

Title	Analysis of Expression Mechanism of Synaptic Plasticity in Cultured Cortical Neurons by Fluorescence Imaging
Author(s)	小原, 圭吾
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43626">https://hdl.handle.net/11094/43626</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏 名	小 原 圭 吾
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 5 2 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 9 月 26 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	Analysis of Expression Mechanism of Synaptic Plasticity in Cultured Cortical Neurons by Fluorescence Imaging (蛍光イメージングを用いた培養大脳皮質ニューロンのシナプス可塑性成立機構の解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小 倉 明 彦  (副査) 教 授 永 井 克 也      教 授 津 本 忠 治

#### 論 文 内 容 の 要 旨

##### 第1部

脳では、数百億の神経細胞がシナプスでつながり合い、複雑な神経回路を形成している。シナプスには活動に応じて信号の通り方を変えるシナプス可塑性があり、長期増強 (LTP) と呼ばれるシナプス可塑性は、記憶学習の基礎過程と考えられている。これまでの研究から、海馬歯状回の苔状線維と CA3 錐体細胞間のシナプスでおこる Mossy fiber LTP は、アデニル酸シクラーゼと A キナーゼの活性化に依存してプレシナプスの開口放出の促進をもたらすことが知られている。私は今回、FM 蛍光色素を用いて放出部位を直接可視化することによって培養した海馬歯状回神経細胞の放出部位数の変化を解析した。励起波長の異なる 2 種類の FM 色素 (FM1-43、FM4-64) を用いて、フォルスコリン、Sp-cAMPS 投与による放出部位数の変化を調べたところ、cAMP 系活性化にともなって放出部位数の増加が見られた。したがって、歯状回神経細胞では、A キナーゼの活性化依存的に Mossy fiber の放出部位数の増加がおこることが示された。本研究から、放出部位数の増加が Mossy fiber LTP の発現の基礎となっている可能性が得られた。

##### 第2部

神経栄養因子は、神経細胞の生存、分化、神経突起伸展などに作用があることが知られていたが、1990年代に入りシナプス可塑性の調節因子として重要な役割をもっていることが明らかになってきた。なかでも脳に多く存在し、現在最も注目されているのが脳由来神経栄養因子 (BDNF) である。しかしながら、BDNF が実際に細胞のどの部位から放出されているかについては未解明のままであった。

本研究において、私は BDNF のカルボキシル末端に GFP を標識している BDNF-GFP を用いて解析を行った。BDNF-GFP の cDNA をマイクロインジェクション法により培養大脳皮質神経細胞の核内に導入すると、BDNF-GFP は樹状突起マーカー蛋白質である MAP2 陰性の神経線維にも存在したことから、樹状突起だけでなく軸索にも分布することがわかった。

さらに、軸索での BDNF-GFP の動態を調べるためにタイムラプス蛍光イメージングをおこなった。BDNF は軸索において従来からの定説である逆行性輸送だけでなく、順行性にも輸送されることが明らかになったのである。

次に BDNF が細胞間を移動するのではないかと考えて解析をおこなった。赤色蛍光蛋白質 (DsRed) の cDNA と BDNF-GFP の cDNA を同時に単一の神経細胞の核にマイクロインジェクションし、遺伝子導入された神経細胞の軸

索をたどっていくと、他の神経細胞とシナプスを形成しているのがみられる。DsRed 陽性の軸索とその終末だけでなく、DsRed 陰性のシナプス後細胞の細胞体にも BDNF-GFP の分布が認められたのである。このことは BDNF-GFP がシナプス前終末からシナプス後細胞へ移行したことをあらわしている。また BDNF は活動依存的にシナプス前からシナプス後細胞へ移動することも初めて明らかになった。

#### 論文審査の結果の要旨

記憶＝シナプス可塑性の研究では、新たなシナプスが作られる過程とその仕組みの解明が求められている。小原圭吾君は、大脳皮質の培養神経細胞系を用い、細胞外においた蛍光物質を取り込ませる方法で、それまで機能していなかったシナプスがリン酸化酵素の働きの下で機能的なシナプスに変わることを、画像としてはじめて捉えるのに成功した。ついで同君は、シナプス新生の制御に重要な役割をもつと想定されるタンパク質の一つ、脳由来神経栄養因子 (BDNF) が、シナプス前神経細胞で生合成され、輸送されてシナプスで放出され、さらにシナプス後細胞に取り込まれる様子を、蛍光標識した BDNF を追跡する方法で画像としてはじめて捉えるのに成功した。これらの成果は、目下起つつあるシナプス可塑性現象を説得力ある形で示したものであると同時に、今後のこの分野の研究に方向づけを与えるものといえ、博士 (理学) の学位論文として十分価値のあるものと認める。