron, C.E., and Lester, R.A.J. (1988). Synaptic activation of N-methyl-D-aspartate receptors in the Schaffer collateral-commissural pathway of rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* 399, 283-300.

Colman, H., and Lichtman, J.W. (1993). Interactions between nerve and muscle: synapse elimination at the developing neuromuscular junction. *Dev. Biol.* 156, 1-10.

Craig, A.M., Blackstone, C.D., Huganir, R.L., and Banker, G. (1993). The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. *Neuron* 10, 1055-1068.

Crair, M., and Malenka, R.C. (1995). A critical period for long term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature* 375, 325-328.

Dale, N., and Roberts, A. (1985). Dual-component amino-acid-mediated synaptic potentials; excitatory drive for swimming in *Xenopus* embryos. *J. Physiol. (Lond.)* 363, 35-59.

Dahm, L.M., and Landmesser, L.T. (1991). The regulation of synaptogenesis during normal development and following activity blockade. *J. Neurosci.* 11, 238-255.

Edwards, F.A., Konnerth, B., Sakmann, B., and Takahashi, T. (1989). A thin slice preparation for patch clamp recording from neurons of mammalian central nervous system. *Pflügers Arch.* 414, 600-612.

Ferns, M.J., Campanelli, J.T., Hoch, W., Scheller, R.H., and Hall, Z. (1993). The ability of agrin to cluster AChRs depends on alternative splicing and on cell surface proteoglycans. *Neuron* 11, 491-502.

Fletcher, T.L., De, C.P., and Banker, G. (1994). Synaptogenesis in hippocampal cultures: evidence indicating that axons and dendrites become competent to form synapses at different stages of neuronal development. *J. Neurosci.* 14, 6695-6706.

Forsthe, I.D., and Westbrook, G.L. (1988). Slow excitatory postsynaptic currents mediated by N-methyl-D-aspartate receptors on cultured mouse central nervous system. *J. Physiol. (Lond.)* 396, 515-533.

Fox, K., Sato, H., and Daw, N.W. (1989). The location of and functional of NMDA receptors in cat and kitten visual cortex. *J. Neurosci.* 9, 2443-2454.

Froehner, S.C. (1993). Regulation of ion channel distribution at synapses. *Annu. Rev. Neurosci.* 347-368.

Hall, Z.W., and Sanes, J.R. (1993). Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell* 72 /*Neuron* 10, 99-121.

Hamill, O., Mary, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85-100

Haydon, P.G., and Drapeau, P. (1995). From contact to connection: early events during synaptogenesis. *Trends Neurosci.* 18, 196-201.

Hestrin, S. (1992a). Activation and desensitization of glutamate-activated channels mediating fast excitatory synaptic currents in the visual cortex. *Neuron* 9, 991.

Hestrin, S. (1992b). Developmental regulation of NMDA receptor-mediated synaptic currents at a central synapse. *Nature* 357, 686-689.

Hestrin, S., Sah, P., and Nicoll, R., A (1990). Mechanisms generating the time course of dual component excitatory synaptic currents recorded in hippocampal slices. *Neuron* 5, 247-253.

Horan, P.K., Melnicoff, M.J., Jensen, B.D., and Slezak, S.E. (1990). Fluorescent cell labeling for in vivo and in vitro cell tracking. *Methods in Cell Biology* 33, 469-490.

