OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Establishment of Optical Method for Two-dimensional Quantitative Analysis of Synaptic Transmission in Cultured Hippocampal Slice : A Dendritic Layer-specific Persistent Enhancement of Synaptic Strength After Repeated Activation of Protein Kinase A
Author(s)	篠田, 陽
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/989
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	篠田陽（しのだよう）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第18091号
学位授与年月日	平成15年9月30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	Establishment of Optical Method for Two-dimensional Quantitative Analysis of Synaptic Transmission in Cultured Hippocampal Slice: A Dendritic Layer-specific Persistent Enhancement of Synaptic Strength After Repeated Activation of Protein Kinase A. **海馬培養切片におけるシナプス伝達の二次元的・定量的光学解析法の開発：Aキナーゼ繰り返し活性化後の長期的シナプス増強の樹状突起部位特異性**
論文審査委員	（主査） 教授 小倉 明彦 （副査） 教授 徳永 史生　教授 河村 悟

論文内容の要旨

記憶には大きく分けて２つの相がある。瞬時に成立するが一過的に終わる短期記憶と、それに引き続いて成立し数日ないし数週間、あるいは一生涯維持される長期記憶である。それに対応するように、シナプス可塑性にも大きく分けて２つの相がある。既存のシナプスにおいてタンパク合成を伴わず瞬時に成立する伝達効率変化、短期可塑性と、タンパク合成を介して新しいシナプスが形成されることによる伝達効率変化、長期可塑性とである。ラット海馬のシナプス可塑性（入力繊維の頻回刺激によって伝達効率が上昇するLTP；Long-term potentiationが典型的）は短期可塑性の代表例であり、NMDA型グルタミン酸受容体の活性化によるシナプス部位でのCa流入と、Ca-カルモジュリン依存性タンパクキナーゼの活性化によるAMPA型グルタミン酸受容体の活性化、という分子機構がほぼ確定している。

これに対して、長期可塑性については、短期可塑性における海馬LTPのような優れた実験系がなく、海馬LTPの後期相（刺激1-3時間後以降）で見られるシナプス部の形態変化（軸索末端の分枝、樹状突起棘の分裂など）がこれに当たるのではないかと想定されて、最近徐々に解析が進み始めた段階にある。しかし、この形態変化が本当に日・週オーダーの長期間持続するのかという問題や、短期のみで終わる可塑性と長期化する可塑性とはどのように選別されるのかといった問題は、その糸口さえつかめていない。これらの問題に答えるには、実際に長期間維持できる実験系の確立と、それを解析する実験法の開発とが必要不可欠である。

昨年当研究室の冨永らによって、海馬培養切片を用いた長期間維持できる長期可塑性の実験系が確立された。そこで私はその長期可塑性を空間網羅的に解析する方法として、膜電位感受性色素（VSD）を培養海馬切片に適用して高速高感度二次元撮像素子によって解析する方法を開発すべく、本所究を開始した。VSDとは、細胞活動に伴う膜電位の変化を蛍光または吸光度の変化に変換する色素をいい、実際これまで新鮮脳切片や株化培養細胞に対して適用されている。VSD測定は、様々な部位で起こる神経活動を空間網羅的に同時解析できるという点で、一点でしか記録できない電極記録法に比べ有用性が高い。しかしながら、実際VSDを長期培養脳切片に適用するには、そのそれぞれが

本質的に抱える問題（色素の褪色や培養下における各切片間の細胞数のばらつき等）を解決しなければならなかった。私は、これらの問題点を一つ一つ解決することで、長期培養標本の神経活動の微細な変化の検出を可能にした。

さらにこの方法を用いて海馬 CA1 領域の樹状突起層の空間網羅的解析を行い、さきに冨永らが報告した FK の繰り返し投与後の長期的伝達増強が、樹状突起の近位層で起こっていることをつきとめた。また、冨永らが報告した樹状突起の遠位層でのシナプス新生は、機能的な伝達増強を伴っていないことを見出した。そこで遠位層における新生シナプスは、いわゆるサイレントシナプス（構造としては存在するが機能していないシナプス）ではないかとの仮説を立て、これを立証するためにさらに解析を進めたところ、予想通りサイレントシナプスである可能性を強く示唆する結果が得られたので、ここで報告する。

論文審査の結果の要旨

篠田陽君は、長期記憶の細胞基盤とされるシナプス結合の長期可塑性を解析する目的で、膜電位感受性色素による二次元網羅的神経活動計測を培養脳切片標本に適用するための方法開発に取り組んだ。逆行性神経刺激に対する蛍光シグナルを内部標準として巧みに用いながら標本間の細胞数の変動や長時間測定にともなう色素退色を補正することで、これに成功した。つづいて、同法を利用し、環状 AMP 依存性タンパクキナーゼの繰り返し活性化に伴う培養海馬切片のシナプス新生現象を二次元的定量的に解析した。その結果、シナプス機能増強は神経細胞上で一様に起こるのではなく、細胞体の近位部と遠位部で様相が異なることを見出した。さらに、その差の由来が、遠位部でのいわゆる「サイレントシナプス」増加によることを示した。これらの成果は、神経可塑性研究に新たな方法論と視点を提供するものといえ、理学博士の学位論文として価値のあるものと認める。