



Title	Doc2 $\alpha$ is an activity-dependent modulator of excitatory synaptic transmission
Author(s)	阪口, 岳
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42750">https://hdl.handle.net/11094/42750</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	阪口岳
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第15868号
学位授与年月日	平成13年2月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Doc2 $\alpha$ is an activity-dependent modulator of excitatory synaptic transmission (Doc2 $\alpha$ は興奮性シナプス伝達を活動依存的に調節している因子である)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美
	(副査) 教授 岡野 栄之 教授 遠山 正彌

### 論文内容の要旨

#### [目的]

神経伝達物質の放出はシナプス小胞がプレシナプス膜にドッキングして融合することにより引き起こされるが、この過程にはいくつかの必須の因子と調節因子が関与しており、調節因子がシナプスの可塑性に重要であることが最近明らかになっている。前者として、現在 SNARE 系が知られている。SNARE 系には、シナプス小胞上に存在する v-SNARE (VAMP、シナプトタグミン) とプレシナプス膜上に存在する t-SNARE (シンタキシン、SNAP-25) が存在し、v-SNARE と t-SNARE が結合することによりシナプス小胞とプレシナプス膜がドッキングして融合すると考えられている。後者として、私共の研究室では Rab3A 低分子量 G 蛋白質の重要性を明らかにしているが、さらに Doc2 もまたこの調節因子のひとつであることを示唆していた。Doc2 は、C2 領域と呼ばれる  $\text{Ca}^{2+}$  結合領域を 2 個有しており、Doc2 には  $\alpha$  と  $\beta$  の 2 つのアイソフォームが存在する。Doc2 $\beta$  は普遍的に発現しているが、Doc2 $\alpha$  は神経細胞特異的に発現し、特に神経終末のシナプス小胞に局在している。私共は、Doc2 $\alpha$  がプレシナプス膜に局在する Munc13 と結合し、この結合がラット交感神経節細胞における神経伝達物質の放出に寄与していることを明らかにしている。しかし、これまでの解析では、中枢神経系における Doc2 $\alpha$  の機能と作用機構およびシナプスの可塑性への関与については明らかになっていなかった。

そこで、本研究では、Doc2 $\alpha$  の遺伝子欠損マウスを作製し、その海馬スライスを用いて神経生理学的解析を行い、Doc2 $\alpha$  によるシナプス小胞輸送の調節機構とシナプスの可塑性への関与について検討した。さらに、マウスの行動学的解析を行い、Doc2 $\alpha$  の高次神経機能への関与についても検討した。

#### [方法ならびに結果]

##### 1) Doc2 $\alpha$ 遺伝子欠損 (Doc2 $\alpha$ -/-) マウスの作製

Doc2 $\alpha$ -/-マウス作製のため、まず、Doc2 $\alpha$  遺伝子の翻訳開始コドンから第 3 エキソンまでを  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子に置換した組換えベクターを ES 細胞 (E14 株) に導入し、相同組換えによりヘテロに組換わった ES 細胞を作製した。このヘテロ ES 細胞を C57BL/6J の受精卵に注入し、キメラマウスを作製した。キメラマウスを C57BL/6J マウスと交配し、ヘテロ欠損マウスを得、さらに、ヘテロ欠損マウスどうしの交配により、ホモ欠損マウス (Doc2 $\alpha$ -/-マウス) を得た。Doc2 $\alpha$ -/-マウスは正常に発育し、見かけ上の障害は認められなかった。脳の形態にも異常は認められなかった。Doc2 $\beta$  を含む種々のシナプス関連因子の発現にも変化は認められ

なかった。

## 2) 神経生理学的解析

海馬 CA3錐体細胞には、Doc2 $\alpha$ は発現していたが、Doc2 $\beta$ は発現していなかった。そこで、野生型およびDoc2 $\alpha$ -/-マウスから脳を摘出して海馬スライスを作製し、CA3錐体細胞より投射されている Schaffer 側枝-CA1シナプスにおけるシナプス伝達を集合電位測定法を用いて解析した。

(a) 入出力関係：まず、シナプス伝達効率を示す入出力関係の解析を行ったが、Doc2 $\alpha$ -/-マウスにおいて変化は認められなかった。すなわち、Doc2 $\alpha$ -/-マウスでは、基本的なシナプス伝達は野生型と同様正常であった。