- Horn, G., Bradly, P., and Bateson, P.P.G. (1986). Changes in the structure of synapses associated with learning. *J. Neurosci.* 5, 3161-3168.
- Issac, J.T.R., Nicoll, R.A., and Malenka, R.C. (1995). Evidence for silent synapse: Implications for the Expression of LTP. *Neuron* 15, 427-434.
- Jia, X., GrocZYca, M., and Budnik, V. (1993). Ultrastructure of neuromuscular junctions in *Drosophila*: comparison of wild type and mutants with increased excitability. *J. Neurobiol.* 24, 1025-1044.
- Jonas, P., Major, G., and Sakmann, B. (1993). Quantal components of unitary EPSC at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* 472, 615-663.
- Kauer, J.A., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1988). A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron* 1, 911-917.
- Kehoe, J. (1972). The physiological role of three acetylcholine receptors in synaptic transmission in *Aplysia*. *J. Physiol. (Lond.)* 225, 115-146.
- Kohsaka, S., K., Takaamstu, E., Aoki, Y., Tsukada (1979). Metabolic mapping of chick brain after imprinting using [<sup>14</sup>C]2-deoxyglucose technique. *Brain Research* 172, 539-544.
- Korn, H., Mallet, A., Triller, A., and Faber, D.S. (1982). Transmission at a central inhibitory synapse. 2. Quantal description of release, with physical correlate for binomial n. *J. Neurophysiol.* 48, 679-707.
- Kullmann, D.M. (1994). Amplitude fluctuations of dual-component EPSC in hippocampal pyramidal cells: implications for long-term potentiation. *Neuron* 12, 1111-1120.
- Kraszewski, K., and Grantyn, R. (1992). Development of GABAergic connections in vitro: increasing efficacy of synaptic transmission is not accompanied by change in miniature currents. *J. Neurobiol.* 23, 766-781.
- Lester, R.A.J., Clements, J.D., Westbrook, G.L., and Jahr, C.E. (1990). Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature* 346, 70-73.
- Lester, R.A.J., and Jahr, C.E. (1992). NMDA channel behavior depends on agonist affinity. *J. Neuroscience* 12, 635-643.
- Li, Y., Erzurumlu, R.S., Chen, C., Jhaveri, S., and Tonegawa, S. (1994). Whisker-related neuronal patterns fail to develop in the trigeminal brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice. *Cell* 76, 427-437.

- Liao, D., Hessler, N.A., and Malinow, R. (1995). Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375, 400-404.
- MacDermont, A.B., Mayer, M., Westbrook, G.L., Smith, S.J., and Barker, J.L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. *Nature* 321, 519-522.
- Major (1993). Solution for transients in Arbitrariness Branching Cables: III. Voltage Clamp Problems. *Biophysical J.* 65, 469-491.
- Manabe, T., Renner, P., and Nicoll, R. (1992). Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents. *Nature* 355, 50-55.
- Martin, C.P., Ettinger, A.J., and Sanes, J.R. (1995). A synaptic localization domain in the synaptic cleft protein  $\beta 2$  (s-Laminin). *Science* 269, 413-416.
- McCabe, B.J., Horn, G. and Bateson, P.P.G. (1981). Effect of restricted lesions of the chick forebrain on the acquisition of filial preferences during imprinting. *Brain Research* 205, 29-37.
- McCabe, B.J., Cipolla-Neto, J., Horn, G. and Bateson, P.P.G. (1982). Amnesic effect of bilateral lesions placed in the hyperstriatum ventral of the chick after imprinting. *Exp. Brain Research* 48, 13-21.
- McCabe, B.J., and Horn, G. (1991). Synaptic transmission and recognition memory: time course of changes in N-methyl-D-aspartate receptors after imprinting. *Behav Neurosci* 105, 289-294.
- Mishina, M., Takai, T., Imoto, K., Takahashi, T., Muna, S., Methfessel, C., and Sakmann, B. (1986). Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321, 406-411.
- Mooney, R., Madison, D.V., and Shatz, C.J. (1993). Enhancement of transmission at the developing retinogeniculate synapse. *Neuron* 10, 815-825.
- Nastuk, M.A., and Fallon, J.R. (1993). Agrin and the molecular choreography of synapse formation. *Trends Neurosci.* 16, 72-6.
- Nelson, P.G., Field, R., Yu, C., and Neal, E. (1990). Mechanisms involved in activity-dependent synapse formation in mammalian central nervous system cell culture. *J. Neurobiol.* 21, 138-56.
- Nelson, P.G., Yu, C., Fields, R.D., and Neale, E.A. (1989). Synaptic connection in vitro: Modulation of number and efficacy by electrical activity. *Science* 244, 585-587.

