

## [課程—2]

### 審査の結果の要旨

氏名 金原 直也

本研究は、神経伝達物質の開口放出において重要な役割を果たしている電位依存性カルシウムチャンネルが、アクティブゾーンにおいてどのように配置しているかを明らかにするために、超解像顕微鏡技術を用いて電位依存性カルシウムチャンネルの空間配置を解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. 電位依存性カルシウムチャンネルの $\alpha$ サブユニットである Cav2.1 を蛍光抗体法にて染色し、超解像顕微鏡技術である STORM 顕微鏡を用いて観察したところ、Cav2.1 がアクティブゾーンにおいてクラスターを形成していることが明らかとなった。
2. 電位依存性カルシウムチャンネルの $\beta$ サブユニットである Cacnb4 に EGFP を融合したタンパク質 (Cacnb4-EGFP) を神経細胞に発現させ、抗 GFP 抗体を用いて免疫染色し、STORM 顕微鏡にて観察したところ、Cacnb4-EGFP もアクティブゾーンにおいてクラスターを形成していることが示された。更に、Cacnb4-EGFP と Cav2.1 の位置関係を、STORM 顕微鏡を用いて解析したところ、Cacnb4-EGFP と Cav2.1 が共局在していることが明らかとなった。
3. Cav2.1 のクラスターについて定量的な解析を行った結果、Cav2.1 のクラスターは 6 分子程度より構成されており、クラスターの大きさは 60 nm 程度、最近傍のクラスター間距離は 90 nm であることが示された。また、Cav2.1 のクラスターはアクティブゾーンの端において少ないことが明らかとなった。
4. シナプス小胞の放出部位の構成分子である Munc13-1 と Cav2.1 の位置関係を、STORM 顕微鏡を用いて解析したところ、Munc13-1 から数十ナノメートル以内の近傍において Cav2.1 のクラスターが配置していることが示された。

以上、本論文では電位依存性カルシウムチャンネルが、シナプス小胞の放出部位から数十ナノメートル程度の近傍においてクラスター化して配置していることを明らかにした。本研究は、これまで不明であった電位依存性カルシウムチャンネルとシナプス小胞の位置関係を明らかにしており、シナプス伝達の制御機構の解明において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。