

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	谷藤 章太
<p>主 論 文 題 名 :</p> <p>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</p>			
<p>(内容の要旨)</p> <p>【背景・目的】 活動電位発火による神経伝達物質の放出後に、シナプス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) されているが、小胞膜の再利用 (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のに有用であると考えられている。小胞リサイクルには複数の経路が知られているが、様々な活動電位発火に応じて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。</p> <p>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、エンドサイトーシスにおいて小胞膜切断という大役を果たすダイナミンが第一候補に挙げられる。しかし、3種類のアイソフォーム (ダイナミン 1, 2, 3) が確認されているダイナミンは中枢神経系で機能解析が開始されたばかりであり、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。本研究では、培養ラット上頸交感神経節シナプス前細胞に siRNA を導入してダイナミン 1, 2, 3 の発現量を減少し、放出部位に補充される小胞の変動を電気生理学的手法で計測・解析して、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 の駆動するシナプス小胞リサイクル経路の詳細を明らかにすることを試みた。</p> <p>【方法】</p> <p>1. 細胞</p> <p>HEK293T 細胞及び PC12 細胞を用いて、ダイナミン 1, 2, 3 の siRNA と抗体の特異性を確認後、生後 7 日の Wistar/ST ラットより単離して神経成長因子存在下で 5-7 週間培養した上頸交感神経節細胞 (SCG ニューロン) からシナプス応答を記録した。</p> <p>2. ダイナミン 1, 2, 3 の siRNA と抗体の特異性の確認</p> <p>HEK293T 細胞に強制発現させたダイナミン及び PC12 細胞の内在性ダイナミン発現減少をイムノブロットにより解析し、特異性を確認した。特異性を確認した抗体と siRNA を用いて、SCG ニューロンでのダイナミン 1, 2, 3 の発現と siRNA による</p>			

発現減少を免疫組織化学的手法で確認した (Figure 1)。

3. シナプス前終末でのダイナミン 1, 2, 3 の機能解析

微小ガラス管を用いて siRNA をシナプス前細胞に導入し (Figure 1)、3 日後にその効果を電気生理学的手法によりシナプス後細胞で記録される興奮性シナプス後電位 (EPSP) の変化として捉え、活動電位発火パターンを様々に変化させて、放出部位に補充される小胞の変動を解析した。シナプス前細胞に刺入した微小電極に電流を注入して活動電位を発火させ、シナプス後細胞に刺入したもう一方の微小電極から EPSP を測定した (Figure 2)。



Figure 1. SCG ニューロンへのダイナミン siRNA 導入と免疫蛍光染色像

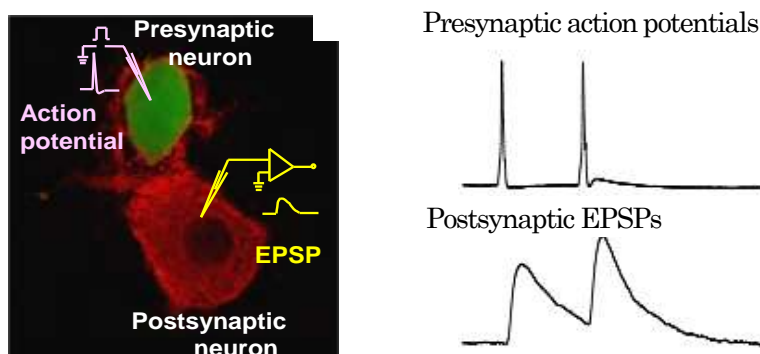


Figure 2. SCG ニューロンからの EPSP 記録方法

【結果】

1. siRNA による HEK293T 細胞、PC12 細胞、培養ラット SCG ニューロンでの siRNA による各ダイナミン発現減少

HEK293T 細胞に強制発現させたダイナミン及び PC12 細胞の内在性ダイナミン発現減少をイムノブロットにより解析して特異性を確認した抗体と siRNA を用い、SCG ニューロンでのダイナミン発現減少を免疫組織染色によって確認した。各 siRNA はダイナミン 1, 2, 3 の発現を特異的にノックダウン (KD) し、発現が約 60% に減少することが確認された。

2. 単発活動電位発火後にダイナミン 1, 2, 3 が担うシナプス小胞放出部位への小胞補充

活動電位発火後どのタイミングでダイナミンの駆動するシナプス小胞リサイクル経路がシナプス小胞放出部位への小胞補充を担うか解析するため、活動電位を様々な間隔で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 (Readily releasable pool, RRP) への小胞補充を評価した。各ダイナミン KD は、活動電位発火間隔が 50-1000 ミリ秒での2回目の伝達物質放出量 (EPSP 振幅)を減少したが、ダイナミン 2, 3 KD は 20, 30 ミリ秒間隔でも EPSP 振幅を減少した。

3. 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

高頻度発火時に各ダイナミンが担う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。ダイナミン 1, 2 KD は高頻度発火時及び発火後にシナプス抑圧の増強が見られたが、ダイナミン 3 KD は発火時にシナプス抑圧増強が見られた。

4. 低頻度発火時のダイナミン 1, 2, 3 が担うシナプス小胞放出部位への小胞補充

活動電位発火後どのタイムウィンドウで各ダイナミンが小胞補充を担うかを確認するため、0.05 または 0.2 Hz 連続発火に対する EPSP 振幅をモニターした。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。

5. 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

各ダイナミンが担う小胞補充経路を解析するため、5 Hz、4分間の連続発火により小胞を枯渇させた RRP への小胞補充の速い過程と遅い過程を EPSP 振幅の回復としてモニターした。ダイナミン 1, 2 KD は速い過程を、ダイナミン 2, 3 KD は遅い回復過程を遅延した。

【考察】 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示唆する。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 に速くシナプス小胞補充する一方、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と考えられる。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と考えられ、各ダイナミン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鍵分子として機能することが示唆された。