

P161 PKCによる伝達物質放出増強の素過程解析

八尾 寛 (東北大院、CREST・JST)

シナプス前終末からの伝達物質放出素過程において開口放出を律速している分子のリン酸化により、シナプス前終末の機能的可塑性が説明される。マウス海馬スライスを用いて、苔状線維シナプス伝達が C-キナーゼ (PKC)により増強されるメカニズムを解析した。フォルボルエステル(PDA)は、PKC 依存的に苔状線維シナプス前終末  $Ca^{2+}$ 濃度の活動電位性上昇(DCa)を促進したが、EPSP の増強やペアドパルス比の抑制は、 $Ca^{2+}$ 流入の促進から予想される効果を上回った。しかし、PDA の DCa 増大作用に  $Ca^{2+}$ チャネルサブタイプ特異性は認められなかった。ゆえに、分泌と強く関連しているようなサブタイプを PDA が選択的に促進する可能性は除外された。PKC は、DCa を増大する以外に、 $Ca^{2+}$ 流入以外の開口放出機序を強化することが示唆された。

P162 未熟小脳におけるシナプス前放出の特性 —チャンネル直結型受容体による制御

河 和善、鎌田真希 (東北大院、CREST・JST)

発達期におけるラット小脳プルキンエ細胞 (6~10 日齢) は、グルタミン酸作動性興奮性入力、GABA 作動性抑制性入力がある。これらに対しニコチン性アセチルコリン受容体を介した強力な促進作用が認められた。より未熟な生後 1~5 日齢のラット小脳スライスに、GABA (10mM) やグリシン (100mM) を投与したところ興奮性と抑制性のシナプス電流の頻発が観察された。TTX (1mM) 存在下にも同様の作用が認められた。つまり幼弱期にはこれら抑制性物質が前シナプス終末に対し伝達物質放出促進に作用している。シナプス前放出の制御が小脳の発達過程で大きく変化する例として注目される。

P163 PI 3-キナーゼによる神経伝達物質放出の制御機構

板倉 誠<sup>1</sup>、大西浩史<sup>1,3</sup>、網野真也<sup>1,2,3</sup>、関口真理子<sup>1,3</sup>、桑原玲子<sup>1,3</sup>、山森早織<sup>1,3</sup>、高橋正身<sup>1,2,3</sup>

(1 三菱生命研、2 東京大院、3 CREST・JST)

PC12 細胞を NGF や IGF-1 で 10 分間前処理すると  $Ca^{2+}$ 誘発性のドーパミン放出が顕著に促進され、PI3-キナーゼ阻害剤で抑制された。NGF によるドーパミン放出の促進には MAP キナーゼの活性化も必要であるのに対し、IGF-1 の場合は MAP キナーゼ非依存性であった。GFP と PKB の PH ドメインの融合蛋白質を用いて細胞内での PI 3-キナーゼの活性化を可視化解析した結果、NGF 処理では細胞膜で PI3-キナーゼの活性化が起こるのに対し、IGF-1 では細胞膜での有意な活性化は認められなかった。以上の結果から PI 3-キナーゼの活性化によって神経伝達物質放出が促進されるが、少なくとも 2 つの促進機構が存在することがわかった。

P164 エリスロポエチンレセプターを介した虚血性神経細胞死の抑制機構

川上正勝<sup>1,5</sup>、関口真理子<sup>2,5</sup>、佐藤一紀<sup>3</sup>、小崎俊司<sup>4</sup>、高橋正身<sup>1,2,5</sup>

(1 東京大院、2 三菱生命研、3 福岡女子大、4 大阪府大、5 CREST・JST)

培養小脳顆粒細胞にエリスロポエチン (EPO) や EPO レセプターの合成アゴニストである EMP1 を短時間作用させると JAK2 が活性化され、 $Ca^{2+}$  依存的なグルタミン酸放出が抑制された。培養小脳顆粒細胞や海馬神経細胞を化学虚血状態にすると、初期には開口放出機構によって、後期には非開口放出機構によってグルタミン酸が放出されたが、EPO レセプターを活性化すると開口放出による Glu 放出のみが抑制された。EPO レセ

プターを活性化すると、海馬スライス培養の CA1 領域の虚血性神経細胞死も抑制されることから、EPO レセプターに結合している JAK2 はグルタミン酸放出を抑制することにより、虚血性神経細胞死の抑制に関わっていると考えられた。

#### P165 ラット脳内における SNAP-25 のリン酸化

片岡正和<sup>1,2</sup>、桑原玲子<sup>1</sup>、高橋正身<sup>1,3</sup> (1 三菱生命研、2 信州大・工、3 CREST・JST)

神経伝達物質放出の素過程である、シナプス小胞膜と細胞膜の融合過程に必須な SNARE タンパク質、SNAP-25 の Ser187 位のリン酸化の生物学的意義を知るため、ラット脳内における SNAP-25 のリン酸化状態を調べた。リン酸化 SNAP-25 特異的抗体を分子プローブとして、発生、ならびに神経活動の活性化に伴うリン酸化状態の変化を定量的に解析した。ラット脳内の SNAP-25 のリン酸化は発生依存性を示し、その時間変化パターンはラット海馬初代培養細胞においても再現する。カイニン酸処理により異常活性化を誘導したラット脳では、SNAP-25 は脱リン酸化していた。これらの結果は、個体において SNAP-25 のリン酸化が脳機能の制御に関与していることを示唆している。

#### P166 チロシンキナーゼによる神経伝達物質放出の抑制的制御

大西浩史<sup>1,3</sup>、山森早織<sup>1,3</sup>、平田加奈子<sup>1</sup>、青柳共太<sup>2,3</sup>、近藤俊三<sup>1</sup>、高橋正身<sup>1,2,3</sup>

(1 三菱生命研、2 東京大院、3 CREST・JST)

我々は、Src ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤 PP2 によって PC12 細胞からの  $Ca^{2+}$  依存性の神経伝達物質放出が増強することを見いだした。また、活性型 Src を transfection した場合、 $Ca^{2+}$  依存性の分泌が顕著に抑制された。以上の結果は、Src ファミリーが開口放出過程に対して抑制的に働き、その作用点が  $Ca^{2+}$  流入以外のステップである可能性を示唆している。さらに、分散培養したラット小脳顆粒細胞に対する PP2 の効果を検討したところ、PP2 処理によって  $Ca^{2+}$  依存性のグルタミン酸放出が増強されることが分かった。このことから PC12 細胞で観察した Src ファミリーによる開口放出の抑制機構は中枢神経系シナプスにおいても機能する可能性が考えられる。

#### P167 シナプス小胞の放出可能プールサイズの推定

山口和彦<sup>1,2</sup>、平田快洋<sup>2,3</sup>、金子貢巳<sup>1,2</sup> (1 理研、2 CREST・JST、3 東京薬科大院)

神経伝達物質の開口放出に関わる様々な蛋白質の個別の機能を理解するためにはシナプス開口放出を、ドッキング、膜融合等の素過程に分けて定量する必要がある。我々は中枢シナプスの単純なモデルとして、培養海馬神経細胞のオートプスを用いてシナプス電流を記録し、反復刺激解析等を行ない、神経伝達物質放出の素過程の分析を試みた。40-50Hz の反復刺激により、①誘発 EPSC の振幅が漸減し、②定常値に達し、③非同期的放出成分も定常に達する、という現象を見出した。これらの成分から即時放出可能プール、放出確率を推定することを試み、cAMP-PKA カスケードの活性化等がこれらに及ぼす効果を解析した。