

平成 25 年度 博士論文

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

慶應義塾大学大学院薬学研究科  
生化学講座  
80854106 谷藤 章太

指導教員 (主査) 笠原 忠 教授  
担当教員 東京医科大学 細胞生理学講座 持田 澄子 教授

## 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

生化学講座 80854106 谷藤 章太  
(東京医科大学細胞生理学講座)  
指導教員 笠原 忠 教授  
担当教員 持田 澄子 教授  
(東京医科大学細胞生理学講座)

### 【背景・目的】

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いくつかの経路が知られているが、様々な活動電位発火を解読し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。

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。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る。ダイナミン1と3のノックアウトマウスは、ダイナミン1が高頻度刺激時のエンドサイトーシスを担い、ダイナミン2は刺激後のエンドサイトーシスを担うこと、ダイナミン3はエンドサイトーシスに直接関与しないが、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を示唆した。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。

### 【方法】

#### 1. 細胞

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した後、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。

#### 2. ダイナミン1,2,3の siRNA と抗体の特異性の確認

対照（コントロール）として Control negative siRNA を使用した。HEK293T細胞に

MSCV-Puro-N-HA-dynamin 1, MSCV-Puro-N-Flag-dynamin 2, MSCV-Puro-N-Myc-dynamin 3 を強制発現させると同時に siRNA を導入して、イムノブロットにより各 siRNA の特異性を確認した。ダイナミン 1、2、3 抗体特異性をラット脳、PC12 細胞の内在性ダイナミン 1、2、3 のイムノブロットにより確認し、各 siRNA の特異性を PC12 細胞の内在性ダイナミン発現減少により確認した。特異性を確認した抗体と siRNA を用いて、培養上頸交感神経節細胞でのダイナミン 1、2、3 の発現と siRNA によるダイナミン発現減少を免疫組織化学的手法で確認した (Figure 1, 3)。

### 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)、3-4 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生させ、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)。

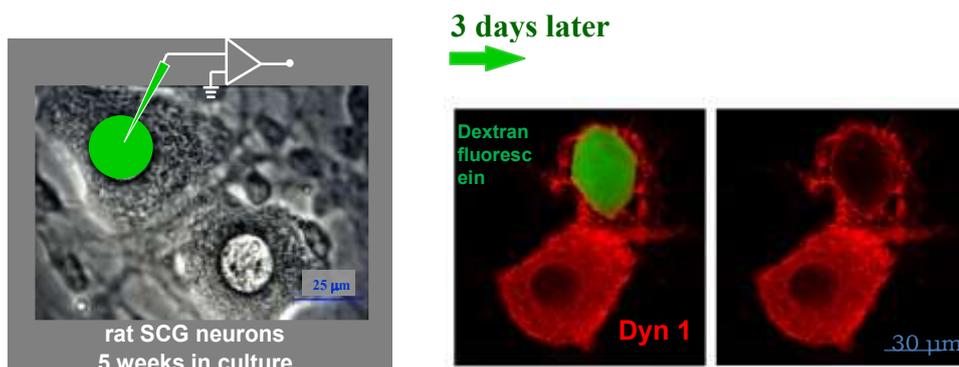


Figure 1. SCG ニューロンへのダイナミン siRNA 導入と免疫蛍光染色像

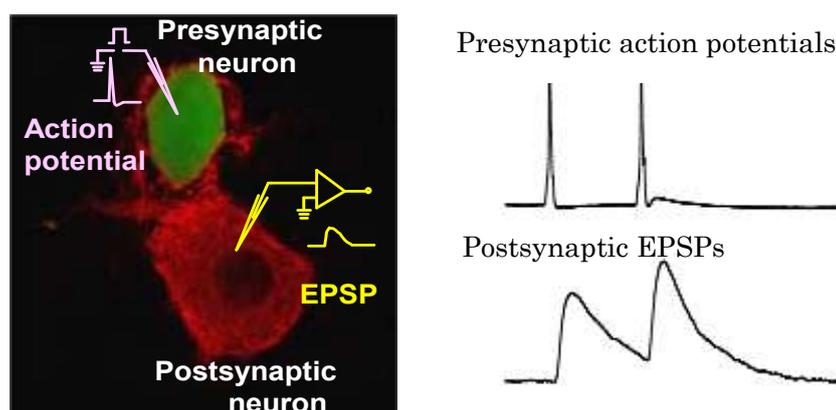


Figure 2. SCG ニューロンからの EPSP 記録方法

#### 【結果】

#### 1. siRNA による HEK293T 細胞、PC12 細胞、培養ラット SCG ニューロンのダイナミン発現減少

ダイナミン 1, 2, 3 を発現させた HEK293T 細胞にコントロールまたはダイナミン 1、

2、3の siRNA (最終濃度 100 pM) をそれぞれ導入し、48 時間後にイムノブロットを行ったところ、各 siRNA は各ダイナミンの発現を特異的に減少した。これらの siRNA は、PC12 細胞の内在性ダイナミン 1、2、3 の発現も特異的に減少した。

さらに SCG ニューロンへのこれらの siRNA 導入は、導入 3 日後に蛍光免疫組織染色によって確認された細胞体及び神経突起でのダイナミン 1、2、3 の発現を特異的に減少し、各 siRNA がダイナミン 1、2、3 を特異的にノックダウン (KD) することが確認された (Fig. 2,3)。なお、イムノブロットに用いたダイナミン 1、2、3 抗体の特異性は、ラット脳、PC12 細胞の内在性ダイナミン 1、2、3 への選択性から確認した。

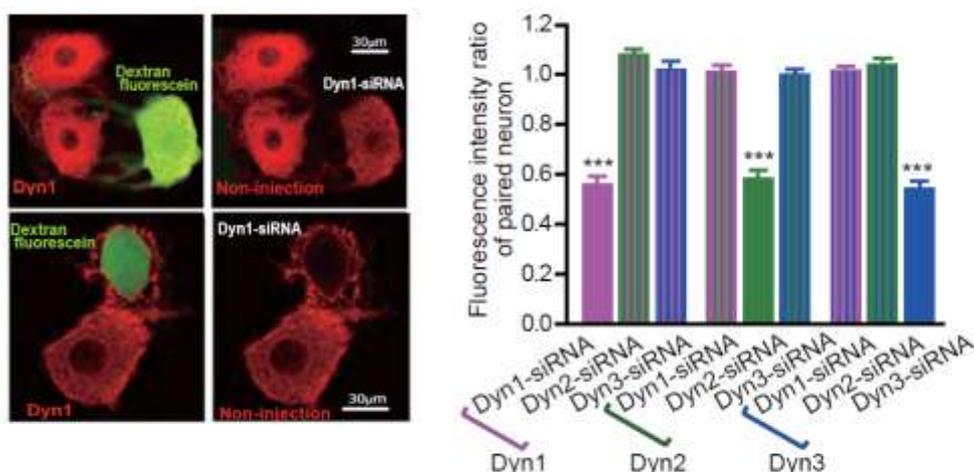


Figure. 3 免疫蛍光染色による SCG ニューロンでのダイナミンノックダウンの確認

## 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。対照シナプスでは、1 発目の活動電位発火後 20-100 ミリ秒の短い間隔での 2 発目の活動電位発火は伝達物質放出を抑圧するが、100-1000 ミリ秒後の活動電位発火は伝達物質の放出抑圧を解消する。ダイナミン 1、2、3 KD 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) を対照の約 60-70% に減少した。さらに、ダイナミン 2、3 KD は 20 ミリ秒間隔でも伝達物質放出抑圧を増強したが、ダイナミン 1 KD は 50 ミリ秒以降の活動電位発火時に伝達物質放出抑圧を増強した。すなわち、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唆される。

## 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伝達物質放出

抑圧 (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が、ダイナミン 1、2 KD は、シナプス抑圧からの回復が損なわれており、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することが示唆される。一方、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することが示唆される。

#### 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ダイナミンの駆動するシナプス小胞リサイクル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、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唆する。

#### 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

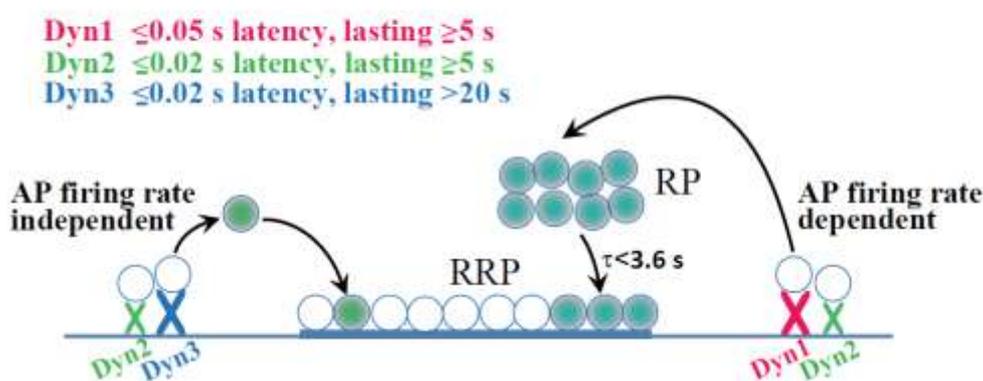
シナプス小胞放出部位への小胞補充には、速い過程と遅い過程がある。ダイナミン 1、2、3 が担うシナプス小胞放出部位への小胞補充経路を解析するため、5 Hz、4 分間の活動電位連続発火により小胞を枯渇させたシナプス小胞放出部位 (RRP) へのシナプス小胞補充を 1 Hz で記録した EPSP 振幅の回復としてモニターした。活動電位連続発火後 10 秒 (速い回復過程) 及び 6 分 (遅い回復過程) での EPSP 振幅は、ダイナミン 1、2 KD により速い回復過程が、ダイナミン 3 KD により遅い回復過程が抑制された。さらに、速い回復過程 (枯渇後 1 分まで) 及び遅い回復過程 (枯渇後 1-6 分) の速度を示す指数関数漸増曲線を 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することを示唆する。

#### 【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明らかにした (Figure 4)。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 (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。このように、哺乳類において 3 種のアイソフォームの存在が知られるダイナミンは、生体内の神経細胞で発生し得る多様な活動電位発火パターンに応答するシナプス小胞リサイクル経路を選択する鍵分子として機能すると考えられる。

**Two RRP recovery pathways with distinct “kinetics”,  
“AP response properties” and “dynamin isoform involvement”**



**Figure 4.** 活動電位発火に応じて異なるダイナミンアイソフォームが駆動する、活性化タイミング及び速度の異なる 2 つのシナプス小胞リサイクル経路

また、本研究結果は、ダイナミン 1、2、3 が様々な活動電位発火パターンを解釈して共通の RRP への小胞補充経路を選択していることを初めて示しただけではなく、活動電位発火後に固有のタイムウィンドウを持ってシナプス小胞補充を調節する分子機構が神経細胞に存在することも示唆する (Figure 4)。交感神経では神経終末に活動電位が到達すると、活動電位の入力から 50 ミリ秒以降にダイナミン 1 が活性化して RRP へのシナプス小胞補充に機能し、その持続時間が約 5 秒間であるが、ダイナミン 2 と 3 はより速く、活動電位の入力から 20 ミリ秒以降には活性化され、それぞれ持続時間が約 5 秒間 (ダイナミン 2)、約 20-120 秒間 (ダイナミン 3) である。

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輸送であり、クラスリン接着分子であるアンフィフィジンを含むクラスリン被覆エンドサイトーシスに続く小胞リサイクル経路の活性化を伴う。一方、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 (Lu, W., Ma, H., Sheng, Z.H., and Mochida, S. Dynamin and activity regulate synaptic vesicle recycling in sympathetic neurons. *J Biol Chem* **284**, 1930-1937, 2009)。

本研究は、ダイナミン 1、2、3 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鍵分子として機能することを明らかにした。

【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 Ca<sup>2+</sup> level and tyrosine phosphorylation of ERK in RBL-2H3 cells. *Int Immunopharmacol*. 10(7):769-776, 2010

## 目次

1. 序論	8
2. 実験材料と方法	11
3. 結果	18
4. 考察	26
5. 結語	29
6. 参考文献	30
7. 図表	34
8. 謝辞	51

## 1. 序論

活動電位発火による神経シグナルは、シナプス前神経終末内のシナプス小胞を形質膜と融合・開口し、シナプス小胞に充填された神経伝達物質をシナプス間隙に放出して、シナプス後細胞に伝達される。神経伝達物質放出後、形質膜と融合した小胞膜は神経終末内に再取り込み (エンドサイトーシス) され、シナプス小胞として再利用 (リサイクル) される。神経伝達物質が充填されたシナプス小胞は、貯蔵小胞と開口放出部位小胞を再補充する。シナプス前神経終末シナプス小胞リサイクルは、活動電位がシナプス終末へ入力する回数や頻度が広範囲に変動するにもかかわらず、小胞の枯渇を防ぎ神経伝達物質放出を安定に維持する。シナプス小胞リサイクルには、多様なシナプス活動に依存して活性化される複数の経路が示唆されており、イメージング、電気生理学的解析は速い経路と遅い経路に分類し (1)、形態学的エンドサイトーシス解析は神経伝達物質を全て放出することなく小胞融合・回収が短時間で起こる”kiss-and-run”、小胞膜がシナプス前終末膜と完全に融合した後に起こるエンドサイトーシス (full-collapse vesicle retrieval)、複数のシナプス小胞に相当する大量の膜を取り込むエンドサイトーシス (bulk modes、バルクエンドサイトーシス) に分類している (2-4)。しかし、緩急シナプス小胞リサイクル経路と 3 種の形態学的エンドサイトーシスの関連は未解析である。

運動神経筋接合部電子顕微鏡像解析により明らかとされた古典的シナプス小胞リサイクル経路 (3) は、クラスリン蛋白複合体で被覆された小胞としてエンドサイトーシスされるシナプス小胞リサイクル経路であり、シナプス小胞が貯蔵小胞 (Reserve pool, RP) を経て開口放出部位小胞 (Readily releasable pool, RRP) に補充される遅い経路である (5)。シナプス活動性の高い海馬シナプス小胞リサイクル経路は、主に放出部位周辺でのクラスリン被覆小胞エンドサイトーシスに駆動される一方、”kiss-and-run”がシナプス小胞開口放出部位に隣接したシナプス前終末の中心付近で起こる (6, 7)。活動電位発火頻度が上昇すると、迅速な小胞の再利用である RP を経ない速いシナプス小胞リサイクル経