- Nicoll, R.A., and Malenka, R.C. (1995). Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377, 115-118.
- Noakes, P.G., Phillips, W.D., Hanley, T.A., Sanes, J.R., and Merlie, J.P. (1993). 43K protein and acetylcholine receptors colocalize during the initial stages of neuromuscular synapse formation in vivo. *Dev. Biol.* 155, 275-280.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Acher, P., Herbert, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse neurons. *Nature* 307, 462-465.
- Peng, H.B., Baker, L.P., and Chen, Q. (1991). Induction of synaptic development in cultured muscle cells by basic fibroblast growth factor. *Neuron* 6, 237-246.
- Perkel, D.J., and Nicoll, R.A. (1993). Evidence for all-or-none regulation of neurotransmitter release: implications for long-term potentiation. *J. Physiol. (Lond.)* 481-500.
- Sakmann, B., and Brenner, H.R. (1978). Change in synaptic channel gating during neuromuscular development. *Nature* 267, 401-402.
- Sanes, D.H., and Takacs, C. (1993). Activity-dependent refinement of inhibitory connections. *Eur. J. Neurosci* 5, 570-574.
- Simon, D.K., Prusky, G.T., O'Leary, D.D.M., and Constantine-Paton, M. (1992). N-methyl-D-aspartate receptor antagonists disrupt the formation of a mammalian neural map. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10593-10597.
- Spruston, N., Jaffe, D.B., and Johnston, D. (1994). Dendritic attenuation of synaptic potentials and currents: the role of passive membrane properties. *Trends Neurosci.* 17, 161-166.
- Tokioka, R., Matsuo, A., Kiyosue, K., Kasai, M., and Taguchi, T. (1993). Synapse formation in dissociated cell cultures of embryonic chick cerebral neurons. *Dev. Brain Res.* 74, 146-150.
- Tang, C.M., Margulis, M., Shi, Q.Y., and Fielding, A. (1994). Saturation of postsynaptic glutamate receptors after quantal release of transmitter. *Neuron* 13, 1385-1393.
- Vaughn, J. (1989). Review: fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system. *Synapse* 3, 255-285.
- Wenthold, R.J., Yokotani, N., Doi, K., and Wada, K. (1992). Immunochemical characterization of the non-NMDA glutamate receptor using subunit-specific antibodies. Evidence for a hetero-oligomeric structure in rat brain. *J Biol Chem* 267, 501-507.

Witzemann, V., Berg, B., Cariado, M., Stein, E., and Sakmann, B. (1989). Developmental regulation of five subunit specific mRNAs encoding acetylcholine receptor subtypes in rat muscle. *FEBS Lett.* 242, 419-424.

Zafra, F., Hengerer, B., J. Leibrock, H. Thoenen, and Lindholm, D. (1990). Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA receptors. *EMBO J.* 9, 3454-3450

Xie, Z.-P., and Poo, M.-M. (1986). Initial events in the formation of neuromuscular synapse: Rapid induction of acetylcholin release from embryonic neuron. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 83, 7069-7073.

Zhong, Y., Budnik, V., and Wu, C.F. (1992). Synaptic plasticity in *Drosophila* memory and hyperexcitable mutants: role of cAMP cascade. *J. Neurosci.* 12, 644-651.

## 第八章 謝辞

本研究は、様々な人たちの援助なしには成り得ませんでした。ここに心から感謝します。

葛西道生教授には、様々なご指導、ご鞭撻を頂きありがとうございました。心から感謝します。また、グループリーダーの工業技術院大阪工業技術研究所有機部の田口隆久先生には大学3年生の時から7年間にわたり、ご指導いただき、言葉にできないほど感謝しています。また自由に研究を行わせていただき、そして有意義な議論、助言を頂き、本当にありがとうございました。副査をしていただいた村上富士夫教授、柳田敏雄教授には、大変参考になる意見を頂きありがとうございました。電気生理学的手法については、神経生理学研究室の小田洋一助教授、Dr. Wen Jie Song にいろいろと教えていただき、ここに感謝します。井出徹先生、また多くの先輩たちに助言を頂き感謝します。この実験を行うにあたり、私のきつい言葉に耐え、数多くの援助をしてくれた後輩たちに感謝します。特に計測装置のセットアップに甚大なる貢献をしてくれた工藤卓君、スライスの実験を共に行った鳴林英子君に感謝します。新鮮な議論をしてくれた同級生の西宗裕史氏、斉藤康彦氏に感謝します。最後に6年間お世話になりました葛西研究室の人々に感謝します。

