

たにふじ しょうた

谷藤 章太 (本籍 東京都)

博士 (薬学)

博士甲第 号

学位論文題目 活動電位発火パターンを解読するダイナミンアイソフォーム
のシナプス小胞リサイクル経路活性化の解析

論文審査委員 (主査) 教授 笠原 忠 薬学博士

教授 三澤日出巳 博士 (薬学)

教授 竹鼻 眞 薬学博士

論文内容の要旨

神経伝達物質はシナプス小胞に充填されており、活動電位発火によってシナプス小胞が開口してシナプス間隙に放出される。放出後の小胞膜はシナプス終末内へ再取り込み(エンドサイトーシス)され、伝達物質が充填された小胞は放出部位に補充される。小胞膜リサイクルは、回数や頻度が広範囲に変動する活動電位がシナプス終末へ入力するにもかかわらず、神経伝達物質放出を安定に維持する。しかし、様々な活動電位発火を解読(decode)してシナプス小胞リサイクル経路を駆動する分子機構は未だ解明されていない。活動電位発火に応じたシナプス小胞リサイクル経路を駆動する分子として、小胞膜切断の役割を果たすダイナミンが第一候補に挙げられる。ダイナミンには3種類のアイソフォームが確認されており、中枢神経系での機能解析がなされている。ダイナミン1と3のノックアウトマウスを用いた実験から、ダイナミン1が高頻度刺激時のエンドサイトーシスを、ダイナミン2は刺激後のエンドサイトーシスを、また、ダイナミン3はダイナミン1と協調して働くことで効率良くエンドサイトーシスを担うことが示唆されている。しかし、高頻度に発火する中枢神経系で示唆されたダイナミン1、2、3の機能は、低頻度から高頻度に発火する末梢神経系での機能を説明しない。

本研究は、培養ラット上頸交感神経節(SCGニューロン)シナプス前細胞にsiRNAを導入してダイナミン1、2、3を短期機能阻害し、放出部位に補充される小胞の変動を電気生理学的手法によって解析を行った。これにより、末梢神経系での多様な生理的活動電位発火パターンとダイナミン1、2、3が駆動するシナプス小胞リサイクル経路との関連を明らかにすることをめざした。

1. 単発活動電位後にダイナミンアイソフォームが担うシナプス小胞放出部位への小胞補充: 最初に、ダイナミン1、2、3に対するsiRNA導入により各ダイナミンアイソ

フォームの発現を特異的にノックダウン (KD) できることを PC12 細胞、培養ラット SCG ニューロンなどを用いて確認した。SCG ニューロンへの siRNA 導入では、導入 3 日後には蛍光免疫組織染色によって細胞体及び神経突起でのダイナミン各アイソフォームの発現が特異的に減少し、各ダイナミン 1、2、3 を特異的にノックダウン (KD) されることを確認した。

活動電位発火後どのタイミングでどのダイナミンがシナプス小胞放出部位への小胞補充を担うかを解析するため、様々な間隔で 2 回発火させる Paired-pulse 法により、活動電位発火後の開口放出可能なシナプス小胞プール (RRP) への小胞補充を評価した。対照シナプスでは、1 発目の活動電位発火後 20-100 ms の短い間隔で、2 発目の活動電位発火は伝達物質放出を抑圧されるが、100-1000 ms 後の活動電位発火では伝達物質の放出抑圧が解消される。ダイナミン 1、2、3 KD では、100 ミリ秒より長い間隔での 2 回目の伝達物質放出量 (EPSP 振幅) は対照の約 60-70% に減少した。ダイナミン 2、3 KD は、伝達物質放出抑圧をさらに増強した。一方、ダイナミン 1 KD は、50 ms 以降の活動電位発火時に伝達物質放出抑圧を増強した。以上の結果により、活動電位発火による伝達物質放出後に起こるシナプス小胞放出部位への小胞補充には、活動電位発火直後のダイナミン 1、2、3 に駆動されるシナプス小胞リサイクルが関与することが示された。

2. 高頻度発火時にダイナミンアイソフォームが担うシナプス小胞放出部位への小胞補充: 高頻度発火時にダイナミン 1、2、3 が担うシナプス小胞放出部位への小胞補充を解析するため、5、10、20 Hz で 2 秒間活動電位を発生させて連続した EPSP を 2 分ごとに記録した。対照シナプスでは 20 Hz 発火により 2 発目活動電位以降にシナプス抑圧が観察された。ダイナミン 1 KD は、5、10 Hz 発火と低頻度でもシナプス抑圧をおこし、EPSP を欠落させた。ダイナミン 3 KD は、高頻度発火 2 分後にはシナプス抑圧から回復したのに対して、ダイナミン 1、2 KD は、シナプス抑圧からの回復が不十分だった。すなわち、ダイナミン 1、2 が活動電位高頻度発火時・発火後のシナプス小胞補充に機能しているのに対し、ダイナミン 3 KD は、5、10 Hz 発火の低頻度でもシナプス抑圧をおこし、活動電位発火頻度に関係なく小胞補充に機能していることが示唆された。

3. 低頻度発火時のダイナミンアイソフォームが担うシナプス小胞放出部位への小胞補充: 次に、低頻度発火時 (0.05 または 0.2 Hz) での連続発火に対する EPSP 振幅をモニターした。対照シナプスでは徐々に EPSP 振幅が減少するのに対して、ダイナミン 1、2 KD は 0.2 Hz 連続発火で EPSP 振幅減少を促進し、ダイナミン 3 KD は 0.05 及び 0.2 Hz 連続発火の両方で EPSP 振幅減少を促進した。これらの結果は、ダイナミン 1、2 は発