路 (2, 8, 9) が活性化されることが示され (9)、様々な活動電位発火パターンに応じてシナプス小胞リサイクル経路が活性化されることを示唆した。一方、活動電位発火頻度が低いときには速い及び遅いエンドサイトーシス両方の経路が駆動するが、発火頻度が増大するに従って遅いエンドサイトーシスが主な経路となるとの報告もあり (10)、さらに、活動電位発火頻度が非常に高いときには、これら2つの経路に加えてバルクエンドサイトーシスも駆動されると報告されている (11-13)。活動電位発火頻度に応じたシナプス小胞リサイクル経路の活性化には、神経終末内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を感知する  $\text{Ca}^{2+}$  センサー蛋白が機能していることが示唆されているが (14-18)、多様な活動電位発火を解読してシナプス小胞リサイクル経路を選択的に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、エンドサイトーシスにおいて形質膜からの小胞切断に機能するダイナミンが第一候補に挙げられる。生理的条件下でのほとんどのエンドサイトーシスでは、ダイナミンが形質膜の切断部位に重合し、GTP を加水分解するエネルギーを利用して小胞が切断される (19)。ダイナミンには3種類のアイソフォーム (ダイナミン 1、2、3) が確認されており、ダイナミン 1、3 は脳神経系に強く発現し、ダイナミン 2 は広範にわたる組織に発現しているが、機能解析は中枢神経系において開始されたばかりである (20-22)。ダイナミン 1 と 3 のノックアウトマウスの中枢神経機能解析は、ダイナミン 1 が高頻度刺激時の速いシナプス小胞リサイクルを担うこと (21, 23)、ダイナミン 2 は刺激後のシナプス小胞リサイクルを担うこと (21)、ダイナミン 3 はシナプス小胞エンドサイトーシスに直接影響しないものの、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促進することを示した (23)。また、ダイナミン阻害剤存在下の脳幹聴覚系巨大シナプス (calyx of Held シナプス) やダイナミン温度感受性変異体 (*Drosophila shibire*) ショウジョウバエの電気生理学的解析による高頻度活動電位発火時のシナプス疲労は、ダイナミンが RRP 維持に関わることを示した (15, 24)。これらの研究によりダイナミンの基本的役割や高頻度に発火する中枢神経系でのアイソフォームの機能は示されたが、低頻度から高頻度に発火する末梢神経系でのアイソフォームの機能を説明していない。

末梢神経系では、培養ラット上頸交感神経節細胞 (SCG ニューロン) に形成されたコリン作動性シナプスでのダイナミン機能解析により、活動電位発火パターンに応じて駆動する発火頻度依存的/非依存的シナプス小胞リサイクル経路の駆動にダイナミンが関与することが確認されているが (25)、ダイナミンアイソフォームの関与は未確認である。交感神経の多様な活動電位発火に対して、シナプス前終末のダイナミン 1、2、3 が、どのようなタイムウィンドウで活性化されるか、さらに、どの小胞リサイクル経路を駆動するかという本研究課題は、活動電位発火パターンを解読してシナプス小胞リサイクル経路を活性化する分子機構の理解に重要であり不可欠である。本研究で用いたアセチルコリンを伝達物質とする長期培養 SCG ニューロンは、蛋白・ペプチド・遺伝子導入が容易であり、速いシナプスでのシナプス前終末蛋白質機能解析に有用な系である (26-28)。本研究では、siRNA を導入してダイナミン 1、2、3 の発現を抑えたシナプス前細胞のシナプス小胞開口放出部位に補充される小胞数の変動を電気生理学的手法により測定して、末梢神経生理的活動電位発火パターンに応じたダイナミン 1、2、3 の活性化とそれらが駆動するシナプス小胞リサイクル経路を明らかにすることを試みた。

## 2. 実験材料と方法

### 試薬

Dynamin 1 siRNA (sc-35234)、dynamin 2 siRNA (sc-35237)、dynamin 3 siRNA (sc-41209)、control negative siRNA (sc-36869) は Santa Cruz より購入した。各 siRNA の配列は以下の通りであり、それぞれ 3 種類の配列の混合 siRNA である。

#### Dynamin 1 siRNA (sc-35234)

sc-35234A:

- Sense: GAGACCAGAUUGACACUUAtt
- Antisense: UAAGUGUCAAUUCUGGUCUCtt

sc-35234B:

- Sense: GCAACCAGAUGAACAAGAAtt
- Antisense: UUCUUGUUCAUCUGGUUUGCtt

sc-35234C:

- Sense: GGAACCAGGUCAUUCGAAAtt
- Antisense: UUUCGAAUGACCUGGUUCtt

#### Dynamin 2 siRNA (sc-35237)

sc-35237A:

- Sense: CCACACGUGUUGAACUUGAtt
- Antisense: UCAAGUUCAACACGUGUGGtt

sc-35237B:

- Sense: GCAUCAAUCGUAUCUUUCAtt
- Antisense: UGAAAGAUACGAUUGAUGCtt

sc-35237C:

- Sense: CUAGUGGACAUGACAAUGAtt
- Antisense: UCAUUGUCAUGUCCACUAGtt

### Dynamin 3 siRNA (sc-41209)

sc-41209A:

- Sense: CAACCAUAUUCGAGAUACUtt
- Antisense: AGUAUCUCGAAUAUGGUUGtt

sc-41209B:

- Sense: GUAGACUCCUACAUGUCAAtt
- Antisense: UUGACAUGUAGGAGUCUACtt

sc-41209C:

- Sense: GAACUCAGUUUGUCUUCUAtt
- Antisense: UAGAAGACAAACUGAGUUCtt

Anti-dynamin 1 antibody (sc-12724)、anti-dynamin 2 (sc-6400) antibody、anti-dynamin 3 antibody (sc-69472)、anti-dynamin 1-3 antibody (sc-11362)、anti-Myc antibody (9E10) は Santa Cruz より購入した。Anti-HA antibody は Roche Diagnostics、anti-Flag antibody は Sigma-Aldrich より購入した。Alexa Fluor 546 rabbit anti-mouse IgG (A11060)、Alexa Fluor 546 donkey anti-goat IgG (A11056)は Molecular Probes より購入した。

### 細胞培養と遺伝子導入 (HEK293T 細胞、PC12 細胞)

HEK293T 細胞 (ヒト胎児腎細胞由来)、PC12 細胞 (ラット副腎髄質褐色細胞腫由来) は理研セルバンクより入手した。

HEK293T 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS、Life Technologies)、2 mM グルタミン、100 unit penicillin/streptomycin (Life Technologies) を加えた DMEM 培地を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 恒温槽内で培養した。N-terminal HA-tagged murine dynamin 1、N-terminal Flag-tagged murine dynamin 2、N-terminal Myc-tagged dynamin 3 をそれぞれ MSCV-IRES-PURO (Clontech) にサブクローニングすることで MSCV-Puro-N-HA-dynamin 1、MSCV-Puro-N-Flag-dynamin 2、MSCV-Puro-N-Myc-dynamin 3 を作成し、FuGENE6 (Roche Diagnostics) を用いて、1 µg の各 DNA をダイナミン 1、2、3 のいずれかの siRNA (100 pM) と同時に遺伝子導入した。コントロールには control

negative siRNA を使用した。

PC12 細胞は、10% FBS、5% ウマ血清 (HS、Life Technologies)、100 unit penicillin/streptomycin を加えた DMEM 培地を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 恒温槽内で培養した。遺伝子導入前日に、10% FBS、5% HS を加えた DMEM (抗生物質不含培地) に替えて培養し、Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を用いてダイナミン 1、2、3 の各 siRNA または control siRNA (100 pM) を遺伝子導入した。

### ウエスタンブロット法 (HEK293T 細胞、PC12 細胞、ラット脳可溶化液)

遺伝子導入した培養細胞は、48 時間後に冷 PBS (-) で洗浄し、NP-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10% glycerol、50 mM NaCl、0.5% sodium deoxycholate、1% Nonidet P-40、20 mM NaF、0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、protease inhibitors) を加えて細胞を可溶化した。同様に、生後 7 日の Wistar ST ラットから採取した脳も NP-40 lysis buffer を加えて脳可溶化液を回収した。回収した可溶化液を 15,000 rpm、5 分間、4°C で遠心後、得られた上清 (Whole cell lysate) に半量の 3×SDS sample buffer を加えて 10 分間煮沸し SDS-PAGE を行った。Whole cell lysate の蛋白量は、BSA をスタンダードとして Bradford 法により定量した。

SDS-PAGE 終了後、PVDF 膜への転写を行い (500 mA、1-2 時間)、蛋白を転写させた PVDF 膜は 5% スキムミルク/TPBS に浸してブロッキングを行った (4°C、overnight または室温、1 時間)。ブロッキングした PVDF 膜を TPBS で希釈した一次抗体 (1:1000) 溶液に浸して室温で 1 時間インキュベーションし、TPBS で洗浄後 (5 分間×5 回) に二次抗体 (1:1000) 溶液と反応させた (室温、1 時間)。一次抗体には anti-HA antibody、anti-Flag antibody、anti-Myc antibody、anti-dynamin 1 antibody、anti-dynamin 2 antibody、anti-dynamin 3 antibody を、二次抗体には一次抗体の動物種に対して適切な HRP 標識二次抗体を使用した。抗体反応が完了した PVDF 膜に ECL detection system (GE Healthcare) を用いて目的蛋白を検出した。

## 細胞培養と遺伝子導入 (上頸交感神経節細胞)

Wistar ST ラットからの上頸交感神経節の採取は、東京医科大学動物実験規定に従って行った。ジエチルエーテル麻酔下の Wistar ST ラット (生後 7 日) から上頸交感神経節を採取し、上皮組織の除去後、0.65 mg/ml collagenase type 1 (Worthington biochemical corporation) /L-15 培地で 37°C、12 分間処理を行った。Collagenase 処理 6 分後に 15 回、12 分後には細胞が懸濁するまで、パスツールピペットを用いてピペッティングを行い、1,500 rpm、3 分間で 2 回遠心後に単離した細胞を 10% FBS、5% HS、100 unit penicillin/streptomycin、50 ng/ml Nerve growth factor (NGF) を加えた MEM 培地を満たした 35 mm ディッシュ内に置いたカバーガラス (18×18 mm、松浪硝子工業) に散布して培養した。

5-7 週間培養してシナプスを形成させた上頸交感神経節細胞 (SCG ニューロン) のシナプス前細胞に (29)、微小ガラス管 (GC120TF-10、HARVARD) を用いてダイナミン 1、2、3 の各 siRNA を導入 (30) し、3-4 日後にその効果を電気生理学的手法により解析した。導入した siRNA 量や細胞のマーカーとして、蛍光デキストラン (dextran fluorescein 10,000 MW、Molecular Probes) を同時にシナプス前細胞に導入した (Fig. 1)。微小ガラス管は、空冷縦型微小電極製作機 (PA-81、成茂科学器械研究所) を用いて抵抗値が 10-20 MΩとなるよう作製した。

## 免疫蛍光染色

siRNA を導入して 3-4 日後の SCG ニューロンを PBS (-) で洗浄 (3 回) 後、4% パラホルムアルデヒド/PBS(-) 溶液で 30 分間固定した。固定した SCG ニューロンを PBS (-) で洗浄 (3 回) した後、1% TritonX-100/PBS(-) 溶液で 5 分間透過処理を行い、再度 PBS (-) で洗浄 (1 回) してから 4% BSA/PBS (-) 溶液で 37°C、1 時間のブロッキングを行った。ブロッキング終了後、PBS (-) で洗浄 (1 回) し一次抗体 (anti-dynamin 1 antibody、anti-dynamin 2 antibody、anti-dynamin 3 antibody、各 1:50) と反応させた (37°C、1 時間)。反応後、PBS (+) で洗浄 (3 回) し、Alexa Fluor 546 rabbit anti-mouse IgG (1:500) または

Alexa Fluor 546 donkey anti-goat IgG (1:500) を二次抗体として反応させた (37°C、1 時間)。さらに PBS (+) で 3 分間、10 回洗浄後、Permanent aqueous mounting medium (Covance research products) で封入した。

共焦点顕微鏡 (Nikon EZ-C1 microscope) を用いて、siRNA と同時に導入した蛍光ダイキストランを確認できる細胞と、それに隣接した未処理の細胞の蛍光像を取得し、ダイナミン 1、2、3 の発現量を定量的に解析した。発現量の解析には MetaMorph software (Molecular Devices) を使用し、それぞれの細胞の細胞質で任意に 3 ヶ所の領域 (各 50  $\mu\text{m}^2$ ) を選択して、領域内の平均蛍光強度を測定した。

### 電気生理学的手法による神経細胞でのダイナミン 1、2、3 の機能解析

siRNA 導入実験では、導入 3-4 日後、導入した細胞をシナプス前細胞とし、それに隣接した導入していない細胞をシナプス後細胞として、興奮性シナプス後電位 (EPSP) を測定した (Fig.1) (30)。また、特異的抗体導入実験では、未処置の SCG ニューロンの EPSP 振幅を 20 分間測定した後にダイナミン特異的抗体をシナプス前細胞に導入し (31)、その効果を確認した。

実験直前に培養液を modified Krebs solution (136 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 11 mM glucose, 3 mM Na-HEPES (pH 7.4), 32-34°C) (25) と交換し、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生させ、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。微小電極は、空冷縦型微小電極製作機 (PA-81、成茂科学器械研究所) を用いて抵抗値が 70-90 M $\Omega$  となるよう微小ガラス管 (GC120F-10、HARVARD) から作製し、微小電極内液 (1 M K-acetate) を充填した。EPSP は、Clampex 10.2 (Molecular Devices) または the data-collecting software written by the late L. Tauc (Centre National de la Recherche Scientifique) を使用して測定、記録し、Origin software (Origin-Lab) を使用して解析を行った。

## **Paired-pulse 法**

1 分ごとにシナプス前細胞に様々な時間間隔 (Inter-stimulus-intervals、ISI) で活動電位を 2 回発生させて EPSP を記録し、1 発目の EPSP 振幅に対する 2 発目の EPSP 振幅の比 (2nd/1st EPSP ratio) を計算した。1 組の SCG ニューロンについて、各 ISI で 3 回 EPSP 記録を行った (Fig. 2)。

## **高頻度活動電位発火時の EPSP 測定**

2 分ごとにシナプス前細胞に 5、10、20 Hz で 2 秒間活動電位を発生させ、連続した EPSP を記録した。1 組の SCG ニューロンについて、各刺激頻度で 3 回 EPSP 記録を行った (Fig.3)。

2 秒間連続刺激後の開口放出可能なシナプス小胞 (Release-ready synaptic vesicles、RRSVs) 補充を確認するため、それぞれの連続刺激に応答した 1 発目の EPSP 振幅値を、最初の記録となる 5 Hz 発火時の 1 発目の EPSP 振幅値で正規化した。また、2 秒間連続刺激中の神経伝達物質放出量を比較するため、Origin 8 “Area”を使用してベースラインからの EPSP 面積を計算し、EPSP 振幅積算値を求めた。さらに、2 秒間連続刺激への応答性を確認するため、2 秒間連続刺激中 1-10 発目の EPSP 欠落数をカウントした。2 秒間連続刺激中の RRSVs 減少を確認するため、EPSP 振幅値 (直前の EPSP 終了時から測定した値) を 1 発目の EPSP 振幅値 (ベースラインから測定した値) で正規化し、2 秒間連続刺激中 1-10 発目の値をグラフ化した。

