

論文審査の結果の要旨

氏名：菅 藏 人

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Isoproterenol facilitates GABAergic autapses in fast-spiking cells of rat insular cortex

（イソプロテレノールはラット島皮質 fast-spiking 細胞における GABA 作動性自己シナプス機能を促進させる）

審査委員：（主査） 教授 今村佳樹 ㊞

（副査） 教授 越川憲明 ㊞ 教授 岩田幸一 ㊞

教授 大井良之 ㊞

大脳皮質において、GABA 作動性ニューロンは 10-20% を占めており、抑制性シナプス後電位を発生させることによってシナプス後ニューロンの神経活動を制御している。この抑制性ニューロンは、電気生理学的に少なくとも 4 タイプに分類することが出来る。Fast-spiking 細胞は、その中でも重要な役割を果たすニューロンであり、振幅が大きく持続時間の短い後過分極電位と順応をほとんど伴わない高頻度発火などの特徴を持っている。興味深いことに、fast-spiking 細胞の多くは自己シナプスを有しており、自身の発火を抑制する機能が備わっている。しかし、解剖学的所見とは対照的に電気生理学的・薬理的機能および特性は不明な点が多く残されている。

β -アドレナリン受容体アゴニストは、シナプス前終末からのグルタミン酸放出を促進することが知られている。一方、抑制性シナプス伝達に対しては多様な応答を惹き起こすことが知られている。 β -アドレナリン受容体アゴニストであるイソプロテレノールは、fast-spiking 細胞-錐体細胞間の抑制性シナプス後電流について 24 日齢以上の動物では増強する傾向が強いのにに対し、それより幼若な動物では抑制性シナプス後電流を増強するものと減弱するものが混在する。また、non-fast-spiking 細胞-錐体細胞間のシナプスにおける抑制性シナプス後電流は、イソプロテレノールによって減弱される。このように、 β -アドレナリン受容体の大脳皮質における神経活動の制御機構は極めて複雑であることから、自己シナプスに対する β -アドレナリン受容体の役割を過去の抑制性シナプス伝達に関する研究から類推することは極めて難しかった。

そこで本研究の著者は、大脳皮質の主要な抑制性細胞である fast-spiking 細胞の自己シナプスに対する β -アドレナリン受容体の役割について、ホールセル・パッチクランプ法を用いて明らかにすることを目的として実験を行い、以下に述べる結果と結論を得ている。

実験には vesicular GABA transporters (VGAT)-Venus line A トランスジェニックラットを pentobarbital (75 mg/kg, 腹腔内投与) にて深麻酔し、通法に従って島皮質を含む脳スライス標本 (厚さ 350-400 μ m) を作製した。脳スライス標本は、サブマージ型記録用チャンバー (1.0-1.5 ml/min) へ移し、ノマルスキー微分干渉装置を備えた正立顕微鏡を用いて赤外線高感度カメラで島皮質を観察した。錐体細胞および Venus 陽性細胞から同時にホールセル・パッチクランプ記録を行った。錐体細胞は、電圧固定下で記録を行い、使用したピペット内液の組成は以下の通りである: 120 mM cesium gluconate, 20 mM biocytin, 10 mM N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 8 mM NaCl, 5 mM N-(2,6-dimethylphenylcarbonylmethyl)triethylammonium bromide (QX-314), 2 mM magnesium adenosine triphosphate (ATP), 0.3 mM sodium guanosine triphosphate (GTP), 0.1 mM 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA)。一方、fast-spiking 細胞の記録用内液の組成は、70 mM potassium gluconate, 70 mM KCl, 10 mM HEPES, 15 mM biocytin, 0.5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 2 mM magnesium ATP, and 0.3 mM sodium GTP であった。

Fast-spiking 細胞に自己シナプスがあるか否かは、電流固定化で活動電位を発生させた際に生じる脱分極性スパイク後電位の有無で判定した。すなわち、自己受容体を介した Cl⁻電流が流れた場合、Cl⁻の平衡電位 (本実験では約 -15 mV) に従って脱分極を生じるためである。本実験では、自己シナプスと錐体細胞への投射があるペアのみを解析の対象とした。また実験終了時には、電圧固定化で記録した自己シナプスを介した抑制性電流と錐体細胞で記録される抑制性シナプス後電流が GABA(A)受容体のアンタゴニストであるビククリン (10 μ M) で消失することを確認した。

先行研究で明らかにされているように 100 μM イソプロテレノールの投与は, fast-spiking 細胞と錐体細胞間に生じる抑制性シナプス後電流の振幅を増幅させる場合と減少させる場合があった。一方, 自己シナプスによる抑制性電流はイソプロテレノールの投与によって, 増大する傾向が認められた。また, 2 連刺激に対する反応特性および共分散解析を行ったところ, 自己シナプスのイソプロテレノールによる増強作用は, シナプス前終末からの GABA の放出確率を変化させるためと考えられた。

本研究では, 同一の fast-spiking 細胞でも自己シナプスと錐体細胞へのシナプスの β -アドレナリン受容体による修飾作用が異なることが明らかとなった。これは, 終末に存在する電位依存性 Ca^{2+} チャネルのサブタイプの違いによる可能性がある。すなわち, cAMP \rightarrow タンパクキナーゼ A \rightarrow MAP キナーゼあるいはCAM キナーゼに代表される β -アドレナリン受容体の下流に存在する経路に存在する各種リン酸化酵素が修飾する Ca^{2+} チャネルに違いがあるのかもしれない。この可能性については今後検討する必要がある。また, 自己シナプスの作用として最近スパイク発火の正確性を向上させる作用が明らかになりつつある。したがって, 本研究による β -アドレナリン受容体による増強作用は, fast-spiking 細胞のスパイク発生のタイミングを調整する作用があるかもしれない。その結果, V層からの出力が増大することも考えられる。

以上, 本研究結果は高次味覚情報処理機構の一端を解明したもので, 歯科基礎医学研究の発展に寄与するところ大であると考えられた。

よって本論文は, 博士 (歯学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 26 年 3 月 5 日