(b) 短期的可塑性変化：Paired-pulse facilitation (PPF)、Post-tetanic potentiation (PTP)、および低頻度頻回刺激誘発増強現象を調べた。PPF は伝達物質の放出確率に依存した現象であり、PTP はプレシナプス終末性の可塑的変化であるが、Doc2 $\alpha$ -/-マウスにおいてはともに変化は認められなかった。しかし、低頻度頻回刺激については、5 Hz の刺激頻度により誘導される増強の程度が、Doc2 $\alpha$ -/-マウスでは野生型マウスに比べ増大しており、その増強の後に統一して観察されるシナプス伝達の抑制は、野生型マウスに比べ急激であった。また、これらの差異は 1 Hz の刺激頻度においては認められず、刺激頻度に依存した現象であった。

(c) 長期的可塑性変化：CA1シナプスにおいてテタヌス刺激により誘導される Long-term potentiation (LTP) を調べたところ、Doc2 $\alpha$ -/-マウスでは野生型マウスに比べ、有意に増強のレベルが抑制されていた。しかし、LTP 現象の中でも NMDA 受容体依存性の刺激直後の増強部分は障害されておらず、他のグルタミン酸受容体の活性化が不充分な可能性が考えられた。そこで、Group1-代謝型グルタミン酸受容体 (mGluRs) のアゴニストである t-ACPD によりテタヌス刺激前に10分間の処理を行ったところ、抑制されていた LTP が野生型と同程度まで回復した。

## 3) 行動学的解析

現在、LTP を含むシナプス伝達の可塑的変化が学習・記憶の素過程であると考えられている。そこで、一試行受動回避試験を用いて Doc2 $\alpha$ -/-マウスの学習機能を解析した。その結果、野生型マウスが良好な回避反応を示したのに対し、Doc2 $\alpha$ -/-マウスは有意な回避時間の短縮を示した。

## [総括]

私は、本研究において、Doc2 $\alpha$ -/-マウスを作製し、海馬スライスの神経生理学的解析およびマウスの行動学的解析により Doc2 $\alpha$  の中枢神経系での機能と作用機構を検討した。まず、Doc2 $\alpha$ -/-マウスでは、基本的なシナプス伝達には影響がなかったことから、Doc2 $\alpha$  がシナプス小胞輸送に必須の因子ではないことは明らかである。しかし、低頻度頻回刺激の結果から、Doc2 $\alpha$  はシナプス小胞とプレシナプス膜の融合を抑制するとともに、シナプス小胞のプレシナプス膜への輸送を促進する作用を有すると考えられる。また、この現象は刺激頻度依存性に認められたことから、くり返し刺激によってプレシナプス内の Ca<sup>2+</sup>上昇が維持された時のみ、Doc2 $\alpha$  が作用することが示唆される。したがって、テタヌス刺激による LTP 形成の抑制が Doc2 $\alpha$ -/-マウスに認められたのは、Doc2 $\alpha$  の欠損によりシナプス小胞のプレシナプス膜への輸送の効率が下がり、LTP 形成に必要なグルタミン酸が充分に放出されないためと推定される。このことは、t-ACPD により mGluRs を活性化すると LTP 形成が回復したことからも裏付けられている。さらに、一試行受動回避試験において、Doc2 $\alpha$ -/-マウスに学習障害が認められたことから、Doc2 $\alpha$  がシナプス小胞輸送の調節を介して記憶や学習などの高次神経機能にも関与していると考えられる。Doc2 $\alpha$  などの調節因子は、調節因子どうし、あるいは、必須の因子である SNARE 系と相互作用することによってシナプス小胞輸送を調節していると考えられる。実際、Doc2 $\alpha$  と結合する Munc13 は SNARE 系のシンタキシンと結合することが報告されている。今後は、Doc2 $\alpha$  と他の調節因子あるいは Doc2 $\alpha$  と SNARE 系を結ぶ因子を同定し、これらの相互作用を明らかにしていく必要がある。

## 論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究で、シナプス小胞蛋白質 Doc2 $\alpha$  の遺伝子欠損マウスを作製し、海馬スライスの神経生理学的

解析およびマウスの行動学的解析により Doc2 $\alpha$  の中枢神経系での機能と作用機構を明らかにしている。本研究では、Doc2 $\alpha$  は神転伝達物質の放出に必須ではないが、シナプス小胞の docking や fusion の過程の調節に作用することを明らかにしている。さらに、Doc2 $\alpha$  はこのシナプス小胞輸送の調節を介して長期増強の形成や記憶・学習にも関与していることを明らかにしている。長期増強の形成にはプレシナプス性とポストシナプス性の分子機構が関与していると考えられているが、本研究は、Doc2 $\alpha$  のようなシナプス小胞輸送の調節分子がプレシナプス性の分子機構の本体のひとつであることを示した意義のある研究であると考えられる。したがって、本研究は実験結果自体の意義もさることながら、今後のこの分野の研究に極めて重要な意義を持つものと考えられ、今後の発展性や生命科学の貢献度から鑑み、学位授与に十分値するものと認める。