## **低頻度活動電位発火時の EPSP 測定**

0.05 または 0.2 Hz での連続発火に対する EPSP 振幅を記録し、記録開始後 1 発目の EPSP 振幅 (siRNA を導入した細胞での実験) または抗体導入前 20 分間の平均 EPSP 振幅値 (抗体導入の実験) で正規化した。正規化した EPSP 振幅値から Origin 7.5 “Fit Exponential Decay with First Order or Second Order”を使用して指数関数減衰曲線を算出し、EPSP 振幅減衰の時定数を計算した。

### シナプス小胞枯渇後の RRP 回復過程の測定

1 Hz での連続発火に対する EPSP 振幅をモニターし、コントロールとして 1 分間記録後、5 Hz、4 分間の活動電位連続発火により RRP の小胞を枯渇させ、活動電位連続発火後の EPSP 振幅の回復を測定した。EPSP 振幅値を 4 分間連続発火前の平均 EPSP 振幅値で正規化し、Origin 8 “5 Points Adjacent Averaging” を使用して正規化 EPSP 振幅値の 5 点を移動平均してスムージングした曲線を EPSP 振幅値に重ねて示した。

4 分間連続発火後 0-0.14 分、0-1.0 分、1-6 分の平均 EPSP 振幅値から、Origin 7.5 “Fit Exponential Growth” を使用して一次指数関数漸増曲線を算出し、EPSP 振幅回復の時定数を求めた。速い回復過程については、1 mV 以下の値を示すベースラインでの平均ノイズ振幅 ( $t=0$ ) を平均 EPSP 振幅値から減算し、指数関数曲線を 4 分間連続発火後 0.45 分の EPSP 振幅値で正規化した。

### 統計解析

統計検定は有意水準 5% で対応のない Student's  $t$  検定 (両側検定) で行い、統計学的有意として  $p < 0.05$  と示した。また、多群間の比較を行う際、ANOVA により比較対象を決定し多重比較を行うため、one-way ANOVA による解析後に Bonferroni post hoc 検定で行い、統計学的有意として  $p < 0.05$  と示した。

### 3. 結果

#### 1. siRNA による HEK293T 細胞、PC12 細胞、培養ラット SCG ニューロンのダイナミン発現減少

ダイナミン 1、2、3 の各 siRNA の特異性を確認するため、MSCV-Puro-N-HA-dynamin 1、MSCV-Puro-N-Flag-dynamin 2、MSCV-Puro-N-Myc-dynamin 3 を HEK293T 細胞にトランスフェクションして一過性にダイナミン 1、2、3 を発現させ、同時に導入した siRNA の効果を確認した (Fig. 4, A and B)。siRNA 導入 48 時間後にイムノブロットを行ったところ、各 siRNA は特異的にダイナミン 1、2、3 の発現をそれぞれ減少させた (Fig. 4B)。次にダイナミン 1、2、3 のそれぞれの抗体特異性を確認するため、生後 7 日のラット脳、PC12 細胞に発現している内在性ダイナミン 1、2、3 に対するイムノブロットを行った結果、ラット脳及び PC12 細胞の内在性ダイナミン 1、2、3 は各抗体によって選択的に検出された (Fig. 4, C and D)。さらに、ダイナミン 1、2、3 の各 siRNA は PC12 細胞内在性ダイナミン 1、2、3 の発現も特異的に減少させたことから (Fig. 4D)、本実験で使用した siRNA は特異的にダイナミン 1、2、3 の発現を抑制することが確認できた。

これらのダイナミン 1、2、3 に対する siRNA と抗体を使用して、SCG ニューロンでのダイナミン 1、2、3 の発現と siRNA による発現減少の解析を試みた。SCG ニューロンの初代培養では、シナプス形成のために必要な多数のグリア細胞も培養されており、少数の SCG ニューロンでイムノブロットまたは定量的 PCR を行うことは非常に困難であったため、本実験では免疫蛍光染色により、ダイナミン 1、2、3 発現の確認と siRNA によるノックダウン効果の評価を行った。ダイナミン 1 は細胞体と神経突起に発現が見られ (Fig. 5A, Dyn1)、細胞によっては、隣接した細胞から伸びる神経突起が細胞体を取り囲んでいる様子が確認できた (Fig. 5A, 下段) (29-31)。ダイナミン 1 と同様に、ダイナミン 2、3 も細胞体と神経突起に同程度の発現が見られた (Fig. 5B)。SCG ニュー

ーロンでの siRNA によるダイナミン 1、2、3 発現の減少を定量的に評価するため、細胞質での任意の領域 ( $50 \mu\text{m}^2$ ) 3 ケ所の蛍光強度を測定し、その平均値を対となる隣接した細胞 (siRNA 導入なし) から測定した平均蛍光強度の値で正規化しグラフに示した (Fig. 5, B-D)。ダイナミン 1、2、3 の発現量は、control siRNA を導入した細胞 (コントロール) では変化していなかったが (Fig. 5B)、ダイナミン 1、2、3 の各 siRNA によって有意に減少しており (Fig. 5C)、これらのノックダウン (KD) 効果は一般的に報告されている範囲の発現減少であった (32, 33)。それぞれの siRNA がアイソフォーム特異的にダイナミン 1、2、3 の発現を減少させ、残り 2 つのアイソフォームには影響を与えていないことから (Fig. 5D)、SCG ニューロンで siRNA の効果から結論付けられる重要なこととして、各 siRNA がダイナミン 1、2、3 を特異的にノックダウンし、オフターゲット効果を回避しているといえる。

## 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 RRP への小胞補充を評価した (Fig. 6)。ダイナミン 1、2、3 の各 siRNA または control siRNA をシナプス前細胞に導入したダイナミン 1 KD、2 KD、3 KD シナプスまたは対照シナプスを使用し、20-1000 ミリ秒の ISI で Paired-pulse 法による実験を行った。

実験開始後最初に記録した EPSP 振幅は、ダイナミン 1 KD、2 KD、3 KD シナプスと対照シナプスで差異は見られなかった (Fig. 6B)。以前の報告 (25) と同様に、対照シナプスでは、1 発目の活動電位発火後 20-100 ミリ秒の短い間隔での 2 発目の活動電位発火は伝達物質放出を抑圧するが (Paired-pulse depression, PPD)、100-1000 ミリ秒の

長い間隔での 2 発目の活動電位発火は伝達物質放出の抑圧を解消する (Fig. 7, A-D)。ダイナミン 1 KD、2 KD、3 KD 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) を対照の約 60-70% に減少した (Fig. 7, A-D)。20-100 ミリ秒の短い間隔では、ダイナミン 2 KD、3 KD が伝達物質放出抑圧 (PPD) を増強したのに対し (Fig. 7, C and D)、ダイナミン 1 KD は、50 ミリ秒以降の間隔での活動電位発火時に PPD を増強し、20 ミリ秒と 30 ミリ秒の間隔では PPD の増強が見られなかった (Fig. 7B)。

ダイナミン 1 と 3 のダブルノックアウトマウスでは、活動性の高い中枢神経系の皮質ニューロンにおいて神経伝達物質の放出確率が減少していることが確認されているが (34)、非活動性の培養 SCG ニューロン (29) では、どの siRNA を導入しても実験開始後最初に記録した EPSP 振幅に差異は見られなかったことから (Fig. 6B)、シナプス非活動時の伝達物質放出確率はダイナミン 1 KD、2 KD、3 KD による影響を受けていないと考えられる。このようにダイナミンノックアウトマウスの中枢神経細胞で見出された結果 (21, 23) とは異なり、末梢神経系では、ダイナミンアイソフォームのそれぞれが、活動電位発火後 50 ミリ秒以降に起こる RRP へのシナプス小胞補充に関与するシナプス小胞リサイクル経路を駆動することが推測される。ダイナミン 2、3 が活動電位発火後 20 ミリ秒以内に起こる速いシナプス小胞補充に寄与するのに対して、ダイナミン 1 はこれには寄与しておらず、ダイナミンはアイソフォームごとに主要なシナプス小胞リサイクル経路への関与が異なることが示唆された。

### **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**

高頻度発火時と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。本実験では、活動電位発火頻度が交感神経での生理的範囲内と

なるようにし (35)、中枢神経系においてバルクエンドサイトーシスを誘発する 40 Hz あるいは 80 Hz で 10 秒間活動電位発火させるような (12)、交感神経としては非生理的な強い刺激を避けて検討した。

対照シナプスでは 20 Hz の高頻度活動電位発火により 2 発目の活動電位発火以降に伝達物質放出抑圧 (シナプス抑圧) が観察された (Fig. 8A, Control) が、ダイナミン 1 KD では、20 Hz 連続発火に加えて、より低頻度の 5 Hz、10 Hz 発火でも強いシナプス抑圧を起こした (Fig. 8A, Dyn1-KD)。高頻度発火に応じた連続 EPSP は 2 分ごとに記録しているため、連続 EPSP の最初の EPSP 振幅を 5 Hz 発火時の最初の EPSP 振幅と比較することで高頻度発火後に駆動されるシナプス小胞補充を確認することが可能である。ダイナミン 1 KD では、5 Hz あるいは 10 Hz 連続発火 2 分後のシナプス抑圧からの回復が損なわれていることから (Fig. 8B, Dyn1-KD)、ダイナミン 1 が高頻度活動電位発火時と発火後のシナプス小胞補充に機能していることが示された。また、ダイナミン 2 KD でも 10 Hz 連続発火 2 分後のシナプス抑圧からの回復が、少しではあるが有意に損なわれていた (Fig. 8B, Dyn2-KD)。

次に、ベースラインからの EPSP 面積を計算して EPSP 振幅積算値を求めて高頻度発火 2 秒間の伝達物質放出量を比較したところ、ダイナミン 1 KD では 10 Hz あるいは 20 Hz 連続発火で対照シナプスの約 20-25% に減少していた (Fig. 9A)。また、ダイナミン 2、3 KD でも伝達物質放出量の減少傾向が見られた (Fig. 9A)。そこで、ダイナミン 1 KD、2 KD、3 KD による活動電位連続発火前の RRP サイズへの影響を解析するために、5 Hz 連続発火時の EPSP 振幅積算値のグラフより  $t=0$  に外挿して RRP のシナプス小胞数を概算したところ (36)、ダイナミン 1 KD、2 KD、3 KD でのシナプス小胞数は、118、117、118 であり、対照シナプスのシナプス小胞数 111 とほぼ同値を示した。

さらに、高頻度発火に対する神経伝達物質放出の応答性を確認すると、ダイナミン 1 KD では 5、10、20 Hz 発火中に顕著な EPSP 欠落が認められた (Figs. 8A and 9B)。これらの結果は、高頻度活動電位発火に応じてダイナミン 1 がシナプス小胞リサイクルを駆動することを示唆する。加えて、活動電位連続発火時の最初の 10 発の EPSP 振幅

値を比較すると、対照シナプスにおいて高頻度の 20 Hz 連続発火時に  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介したシナプス抑圧が見られたが (27, 37)、ダイナミン 1 KD、2 KD、3 KD どのシナプスでも低頻度の 5 Hz、10 Hz 連続発火時に同じようなタイムコースで減少していた (Fig. 9C) ため、高頻度活動電位発火時にはダイナミン 1、2、3 それぞれが駆動するシナプス小胞リサイクル経路が活性化されると考えられる。以上の結果は、高頻度活動電位発火時にはダイナミン 1、2、3 がそれぞれシナプス小胞補充による RRP の維持を担い、高頻度活動電位発火後にはダイナミン 1、2 がより長時間持続するシナプス小胞リサイクル経路を駆動することを示唆する。

#### **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、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。

対照シナプスでは記録 50 分間で徐々に EPSP 振幅が減少しており (Fig. 10A, Control)、EPSP 振幅値から指数関数減衰曲線を算出して RRSVs 補充減少の時定数を求めた (Figs. 10 and 11)。ダイナミン 1 KD では、0.2 Hz 連続発火で対照シナプスでの EPSP 振幅減少の促進が見られたが、0.05 Hz では EPSP 振幅減少の促進は見られなかった (Fig. 11)。それに対しダイナミン 3 KD は、0.05 Hz、0.2 Hz 連続発火の両方で顕著な EPSP 振幅減少を促進し、対照シナプス及びダイナミン 1 KD、2 KD と比較して有意に時定数が減少した (Fig. 11A, right panel, and B)。さらに、ダイナミン 3 KD では EPSP 振幅の減少が 0.05 Hz、0.2 Hz 連続発火の両方で見られたことに対し、ダイナミン 1 KD では 0.2 Hz 連続発火でのみ EPSP 振幅の減少が見られたことから、ダイナミン 1 は発火頻度依存的にシナプス小胞補充に機能することが考えられた。また、ダイナミン 2 KD

では、0.05 Hz 連続発火でも EPSP 振幅の減少傾向があるものの、0.2 Hz 連続発火でより速い EPSP 振幅の減少が見られた (Fig. 11)。これらのダイナミン 1 KD、2 KD、3 KD 実験と一致する結果が、ダイナミン 1、2、3 の特異的抗体及びダイナミン抗体 (ダイナミン 1、2、3 に反応) を導入した実験でも確認された。ダイナミン抗体、ダイナミン 3 抗体は 0.05 Hz、0.2 Hz 連続発火の両方で EPSP 振幅減少を顕著に促進したが、ダイナミン 1、2 抗体はより高頻度刺激である 0.2 Hz 連続発火で EPSP 振幅減少を促進した (Fig. 12)。

本実験で使用した siRNA 及び抗体はダイナミンアイソフォーム特異的に機能阻害していることを確認するために、ダイナミン 1 KD シナプス前細胞にダイナミン 1 特異的抗体を導入した実験を行ったところ、EPSP 振幅減少の促進は加算されなかった。すなわち、本実験結果が、発火頻度依存的な小胞補充にダイナミン 1、2 が機能し、その持続時間が約 5 秒間、発火頻度非依存的な小胞補充にダイナミン 3 が機能し、その持続時間は 20 秒以上であることを支持する。

## 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

シナプス小胞補充過程の異なる小胞リサイクル経路活性化に対し、ダイナミン 1、2、3 がどのような機能を担っているかを検討するため、枯渇させた後の RRP へのシナプス小胞補充をモニターして解析を行った。SCG ニューロンでは、RRP 枯渇後のシナプス小胞放出部位への小胞補充に速い過程と遅い過程があり、それぞれ異なるシナプス小胞リサイクル経路が駆動されることを、すでに確認している (Fig. 13, A and B) (25)。そこで、小胞補充の速い過程と遅い過程に対してダイナミン 1、2、3 がアイソフォーム特異的に機能していることを確認するため、同様のプロトコールを使用し、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 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 (Fig. 13, B-F)。