火頻度依存的な小胞補充に機能し、その持続時間が約 5 秒間、ダイナミン 3 は発火頻度非依存的な小胞補充に機能し、その持続時間は 20 秒以上であることを示した。

4. ダイナミンアイソフォームが担うシナプス小胞放出部位への小胞補充経路：

シナプス小胞放出部位への小胞補充には、速い過程と遅い過程がある。ダイナミン 1、2、3 が担うシナプス小胞放出部位への小胞補充経路を解析するため、5 Hz、4 分間の活動電位連続発火により小胞を枯渇させたシナプス小胞放出部位 (RRP) へのシナプス小胞補充を、1 Hz で記録した EPSP 振幅の回復としてモニターした。活動電位連続発火後 10 秒 (速い回復過程) 及び 6 分 (遅い回復過程) での EPSP 振幅は、ダイナミン 1、2 KD により速い回復過程が、ダイナミン 2、3 KD により遅い回復過程が抑制された。さらに、速い回復過程 (枯渇後 1 分まで) 及び遅い回復過程 (枯渇後 1-6 分) の時定数を示す指数的回復曲線を 0.45 分 (速い回復過程) または 6 分 (遅い回復過程) の EPSP 振幅値で正規化して比較すると、速い回復過程をダイナミン 1、2 KD が遅延し、遅い回復過程をダイナミン 2、3 KD が遅延した。これらの結果は、シナプス小胞放出部位への小胞補充では、ダイナミン 1、2 が速い小胞補充過程を伴う小胞リサイクル経路に、ダイナミン 2、3 が遅い小胞補充過程を伴う小胞リサイクル経路に機能していることを示唆するものであった。

本研究は、活動電位の生理的発火頻度に応じて、ダイナミン 1、2、3 のそれぞれが活性化タイミング及び速度の異なるシナプス小胞リサイクル経路駆動に機能し、シナプス小胞放出部位 (RRP) への安定した小胞補充が保持されることを明らかにした。すなわち、ダイナミン 1 は、活動電位の入力から 50 ミリ秒以降に起こる、高頻度 (0.2-20Hz) 発火時及び発火後に活性化される小胞リサイクル経路を駆動して、RRP に素早くシナプス小胞補充する (時定数: $\tau < 3.6$ s)。また、ダイナミン 3 は、活動電位の入力から 20 ミリ秒以内に起こる、発火頻度に依存しない小胞リサイクル経路を駆動して RRP にシナプス小胞をゆっくり補充する (時定数: $\tau < 70$ s)。さらに、ダイナミン 2 は、両方のリサイクル経路を駆動する。RRP への速いシナプス小胞補充は、貯蔵シナプス小胞群 (Reserve pool、RP) からのシナプス小胞移送であり、クラスリン接着分子アンフィフィジンを介したクラスリンコートエンドサイトーシスに続く小胞リサイクル経路活性化を伴う。なお、RRP への遅いシナプス小胞補充はアンフィフィジンを介さないエンドサイトーシスに続く小胞リサイクル経路活性化を反映することを、私たちのグループがすでに報告している (Mochida ら、2009)。以上、本研究ではダイナミンアイソフォームのそれぞれが、特定の活動電位発火パターンに応じて駆動されるシナプス小胞リサイクル経路を適切に選択する分子として機能することを示した。

論文審査結果の要旨

論文の発表の後、副査2名と研究科委員からの試問ならびに質疑応答を行った。副査からは、電気生理学的な実験は実験経験者には理解できるが、専門家でないものにとっては理解しにくい領域である。発表者は研究背景の説明や研究の目的を明快に説明し、専門家以外の委員にもわかりやすく、発表は予備審査の時に比べて格段の進歩が見られたとのコメントがあった。主な質問として、1) Dyn アイソフォームの細胞内での分布ならびに二量体形成について、2) Dyn の KD ではなく、ドミナントネガティブ体の導入による二量体形成の阻害などの方法も考慮したか、3) siRNA を導入して3日後の細胞を用いて実験を行っているが、細胞の状態が変化していないことはチェックしたか、4) Dyn アイソフォームの存在比はどう異なっているか、5) 今回示したシナプス小胞補充に、アンフィフィジンを介する経路がどのように関わっているのか、6) Dyn1^{-/-}、Dyn2^{-/-}、Dyn3^{-/-}それぞれの KO マウスの特徴、とくに胎生致死かどうかについて、7) Dyn の役割は、中枢と末梢神経でのどのような違いがあるか、8) Dyn のダイナミズムについて、Dyn を短時間 KD した実験であるが、1度消失した Dyn はどのように再生されてくるか、小胞切断後の Dyn の動態について、など詳細な質疑がなされた。発表者はこれらの質問に対して、自己の実験データに基づいて丁寧かつ的確に回答するとともに、現在文献上で知られている事実とまだ未解明の点を明快に説明した。

発表者は電気生理学的手法の限界を理解するとともに、薬理学や神経生理学的全般についての知識が十分あり、今後、本領域の研究者として取り組むべき課題や研究の方向性を明確にもっていることが伺えた。その後の判定会議で、本論文の内容は本学の博士（薬学）の学位に十分値するものと判定された。

【主論文に関する原著論文】

Tanifuji S, Funakoshi-Tago M, Ueda F, Kasahara T, Mochida S. Dynamin isoforms decode action potential firing for synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem.* 288(26):19050-19059, 2013

【参考論文】

Tanifuji S, Aizu-Yokota E, Funakoshi-Tago M, Sonoda Y, Inoue H, Kasahara T. Licochalcones suppress degranulation by decreasing the intracellular Ca²⁺ level and tyrosine phosphorylation of ERK in RBL-2H3 cells. *Int Immunopharmacol.* 10(7):769-776, 2010