

【別紙2】

審査の結果の要旨

氏名 坂本 寛和

本研究は神経伝達物質放出機構の分子基盤を明らかにするため、ラットの海馬培養神経細胞のシナプスにおける興奮性神経伝達物質グルタミン酸の可視化解析及びシナプス分子 Munc13-1 の超解像分子イメージングを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. グルタミン酸の蛍光プローブ (eEOS) を開発し、海馬培養神経細胞における単一シナプスレベルの神経伝達物質放出の直接計測を実現した。eEOS を用いた計測では、単一のシナプス小胞由来のグルタミン酸放出を捉えられることが示された。
2. eEOS を用いたグルタミン酸放出の計測結果に素量解析法を適用したところ、海馬のシナプスでは平均で5つシナプス小胞放出部位が存在することが示された。また、シナプス小胞放出部位の個数はシナプス毎に大きく異なり (2~18 個)、個々のシナプスの情報量は1か0の二進数的ではなく、複数ビットの情報量を持つことが示された。
3. グルタミン酸放出の計測と post-hoc の蛍光免疫染色を組み合わせることで、シナプスにおける Munc13-1 分子の個数とシナプス小胞放出部位の個数との間に強い正の相関があることが示された。また、遺伝子ノックダウン実験によって Munc13-1 の発現量を抑制したところ、Munc13-1 分子の個数とシナプス小胞放出部位の個数は同程度減少することが示された。
4. 超解像顕微鏡を用いた観察によって、Munc13-1 はシナプス内で複数のナノメートルスケールの超分子集合体を形成していることが示された。Munc13-1 超分子集合体の個数を定量的に評価したところ、シナプス辺り平均で5.7個存在することが示された。また、グルタミン酸の計測によって推定したシナプス小胞放出部位の個数と Munc13-1 超分子集合体の個数は一対一で対応することが示された。
5. シナプス小胞の開口放出に必須である SNARE 複合体の主要タンパク質 syntaxin-1 がシナプス内で Munc13-1 と共局在していることが超解像顕微鏡による観察によって示された。また、Munc13-1 をノックダウンしたシナプスではシナプスに局在する syntaxin-1 が選択的に減少することが示された。
6. Munc13-1 を非神経細胞 (293T 細胞または COS-7 細胞) に強制発現させ、人為的に細胞膜へ移行させたところ、Munc13-1 分子は自発的に自己組織化し分子集合体を形成することが示された。超解像顕微鏡を用いた観察によって、ナノメートルスケールの Munc13-1 超分子集合体が細胞膜付近で観察された。また、非神経細胞においても syntaxin-1 は Munc13-1 超分子集合体と共局在することが示された。

以上本論文はラットの海馬神経細胞シナプスにおいて、グルタミン酸放出の直接計測法を開発し、シナプス分子 Munc13-1 の超解像顕微鏡観察と組み合わせることで、Munc13-1 超分子集合体がシナプス小胞放出部位の物理実体である可能性を示した。本研究はこれまで不明であったシナプス小胞放出部位の物理実体を生理学的実験、形態学的実験、及び細胞生化学的実験結果を集めて説得力のある証拠を揃えて提唱したもので、神経伝達物質放出機構の分子基盤の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。