まず、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 振幅を測定し (Fig. 14)、ダイナミン 1、2、3 が速い回復過程と遅い回復過程に及ぼす影響を確認したところ、ダイナミン 1 KD、2 KD、3 KD のそれぞれで速い回復過程と遅い回復過程の両方の回復過程抑制が観察された (Fig. 13, B-F)。しかし、活動電位連続発火後 10 秒ではダイナミン 1 KD、2 KD で、発火後 6 分ではダイナミン 3 KD で EPSP 振幅回復の有意な減少が見られた (Fig. 14)。これらの結果から、ダイナミンアイソフォームごとに速さの異なる小胞補充経路駆動を担っていることが示唆される。

次に、ダイナミンアイソフォームが駆動するシナプス小胞リサイクル経路を確認するため、速い回復過程と遅い回復過程の解析を行った。活動電位連続発火後 0-7.8 秒 (Fig. 15A)、0-60 秒 (Figs. 15B and 16A)、1-6 分 (Figs. 15C and 16B) までの EPSP 振幅値から指数関数漸増曲線を算出して時定数を求めた。その結果、対照シナプスでは、速い回復過程 (枯渇後 60 秒まで) の時定数が 3.6 秒 (Figs. 15B and 16A)、遅い回復過程 (枯渇後 1-6 分) の時定数が 70 秒 (Figs. 15C and 16B) であった。速い回復過程ではダイナミン 3 KD が (Fig. 16A)、遅い回復過程ではダイナミン 1 KD が対照シナプスの時定数と同様の値を示している (Fig. 16B) 一方、ダイナミン 1 KD、2 KD が速い回復過程を遅延し (Fig. 16A)、ダイナミン 2 KD、3 KD が遅い回復過程を遅延した (Fig. 16B)。ダイナミン 1 KD、2 KD、3 KD による回復速度の変化をより明確に比較するために、速い回復過程 (枯渇後 60 秒まで) (Fig. 16A) 及び遅い回復過程 (枯渇後 1-6 分) (Fig. 16B) の指数関数曲線を、0.45 分 (速い回復過程) (Fig. 16C) または 6 分 (遅い回復過程) (Fig. 16D) の EPSP 振幅値で正規化したところ、速い回復過程をダイナミン 1 KD、2 KD が遅延し (Fig. 16C)、遅い回復過程をダイナミン 2 KD、3 KD が遅延したことが顕著であった (Fig. 16D)。このように指数関数曲線を正規化して解析することにより、速い小胞補充を伴うシナプス小胞リサイクル経路と遅い小胞補充を伴うシナプス小胞リサイクル経路には、それぞれ異なったダイナミンアイソフォームが選択的に機能することが明らかとなった。

さらに、ダイナミン 1、2、3 のそれぞれが異なるシナプス小胞リサイクル経路を駆

動することを確認するため、ダイナミン 1、2、3 トリプルノックダウン (TKD) で、同様の実験を行い確認したところ、ダイナミン 1KD、2KD、3KD それぞれの結果と一致した。すなわち、EPSP 振幅の回復が減少しており (Figs. 13F and 14)、速い回復過程と遅い回復過程の両方が遅延していた (Fig. 16)。以上の結果は、ダイナミン 1、2、3 の駆動する小胞リサイクリング経路により補充される RRP は共通であり、ダイナミン 1、2、3 の機能は協調的であるが、非加算的であることが示唆される。加えて、ダイナミン 1、2、3 のうち 2 種のアイソフォームが残っている状態であっても EPSP 振幅の回復は遅延しており、ダイナミンアイソフォーム同士の機能は非加算的であると考えられる。そこで、ダイナミン 1、2、3 の実際の RRP への小胞補充への寄与を推定するため、ダイナミン 1 KD、2 KD、3 KD での EPSP 振幅 (Fig. 13, C-E) を加算して 2 で割った値をダイナミン 1、2、3 全てが機能している推測 EPSP 値とすると (Fig. 17)、対照シナプスと比較して推測 EPSP 振幅の回復は速い回復過程で 20%、遅い回復過程で 25%減少していた。これらの結果から、どちらの速度の回復過程においてもダイナミン以外の要因が RRP への小胞補充に関与する可能性が考えられる (Fig. 17) (6, 10, 15, 25)。しかし、高頻度発火時及び発火後に起こるシナプス小胞枯渇後の RRP への速い小胞補充に機能している重要な分子はダイナミン 1 であり (Figs. 8, 9 and 18)、発火頻度に依存しない別経路の小胞リサイクリングによる RRP への遅いシナプス小胞補充にはダイナミン 3 が主に機能している (Figs. 10-12 and 18)。また、異なった活動電位発火パターンに対してダイナミン 1 に類似、あるいはダイナミン 3 に類似した応答を示したダイナミン 2 は、速い小胞補充と遅い小胞補充の両方の経路に同程度寄与することが可能であることが示唆される。ただし、両方の経路をサポートするダイナミン 2 が、どの程度、どちらの小胞補充経路に関与するかは、神経細胞での特定の活動電位発火頻度によって決定されることが考えられる (Fig. 8-12 and 18)。

## 4. 考察

本研究では、末梢神経系において、生理的広範囲に変動する様々な活動電位発火頻度に応じて駆動するシナプス小胞リサイクルの鍵となる分子機構を明らかにすることを目的として検証を行った結果、ダイナミン 1、2、3 のそれぞれが多様な活動電位発火パターンに応じて駆動され、RRP にシナプス小胞を補充す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が示唆された (Fig. 18)。ダイナミン 1 は、シナプス前終末への活動電位入力から 50 ミリ秒以降に起こる、高頻度 (0.2-20 Hz) 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。また、ダイナミン 3 は、活動電位入力から 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 にゆっくりシナプス小胞を補充する。さらに、ダイナミン 2 は両方の小胞リサイクル経路を駆動する。このように、哺乳類において 3 種のアイソフォームの存在が知られるダイナミンは、生体内の神経細胞で発生し得る多様な活動電位発火パターンに応答するシナプス小胞リサイクル経路を選択する鍵分子として機能すると考えられる。

さらに、本研究結果は、ダイナミン 1、2、3 が様々な活動電位発火パターンを解読して共通のシナプス小胞放出部位 (RRP) への小胞補充経路を選択していることを初めて示しただけではなく、活動電位発火後に固有のタイムウィンドウを持ってシナプス小胞補充を調節する分子機構が神経細胞に存在することも示唆する (Fig. 18)。交感神経では神経終末に活動電位が到達すると、活動電位発火後 50 ミリ秒 (Fig. 7B) 以降にダイナミン 1 が活性化して RRP へのシナプス小胞補充に機能し、その持続時間が約 5 秒間 (Fig. 11B) であるが、ダイナミン 2 と 3 はより速く、活動電位発火後 20 ミリ秒 (Fig. 7, C and D) 以降には活性化され、それぞれ持続時間が約 5 秒間 (ダイナミン 2) (Fig. 11B)、約 20 秒 (Fig. 11A) -120 秒間 (Fig. 8B) (ダイナミン 3) である。高頻度の活動電位発火時及び発火後にダイナミン 1、2 の活性化時間は延長したが、ダイナミン 3 の活性化時間は活動電位発火頻度に依存しない (Fig. 8B)。RRP 枯渇後では、ダイナミン

1、2 がシナプス小胞補充の速い回復過程 ( $\tau < 3.6$  秒) を担い、その一方で、ダイナミン 2、3 が遅い回復過程 ( $\tau < 70$  秒) を担っている (Figs. 13-17)。

RRP への速いシナプス小胞補充は、RP からのシナプス小胞輸送であり、クラスリン接着分子であるアンフィフィジンを含むクラスリン被覆小胞エンドサイトーシスに続くシナプス小胞リサイクル経路の活性化を伴う。一方、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の活性化を反映している (25)。ダイナミン 1 と 2 の機能阻害により、アンフィフィジンを介したエンドサイトーシスを伴うシナプス小胞リサイクル経路による RRP の小胞補充が遅延したことから、ダイナミン 1 と 2 は RP の補填速度を調節するだけでなく、RP のシナプス小胞数 (RP サイズ) をも調節していることが推測される。高頻度活動電位発火時及び発火後には、連続した神経伝達物質放出により RRP サイズが減少するが、シナプス小胞の供給源となる RP へ小胞を補充する経路であるアンフィフィジンを介したエンドサイトーシスを伴うシナプス小胞リサイクル経路がダイナミン 1 と 2 の活性化により促進され、その結果、RRP サイズが一定値に保たれる可能性を示唆する。本研究結果は、活動電位が、活動電位発火パターンに応じたシナプス小胞補充の一連の過程を駆動していることを示し、RRP へシナプス小胞補充するために、多様な活動電位発火パターンに対応することが可能な 2 つのシナプス小胞リサイクル経路が存在することは、シナプス伝達の維持にとって重大な意味を持つことが明らかとなった。

膜容量測定や、pH 感受性蛍光蛋白質フルオリンとシナプス小胞 SNARE 蛋白質シナプトブレビンの融合蛋白であるシナプトフルオリンを使用したイメージング解析により推定されているエンドサイトーシスの速度は数 100 ミリ秒から数 100 秒の範囲であると報告されてきた (1)。これらの速度と比較して、本実験結果ではより速い数 10 ミリ秒というタイムウィンドウでおこるダイナミン欠損による RRP への小胞補充の阻害は、シナプス小胞放出部位に残存する小胞膜と小胞蛋白が、ダイナミンを介してクリアランスされる可能性をも示唆する。シナプス小胞の膜輸送やアクティブゾーンのクリアランスにダイナミンの速い機能が必要であることは、温度感受性突然変異体ショ

ウジョウバエの実験 (24) やダイナミンの機能障害を起こした calyx of Held シナプスでの実験 (15) の結果により既に示唆されている。本研究より、3種のダイナミンアイソフォームのうち、2種がそれぞれ活動電位発火応答の異なるシナプス小胞リサイクル経路に機能し、残りの1種が両方の機能を活動電位発火パターンによって使い分けていることが明らかとなり、ダイナミンによるエンドサイトーシス機構が、生体内の神経細胞での様々な活動電位発火の際に RRP へとシナプス小胞を補充するよう適切に機能していることが窺える。また、calyx of Held シナプスで確認された速いダイナミン機能は RRP へのシナプス小胞補充の律速段階となるであろうと考えられており (15, 38)、ダイナミンアイソフォームの使い分けが膜輸送と神経活動性をコントロールする重大なポイントであると推測される。事実、図 8、9 に示したように、SCG ニューロンのダイナミン機能障害は、高頻度活動電位発火を RRP への小胞補充に解読できていない (Figs. 8, 9 and 13-17)。RRP への小胞補充速度に影響する要因として、ダイナミン機能に加えて、シナプス小胞開口放出の起こる数 (10) や部位 (6) も考えることができる (Figs. 13-17)。

本研究結果は、複雑な蛋白複合体が関与する膜輸送経路が、活動電位という生体電気信号によって適切に選択、制御される一連の分子機構の詳細を明らかにするための基盤を提示した。すなわち、ダイナミンアイソフォームそれぞれが RP と RRP を制御することで、シナプスが素早く多様な活動電位連続発火にダイナミックに反応して神経のシナプス活動を反映する EPSP へと解読する、一方、低頻度の単発活動電位発火に対しても安定したシナプス小胞リサイクルが保持されるという新規の概念を示した。今後取り組むべき課題として、本研究により明らかとなったダイナミンアイソフォームに依存した2つのシナプス小胞リサイクル経路活性化に際し、活動電位発火を感知して異なるダイナミンを適宜に活性化する分子機構を解明することが急務である。

## 5. 結語

末梢交感神経の生理的活動電位発火に伴って、シナプス前終末のダイナミン 1、2、3 は、特定の活動電位発火パターンに応じて活性化されるシナプス小胞リサイクル経路を適宜に選択して駆動する鍵分子として機能する。すなわち、どのような活動電位発火パターンであっても、3 種のダイナミンアイソフォームの仲介によってシナプス小胞放出部位への安定した小胞補充が保持されて、シナプス伝達が維持されることを明らかにした。

## 6. 参考文献

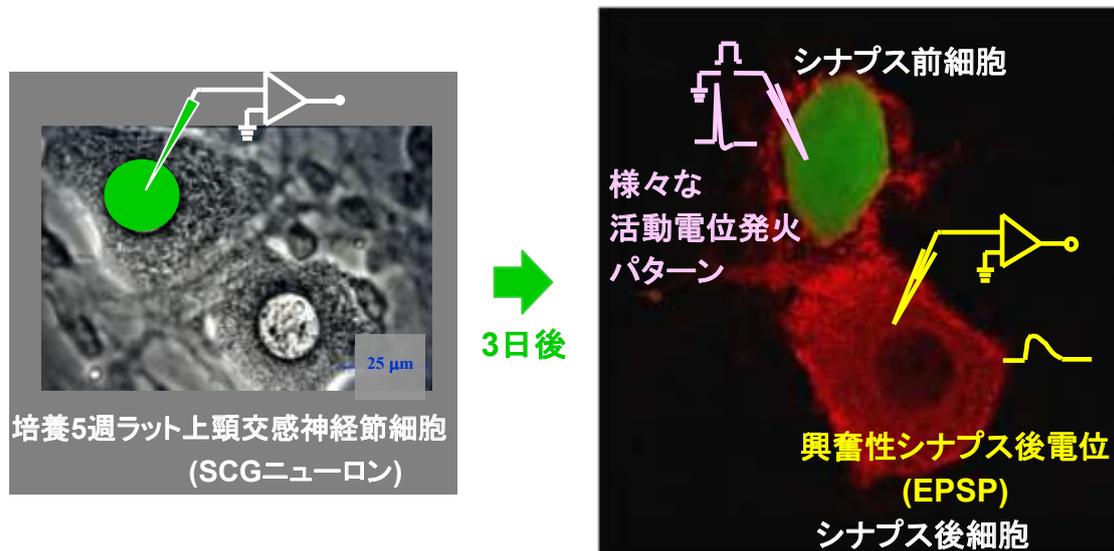
1. Wu, L. G. (2004) Kinetic regulation of vesicle endocytosis at synapses. *Trends Neurosci* **27**, 548-554
2. Ceccarelli, B., Hurlbut, W. P., and Mauro, A. (1973) Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* **57**, 499-524
3. Heuser, J. E., and Reese, T. S. (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* **57**, 315-344
4. Royle, S. J., and Lagnado, L. (2003) Endocytosis at the synaptic terminal. *J Physiol* **553**, 345-355
5. Kuromi, H., and Kidokoro, Y. (2002) Selective replenishment of two vesicle pools depends on the source of  $Ca^{2+}$  at the Drosophila synapse. *Neuron* **35**, 333-343
6. Park, H., Li, Y., and Tsien, R. W. (2012) Influence of synaptic vesicle position on release probability and exocytotic fusion mode. *Science* **335**, 1362-1366
7. Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S. J., and Lagnado, L. (2006) Crathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron* **51**, 773-786
8. Artalejo, C. R., Henley, J. R., McNiven, M. A., and Palfrey, H. C. (1995) Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves  $Ca^{2+}$ , GTP, and dynamin but not clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8328-8332
9. Zhang, Q., Li, Y., and Tsien, R. W. (2009) The dynamic control of kiss-and-run and vesicular reuse probed with single nanoparticles. *Science* **323**, 1448-1453
10. Zhu, Y., Xu, J., and Heinemann, S. F. (2009) Two pathways of synaptic vesicle retrieval revealed by single-vesicle imaging. *Neuron* **61**, 397-411
11. Clayton, E. L., Evans, G. J., and Cousin, M. A. (2008) Bulk synaptic vesicle endocytosis is rapidly triggered during strong stimulation. *J Neurosci* **28**, 6627-6632

12. Wu, L. G., Ryan, T. A., and Lagnado, L. (2007) Modes of vesicle retrieval at ribbon synapses, calyx-type synapses, and small central synapses. *J Neurosci* **27**, 11793-11802
13. Wenzel, E. M., Morton, A., Ebert, K., Welzel, O., Kornhuber, J., Cousin, M. A., and Groemer, T. W. (2012) Key physiological parameters dictate triggering of activity-dependent bulk endocytosis in hippocampal synapses. *PLoS One* **7**, e38188
14. Balaji, J., Armbruster, M., and Ryan, T. A. (2008) Calcium control of endocytic capacity at a CNS synapse. *J Neurosci* **28**, 6742-6749
15. Hosoi, N., Holt, M., and Sakaba, T. (2009) Calcium dependence of exo- and endocytotic coupling at a glutamatergic synapse. *Neuron* **63**, 216-229
16. Wu, X. S., McNeil, B. D., Xu, J., Fan, J., Xue, L., Melicoff, E., Adachi, R., Bai, L., and Wu, L. G. (2009)  $Ca^{2+}$  and calmodulin initiate all forms of endocytosis during depolarization at a nerve terminal. *Nat. Neurosci.* **12**, 1003-1010
17. Nicholson-Tomishima, K., and Ryan, T. A. (2004) Kinetic efficiency of endocytosis at mammalian CNS synapses requires synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16648-16652
18. Poskanzer, K. E., Marek, K. W., Sweeney, S. T., and Davis, G. W. (2003) Synaptotagmin I is necessary for compensatory synaptic vesicle endocytosis *in vivo*. *Nature* **426**, 559-563
19. Takei, K., McPherson, P. S., Schmid, S. L., and De Camilli, P. (1995) Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature* **374**, 186-190
20. Cao, H., Garcia, F., and McNiven, M. A. (1998) Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **9**, 2595-2609
21. Ferguson, S. M., Brasnjo, G., Hayashi, M., Wolfel, M., Collesi, C., Giovedi, S., Raimondi, A., Gong, L. W., Ariel, P., Paradise, S., O'Toole, E., Flavell, R., Cremona, O., Miesenbock, G., Ryan, T. A., and De Camilli, P. (2007) A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science* **316**, 570-574

22. Cook, T. A., Urrutia, R., and McNiven, M. A. (1994) Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 644-648
23. Raimondi, A., Ferguson, S. M., Lou, X., Armbruster, M., Paradise, S., Giovedi, S., Messa, M., Kono, N., Takasaki, J., Cappello, V., O'Toole, E., Ryan, T. A., and De Camilli, P. (2011) Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* **70**, 1100-1114
24. Kawasaki, F., Hazen, M., and Ordway, R. W. (2000) Fast synaptic fatigue in shibire mutants reveals a rapid requirement for dynamin in synaptic vesicle membrane trafficking. *Nat Neurosci* **3**, 859-860
25. Lu, W., Ma, H., Sheng, Z. H., and Mochida, S. (2009) Dynamin and activity regulate synaptic vesicle recycling in sympathetic neurons. *J Biol Chem* **284**, 1930-1937
26. Mochida, S., Westenbroek, R. E., Yokoyama, C. T., Itoh, K., and Catterall, W. A. (2003) Subtype-selective reconstitution of synaptic transmission in sympathetic ganglion neurons by expression of exogenous calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2813-2818
27. Mochida, S., Few, A. P., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2008) Regulation of presynaptic Ca<sub>v</sub>2.1 channels by Ca<sup>2+</sup> sensor proteins mediates short-term synaptic plasticity. *Neuron* **57**, 210-216
28. Mochida, S. (2011) Activity-dependent regulation of synaptic vesicle exocytosis and presynaptic short-term plasticity. *Neurosci Res* **70**, 16-23
29. Mochida, S., Nonomura, Y., and Kobayashi, H. (1994) Analysis of the mechanism for acetylcholine release at the synapse formed between rat sympathetic neurons in culture. *Microsc Res Tech* **29**, 94-102
30. Krapivinsky, G., Mochida, S., Krapivinsky, L., Cibulsky, S. M., and Clapham, D. E. (2006) The TRPM7 ion channel functions in cholinergic synaptic vesicles and affects transmitter release. *Neuron* **52**, 485-496
31. Mochida, S., Kobayashi, H., Matsuda, Y., Yuda, Y., Muramoto, K., and Nonomura, Y. (1994) Myosin II is involved in transmitter release at synapses formed between rat sympathetic

- neurons in culture. *Neuron* **13**, 1131-1142
32. Su, Q., Cai, Q., Gerwin, C., Smith, C. L., and Sheng, Z. H. (2004) Syntabulin is a microtubule-associated protein implicated in syntaxin transport in neurons. *Nat Cell Biol* **6**, 941-953
  33. Ying, Y., Li, L., Cao, W., Yan, D., Zeng, Q., Kong, X., Lu, L., Yan, M., Xu, X., Qu, J., Su, Q., and Ma, X. (2012) The microtubule associated protein syntabulin is required for glucose-stimulated and cAMP-potentiated insulin secretion. *FEBS Lett* **586**, 3674-3680
  34. Lou, X., Fan, F., Messa, M., Raimondi, A., Wu, Y., Looger, L. L., Ferguson, S. M., and De Camilli, P. (2012) Reduced release probability prevents vesicle depletion and transmission failure at dynamin mutant synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E515-523
  35. Libet, B., and Mochida, S. (1988) Long-term enhancement (LTE) of postsynaptic potentials following neural conditioning, in mammalian sympathetic ganglia. *Brain Res* **473**, 271-282
  36. Schneggenburger, R., Meyer, A. C., and Neher, E. (1999) Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron* **23**, 399-409
  37. Leal, K., Mochida, S., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2012) Fine-tuning synaptic plasticity by modulation of Ca<sub>v</sub>2.1 channels with Ca<sup>2+</sup> sensor proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 17069-17074
  38. Haucke, V., Neher, E., and Sigrist, S. J. (2011) Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Neurosci* **12**, 127-138

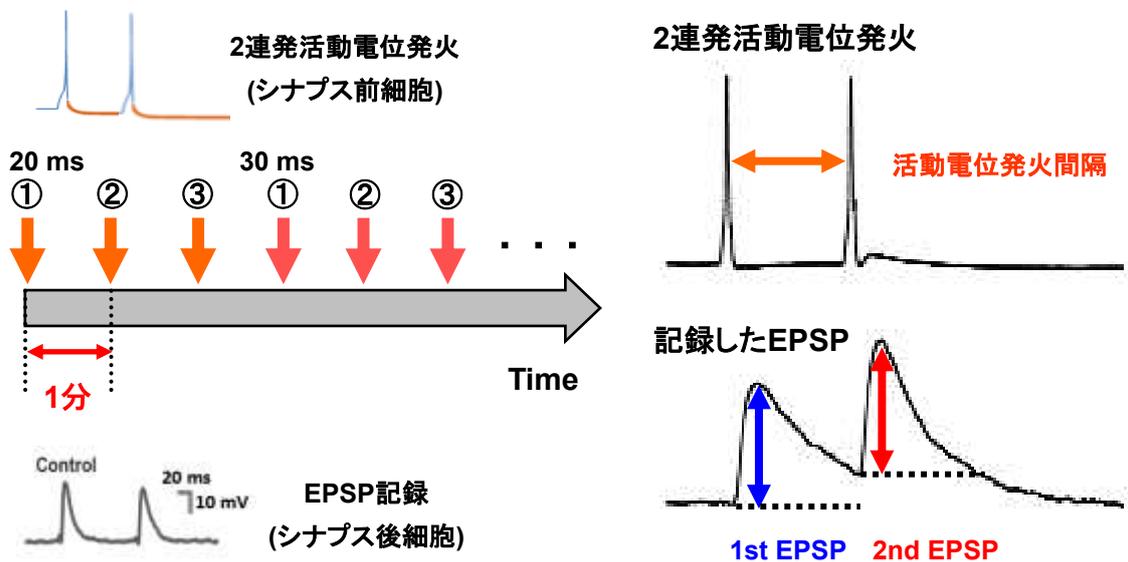
## 7. 図表



**Figure 1.** 培養ラット上頸交感神経節細胞 (SCG ニューロン) への siRNA 導入と興奮性シナプス後電位 (EPSP) 記録方法

5週間培養してシナプスを形成させた SCG ニューロンのシナプス前細胞に、微小ガラス管を用いてダイナミン1、2、3の各 siRNA を導入した (左図)。導入した siRNA 量や細胞のマーカとして、蛍光デキストランを同時にシナプス前細胞に導入した。siRNA 導入した細胞をシナプス前細胞とし、それに隣接した導入していない細胞をシナプス後細胞として、EPSP を測定し解析を行った (右図)。

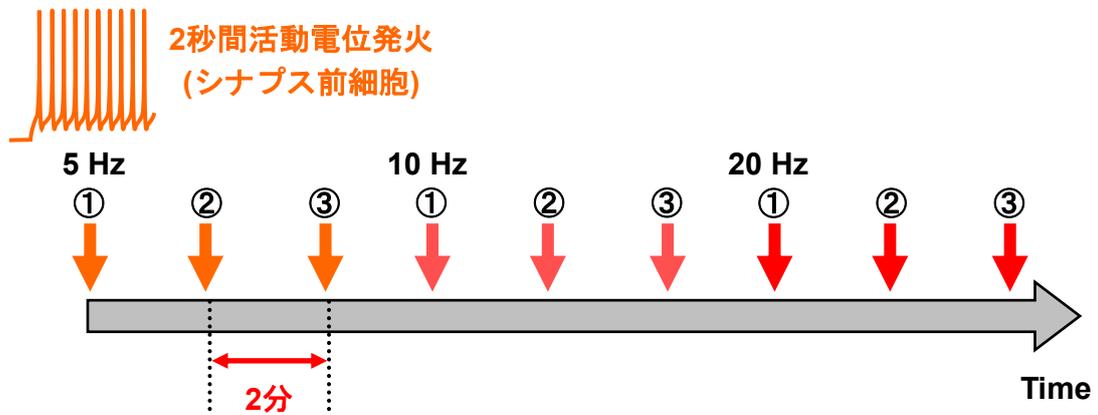
## Paired-pulse法



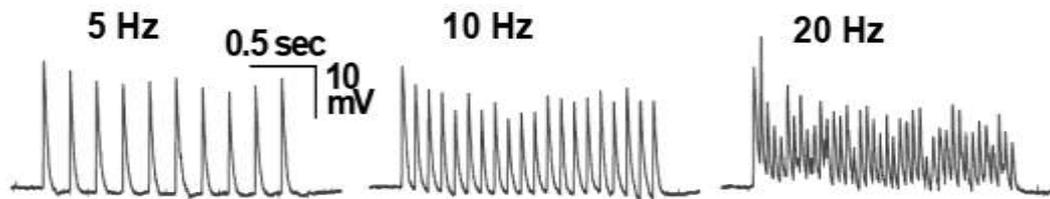
**Figure 2.** 単発活動電位発火後のシナプス小胞放出部位への小胞補充を評価する Paired-pulse 法

1 分ごとにシナプス前細胞に様々な時間間隔 (Inter-stimulus-intervals、ISI) で活動電位を 2 回発生させて EPSP を記録し、1 発目の EPSP 振幅に対する 2 発目の EPSP 振幅の比 (2nd/1st EPSP ratio) を計算した (右図)。1 組の SCG ニューロンについて、20-1000 ミリ秒の各 ISI で 3 回 EPSP 記録を行った。

### 高頻度活動電位発火時のEPSP測定

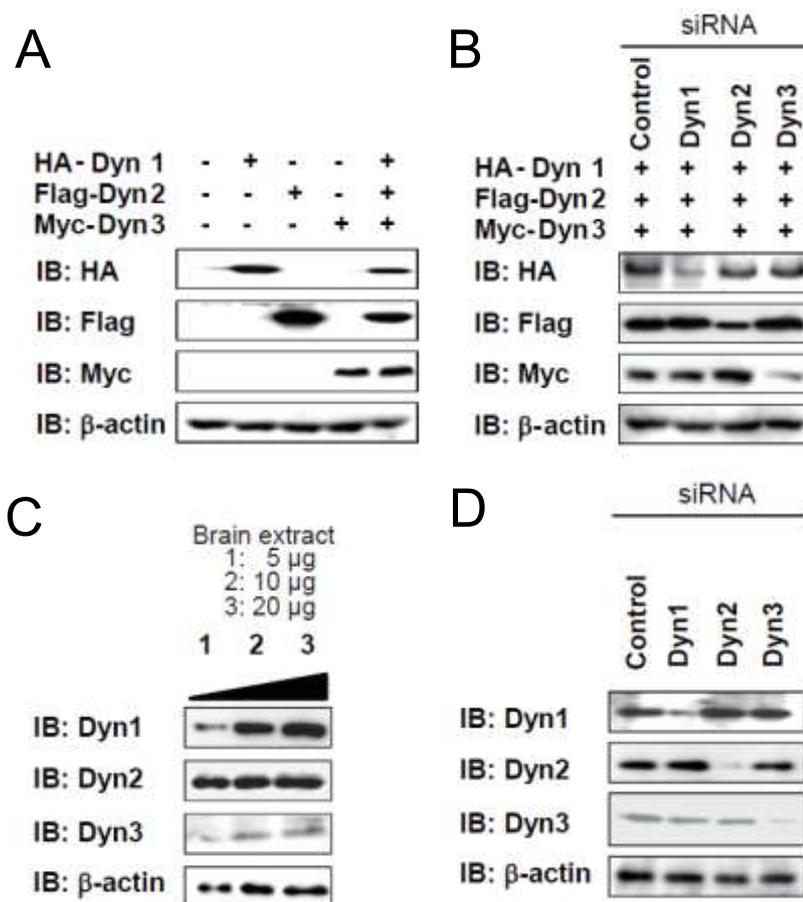


### 連続EPSP記録 (シナプス後細胞)



**Figure 3.** 高頻度活動電位発火時の EPSP 測定による 2 秒間連続刺激後のシナプス小胞部位への小胞補充の評価

2 分ごとにシナプス前細胞に 5、10、20 Hz で 2 秒間活動電位を発生させ、連続した EPSP を記録した。1 組の SCG ニューロンについて、各刺激頻度で 3 回 EPSP 記録を行った。

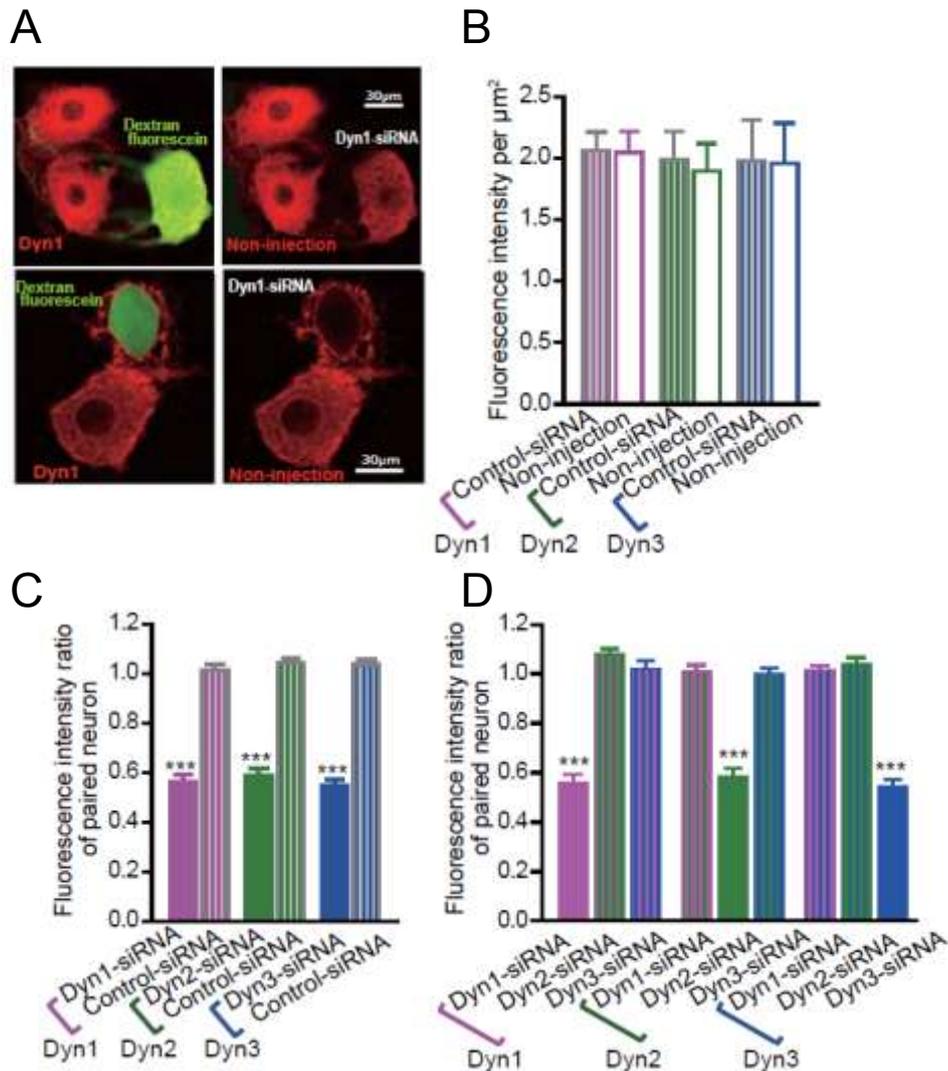


#### Figure 4. ダイナミン siRNA 及び抗体特異性の確認

(A, B) HEK293T 細胞に、1  $\mu$ g の MSCV-Puro-N-HA-dynamin 1 (HA-Dyn1)、MSCV-Puro-N-Flag-dynamin 2 (Flag-Dyn2)、MSCV-Puro-N-Myc-dynamin 3 (Myc-Dyn3)を発現させ (A)、同時に導入した 100 pM siRNA (Control siRNA、Dyn1 siRNA、Dyn2 siRNA、Dyn3 siRNA) の特異性を、siRNA 導入 48 時間後に抗 HA 抗体、抗 Flag 抗体、抗 Myc 抗体を用いたイムノプロットにより確認した (B)。

(C) 生後 7 日の Wistar ST ラットから採取した脳の内在性ダイナミン 1、2、3 を、抗ダイナミン 1 抗体、抗ダイナミン 2 抗体、抗ダイナミン 3 抗体を用いたイムノプロットにより検出した。

(D) PC12 細胞の内在性ダイナミン 1、2、3 に対する siRNA の特異性を、siRNA 導入 48 時間後に抗ダイナミン 1 抗体、抗ダイナミン 2 抗体、抗ダイナミン 3 抗体を用いたイムノプロットにより確認した。



**Figure 5.** 免疫蛍光染色によるダイナミン siRNA 導入培養ラット SCG ニューロンのダイナミン 1、2、3 発現減少確認

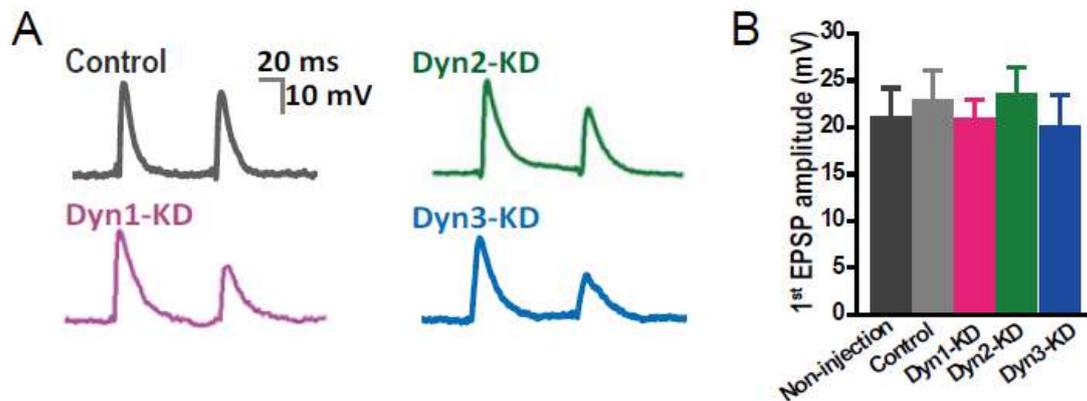
SCG ニューロンに control siRNA またはダイナミン 1、2、3 の各 siRNA (Control siRNA、Dyn1 siRNA、Dyn2 siRNA、Dyn3 siRNA) を導入して 3 日後に免疫蛍光染色を行った。

データは平均値±標準誤差を示し、Student's *t* 検定 (C) または one-way ANOVA による解析後に Bonferroni post hoc 検定 (D) を用いて統計学的解析を行った。(\*\*\*,  $p < 0.001$ )

(A) (左) ダイナミン 1 (赤、Alexa Fluor 546 抗マウス抗体) と蛍光デキストラン (緑) の免疫蛍光染色像の代表的な 2 例を示した。(右) ダイナミン 1 siRNA 導入 SCG ニューロン及び隣接する非導入ニューロンでのダイナミン 1 発現を確認した免疫蛍光染色像の代表的な 2 例を示した。

(B) Control siRNA を導入した SCG ニューロンの細胞質でのダイナミン 1、2、3 の蛍光強度を、隣接する非導入ニューロンでの蛍光強度と比較した。(n=6-17 pairs)

(C、D) 各 siRNA を導入した SCG ニューロンの細胞質でのダイナミン 1、2、3 の蛍光強度を、隣接する非導入ニューロンでの蛍光強度で正規化し、各 siRNA の特異性を確認した。(n=11-22 pairs)

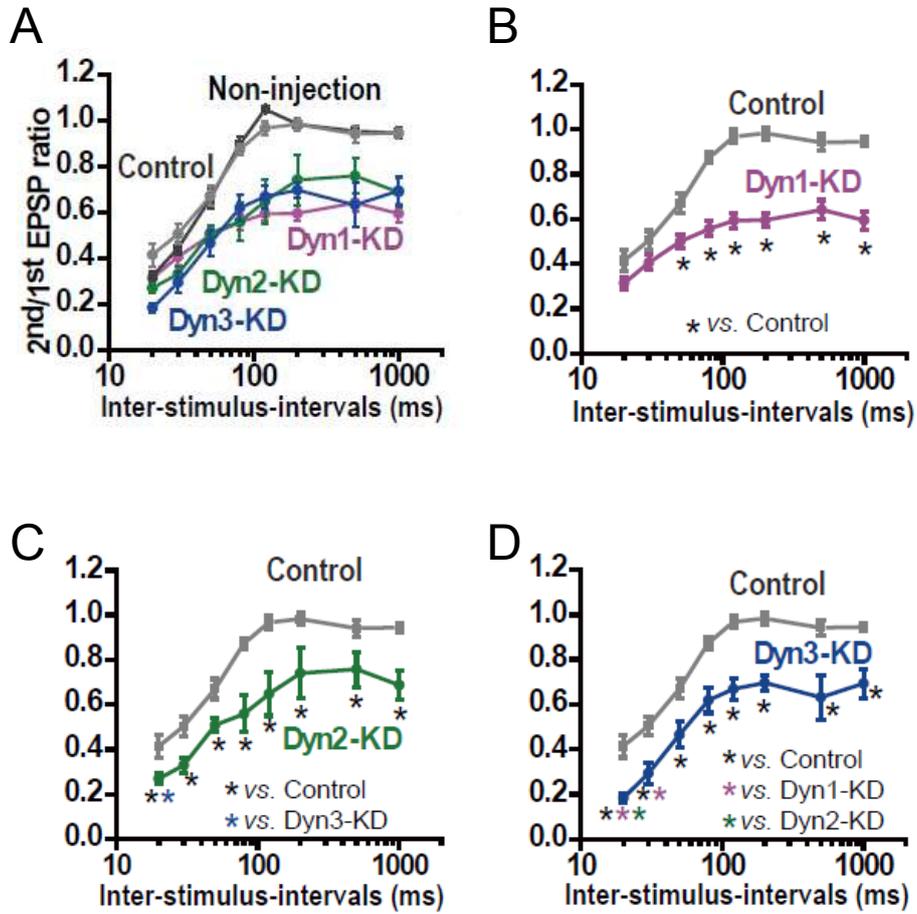


**Figure 6.** ダイナミン 1、2、3 KD による単発活動電位発火後のシナプス小胞放出部位への小胞補充の減少

(A) 2 発の活動電位発火間隔が 120 ミリ秒のときの Control、Dyn1-KD、Dyn2-KD、Dyn3-KD シナプスでの興奮性シナプス電位 (EPSP) 記録の代表的な 1 例を示した。

(B) 2 発の活動電位発火による EPSP の記録に際して、最初の EPSP 記録時 (発火間隔が 20 ミリ秒) の Control、Dyn1-KD、Dyn2-KD、Dyn3-KD シナプスでの第 1 発活動電位発火 EPSP 振幅の平均値を比較した。

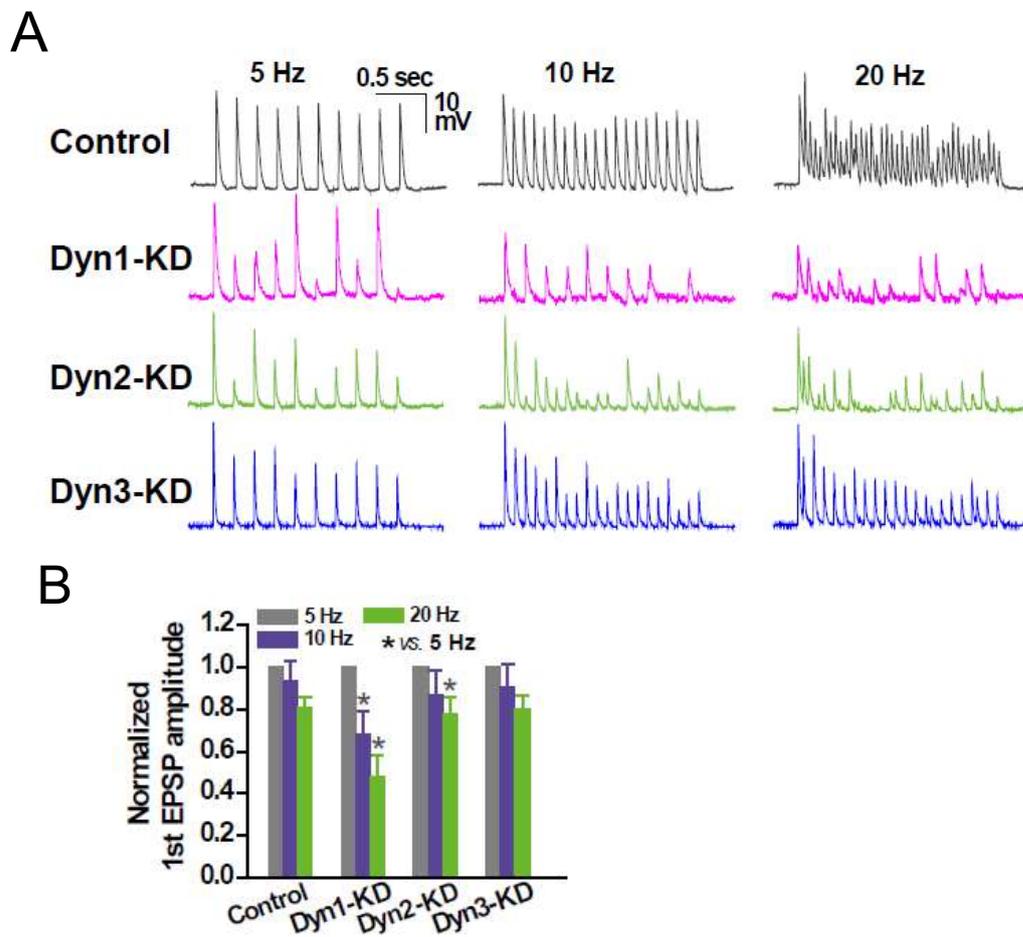
データは平均値±標準誤差を示し、one-way ANOVA による解析後に Bonferroni post hoc 検定を用いて統計学的解析を行った。(p > 0.05)



**Figure 7.** ダイナミン 1、2、3 KD シナプスでの単発活動電位発火後の時間とシナプス小胞放出部位への小胞補充の関係

Control siRNA またはダイナミン 1、2、3 の各 siRNA を導入したシナプス前細胞 (Control、Dyn1-KD、Dyn2-KD、Dyn3-KD) に 20-1000 ミリ秒の時間間隔 (ISI) で、1 分ごとに活動電位を 2 連続で発生させて EPSP を記録した (Paired-pulse 法)。各 ISI で 3 回ずつ EPSP 記録を行い (n=5-13)、1 発目の EPSP 振幅に対する 2 発目の EPSP 振幅の比 (2<sup>nd</sup>/1<sup>st</sup> EPSP ratio) を ISI に対してプロットした。

データは平均値±標準誤差を示し、Student's *t* 検定を用いて統計学的解析を行った。(\*, p < 0.05)



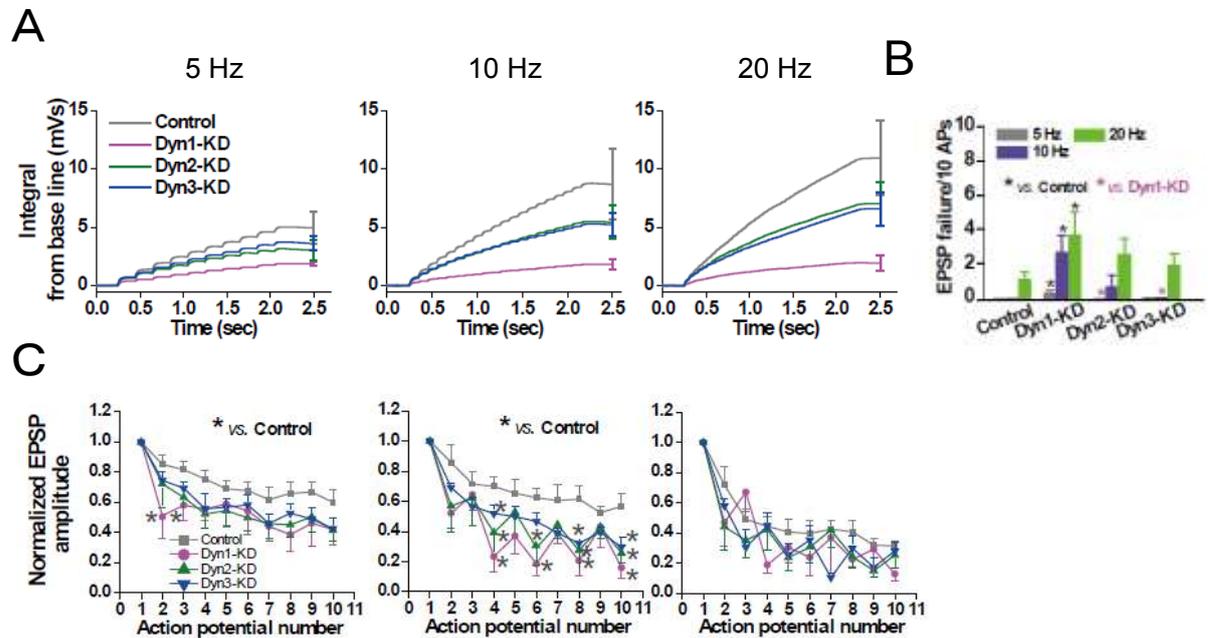
**Figure 8.** ダイナミン KD による高頻度活動電位発火時及び発火後のシナプス小胞放出部位への小胞補充の減少

Control siRNA またはダイナミン 1、2、3 の各 siRNA を導入したシナプス前細胞 (Control、Dyn1-KD、Dyn2-KD、Dyn3-KD) に 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。各発火頻度で 3 回ずつ EPSP 記録を行った。(n=4-6)

(A) Control、Dyn1-KD、Dyn2-KD、Dyn3-KD シナプスでの連続 EPSP 記録の代表的な 1 例を示した。

(B) 5、10、20 Hz 活動電位発火に対応した連続 EPSP の最初の EPSP 振幅を、5 Hz 発火に対応した連続 EPSP の最初の EPSP 振幅で正規化して棒グラフに示した。

データは平均値±標準誤差を示し、one-way ANOVA による解析後に Bonferroni post hoc 検定を用いて統計学的解析を行った (\*,  $p < 0.05$ )。

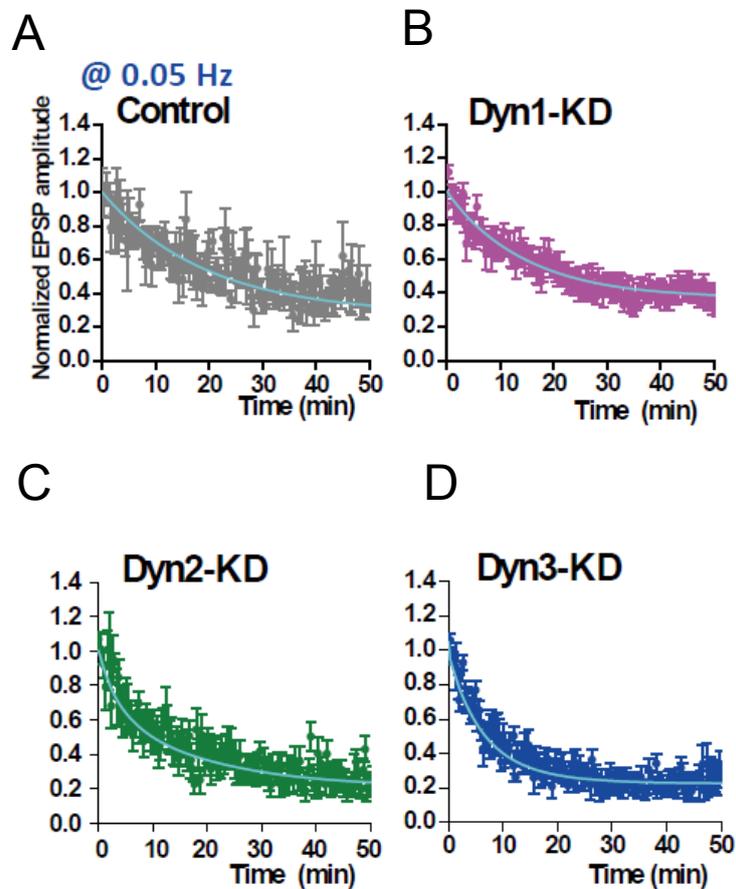


**Figure 9.** ダイナミン KD シナプスにおける高頻度活動電位発火時のシナプス小胞放出部位への小胞補充の減少

(A) Figure 8A に示した EPSP トレースの基線からの面積を計算して EPSP 積算値を求め、高頻度活動電位発火 2 秒間の伝達物質放出量を各ダイナミン KD シナプスで比較した。

(B) 2 秒間高頻度活動電位発火 1-10 発目で観察された EPSP 欠落数を各ダイナミン KD シナプスで比較した。

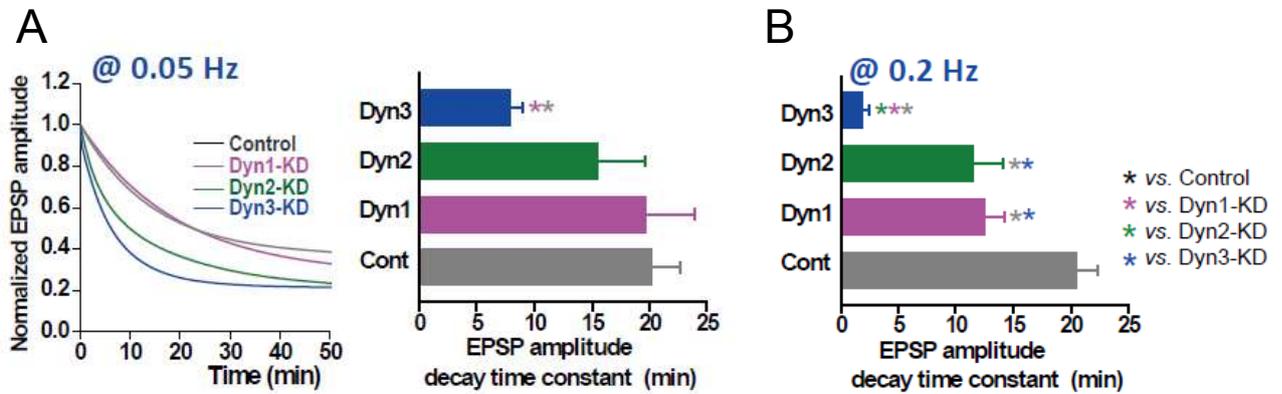
(C) 活動電位発火 2-10 発に応答した連続 EPSP トレースのピーク値から活動電位発火 1-9 発に応答した EPSP 終了時の膜電位を差し引いて算出した EPSP 振幅値を、基線から測定した 1 発目の EPSP 振幅値で正規化し、活動電位発火 1-10 発に反応した EPSP の振幅値の変化を各ダイナミン KD シナプスで比較した。



**Figure 10.** ダイナミン KD による低頻度活動電位発火時のシナプス小胞放出部位への小胞補充の減少

Control siRNA またはダイナミン 1、2、3 の各 siRNA を導入したシナプス前細胞 (Control、Dyn1-KD、Dyn2-KD、Dyn3-KD) に 0.05 Hz または 0.2 Hz で活動電位を発生させて EPSP 振幅を 50 分間以上記録し、記録開始後 1 発目の EPSP 振幅値で正規化した (n=5-7)。

データは 0.05 Hz 刺激で記録した EPSP 振幅の平均値±標準誤差を示し、EPSP 振幅平均値減少から算出した指数関数減衰曲線 (シアン) を重ねて示した。



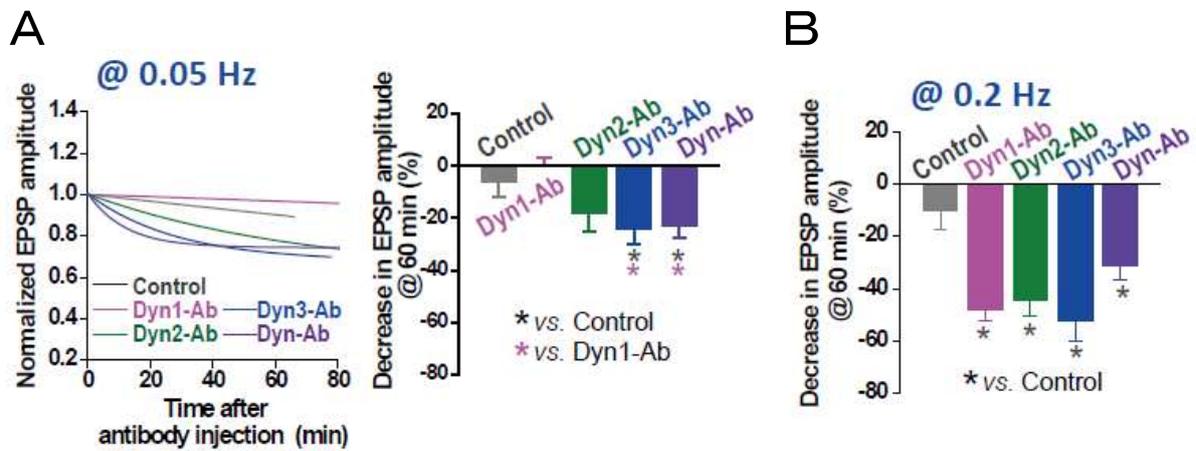
**Figure 11.** ダイナミン KD による低頻度活動電位発火時のシナプス小胞放出部位への小胞補充の減少速度と時定数

(A) (左) Figure 10 で示した 0.05 Hz 活動電位発火時の Control、Dyn1-KD、Dyn2-KD、Dyn3-KD シナプスでの EPSP 振幅減少から算出した指数関数減衰曲線を重ね合わせてグラフに示し、EPSP 振幅減少速度を比較した。(右) 0.05 Hz での指数関数減衰曲線から計算した EPSP 振幅減少の時定数を各ダイナミン KD シナプスで比較した。

(B) 0.2 Hz 刺激での EPSP 振幅減衰の時定数を比較した。

0.2 Hz 活動電位発火時の Dyn3-KD のみ二次指数関数減衰曲線から、それ以外は一次指数関数減衰曲線から時定数を計算した。

データは平均値±標準誤差 (n=5-7) を示し、one-way ANOVA による解析後に Bonferroni post hoc 検定を用いて統計学的解析を行った。(\*,  $p < 0.05$ )



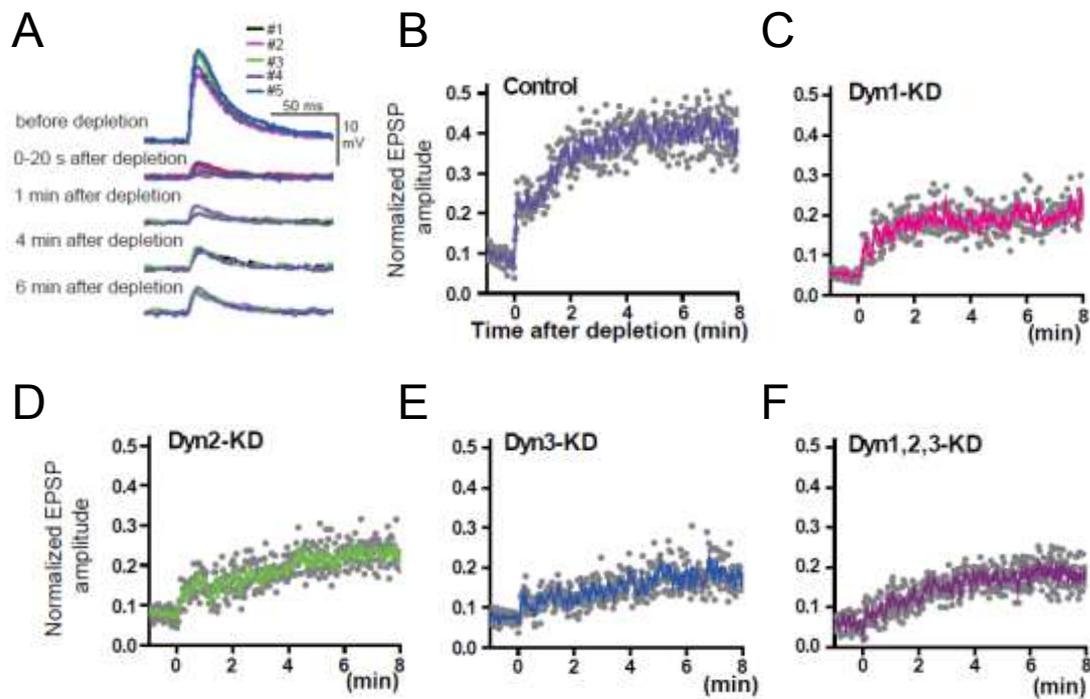
**Figure 12.** ダイナミン KD による低頻度活動電位発火時のシナプス小胞放出部位への小胞補充の減少

シナプス前細胞に 0.05 Hz または 0.2 Hz で活動電位を発生させ、EPSP 振幅値がほぼ一定となつてから 20 分間以上記録した後に control IgG またはダイナミン 1、2、3、1-3 の特異的抗体を導入 (Control、Dyn1-Ab、Dyn2-Ab、Dyn3-Ab、Dyn-Ab) してから 60 分間以上記録し、抗体導入前 20 分間の平均 EPSP 振幅値で正規化した。

(A) (左) 0.05 Hz 活動電位発火での Control、Dyn1-Ab、Dyn2-Ab、Dyn3-Ab、Dyn-Ab 注入後の EPSP 振幅減少から算出した指数関数減衰曲線を重ね合わせてグラフに示し、EPSP 振幅減少速度を比較した。(右) 0.05 Hz での抗体導入 60 分後の EPSP 振幅減少値を各ダイナミン KD シナプスで比較した。

(B) 0.2 Hz 活動電位発火での抗体導入 60 分後の EPSP 振幅減少値を各ダイナミン KD シナプスで比較した。

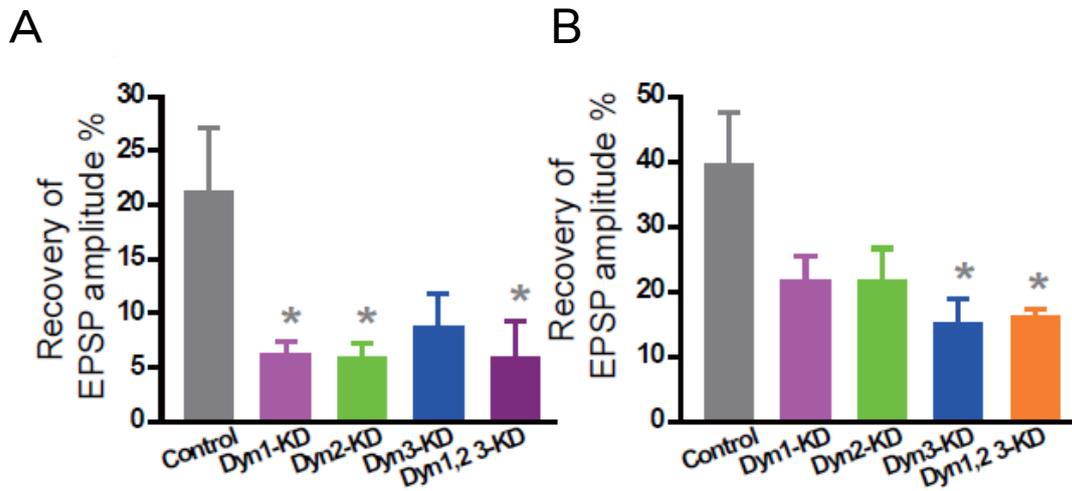
データは平均値±標準誤差 (n=5-7) を示し、one-way ANOVA による解析後に Bonferroni post hoc 検定を用いて統計学的解析を行った。(\*, p < 0.05)



**Figure 13.** ダイナミン KD によるシナプス小胞放出部位への小胞補充の遅延  
Control siRNA またはダイナミン 1、2、3 の各 siRNA を導入したシナプス前細胞 (Control、Dyn1-KD、Dyn2-KD、Dyn3-KD、Dyn1,2,3-KD) に 1 Hz で 1 分間連続して活動電位を発生させた後、5 Hz、4 分間の活動電位を連続発生させて RRP のシナプス小胞を枯渇させ、RRP 枯渇後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。記録した EPSP 振幅値は 4 分間連続発火前の平均 EPSP 振幅値で正規化した。(n=7-10)

(A) 対照実験として、0.5 Hz で記録した siRNA 非導入 SCG ニューロンでの EPSP 記録の代表例を示した。5 Hz、4 分間 RRP 小胞枯渇刺激前 10 秒間、小胞枯渇刺激直後から 20 秒間、小胞枯渇刺激後 1 分、4 分、6 分での 10 秒間の EPSP 波形を示した。

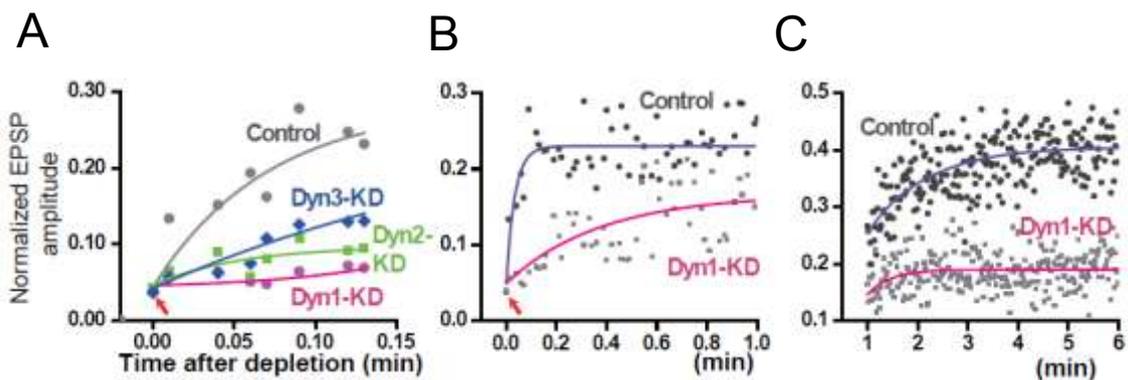
(B-F) Control、Dyn1-KD、Dyn2-KD、Dyn3-KD、Dyn1,2,3-KD での RRP 枯渇後の EPSP 振幅回復を比較した。正規化 EPSP 振幅値の 5 点を移動平均してスムージングした曲線を EPSP 振幅値に重ねて示した。



**Figure 14.** ダイナミン KD によるシナプス小胞放出部位への速い小胞補充過程と遅い小胞補充過程の遅延の比較

(A, B) 活動電位連続発火後 10 秒 (速い回復過程) (A) 及び 6 分 (遅い回復過程) (B) での EPSP 振幅の回復を各ダイナミン KD シナプス比較した。

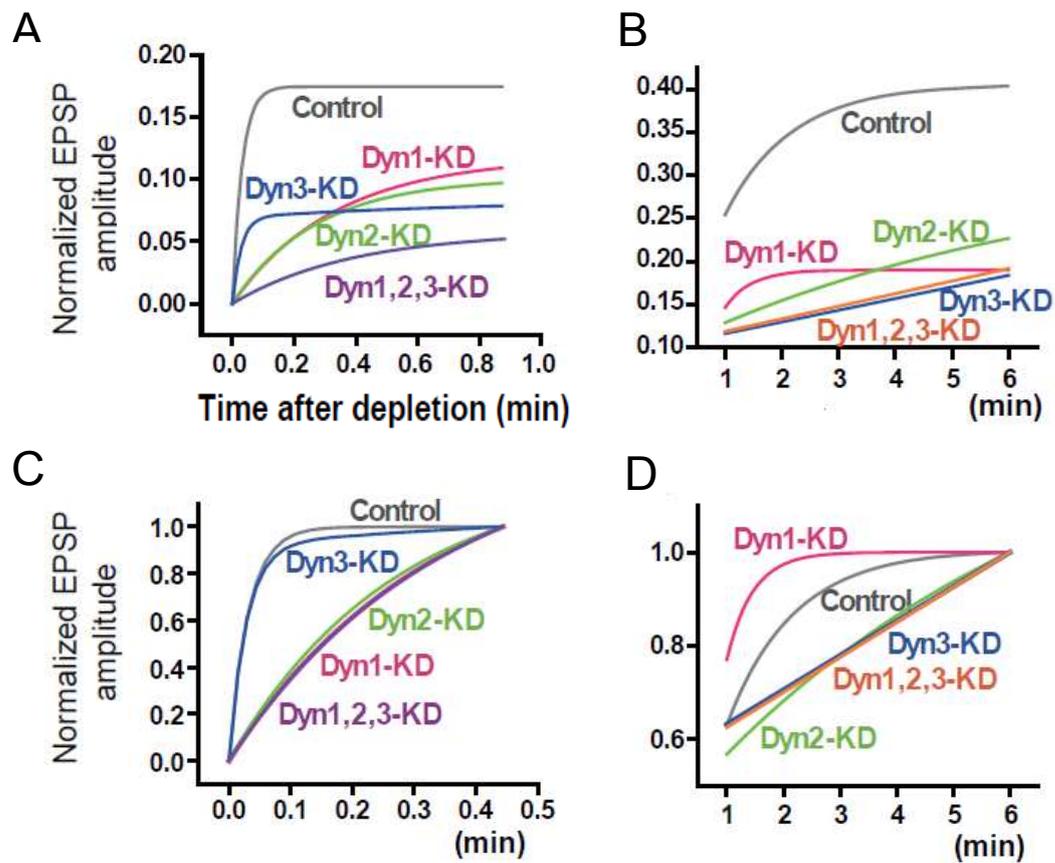
データは平均値±標準誤差で示し、one-way ANOVA による解析後に Bonferroni post hoc 検定を用いて統計学的解析を行った。(\*,  $p < 0.05$ )



**Figure 15.** ダイナミン KD シナプスにおけるシナプス小胞放出部位への小胞補充速度の比較

活動電位連続発火後 0-7.8 秒 (A)、0-60 秒 (B)、1-6 分 (C) までの回復過程の EPSP 振幅値から指数関数漸増曲線を算出して各ダイナミン KD シナプスで比較した。

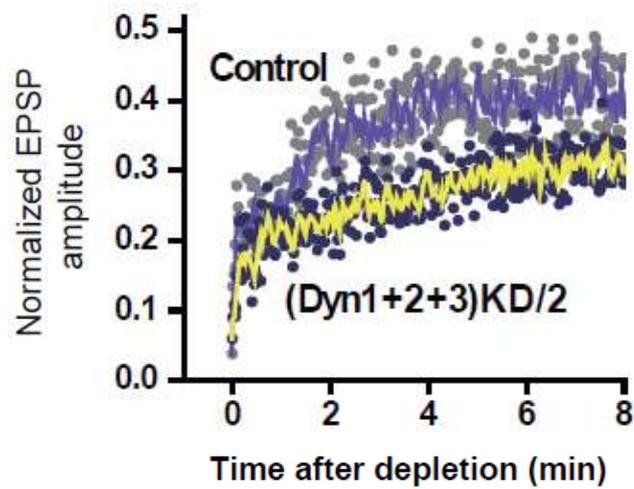
基線の平均ノイズ振幅 ( $t=0$ ) を平均 EPSP 振幅値から減算した (A, B、矢印)。



**Figure 16.** ダイナミン KD シナプスにおけるシナプス小胞放出部位への小胞補充速度の遅延

(A, B) Figure13 B-F、Figure 15B and C に示した Control、Dyn1-KD、Dyn2-KD、Dyn3-KD、Dyn1,2,3-KD シナプスでの EPSP 振幅値から算出した指数関数漸増曲線を重ね合わせてグラフに示し、EPSP 振幅回復速度を比較した。

(C, D) A、B で示した指数関数漸増曲線を 0.45 分 (速い回復過程, C) または 6 分 (遅い回復過程, D) の EPSP 振幅値で正規化した。

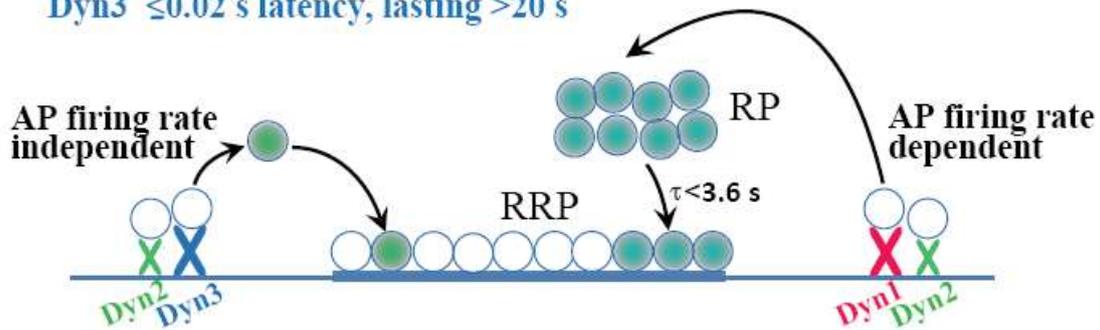


**Figure 17.** ダイナミン 1, 2, 3 それぞれがシナプス小胞放出部位への小胞補充に機能したと仮定して算出された EPSP 振幅回復値とコントロールシナプスでの EPSP 振幅回復値

Figure 13C, D, E に示したダイナミン 1 KD、2 KD、3 KD シナプスでの EPSP 振幅値を加算して 2 で割った値をダイナミン 1, 2, 3 全てが機能している推測 EPSP 振幅値としてグラフ化し、5 点を移動平均してスムージングした曲線を EPSP 振幅値に重ねて示した。Control で示した EPSP 振幅回復のグラフは、Figure 13B と同じグラフを用いて推測 EPSP 振幅回復と比較した。

Two RRP recovery pathways with distinct “kinetics”,  
 “AP response properties” and “dynamamin isoform involvement”

Dyn1  $\leq 0.05$  s latency, lasting  $\geq 5$  s  
 Dyn2  $\leq 0.02$  s latency, lasting  $\geq 5$  s  
 Dyn3  $\leq 0.02$  s latency, lasting  $> 20$  s



**Figure 18.** 活動電位発火に応じて異なるダイナミンアイソフォームが駆動する、活性化タイミング及び速度の異なる2つのシナプス小胞リサイクル経路。神経終末に活動電位が到達すると、活動電位発火後50ミリ秒以降 (Fig. 7) にダイナミン1が活性化して約5秒間持続する (Figs. 10 and 11) 遅いタイムウィンドウのシナプス小胞補充に機能するが、ダイナミン2、3は活動電位発火後20ミリ秒以降 (Fig. 7) には活性化され、それぞれ約5秒間または20秒間以上持続する (Figs. 10 and 11) 早いタイムウィンドウのシナプス小胞補充に機能する。高頻度活動電位発火時及び発火後にダイナミン1、2の活性化時間は延長したが、ダイナミン3活性化時間は活動電位発火頻度に依存しない (Figs. 8 and 10)。活動電位発火頻度に依存したシナプス小胞リサイクル経路は、発火頻度非依存的な経路に比べてより速いRRPへのシナプス小胞補充 ( $\tau < 3.6$  秒) を担う (Fig. 15B, C)。これら2つのシナプス小胞リサイクル経路は、どちらもダイナミン1、2、3の機能が非加算的であることから、どちらの速度の回復過程においてもダイナミン以外の要因がRRPへの小胞補充に関与する可能性が考えられる (20-25%、Fig. 17)

## 8. 謝辞

博士課程の在籍期間（満期修了後も含めて）6年もの間、終始多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました慶應義塾大学大学院薬学研究所生化学講座 笠原忠教授に謹んで感謝の意を表します。同講師である、多胡めぐみ先生には主論文の投稿の際に多大なるご指導、ご協力を賜り、深く感謝致します。同薬学教育研究センター講師である、横田恵理子先生には細胞培養について適切な助言を頂きましたことを深く感謝致します。

生化学講座の園田よし子先生、石井功先生には機会のあるごとに適切な助言を頂きました。深く感謝致します。

本研究を行うにあたって、東京医科大学細胞生理学講座 持田澄子教授に多大なるご指導を賜りました。助手兼社会人大学院生として受け入れてくださり、謹んで感謝の意を表します。