

平成 23 年 7 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19300140

研究課題名 (和文) 神経筋シナプスにおける自発的運動にともなう可塑的变化

研究課題名 (英文) Plastic changes associated with spontaneous motor activity at neuromuscular junction.

研究代表者

黒見 坦 (KUROMI HIROSHI)

いわき明星大学・薬学部・教授

研究者番号：30009633

研究成果の概要 (和文) : 本研究課題追求の結果、以下のことが明らかになった。(1). ショウジョウバエ幼虫の運動神経終末には、多種類の Ca^{2+} チャンネルが存在する。(2). シナプス小胞のエキソサイトシスによって伝達物質が放出された後、小胞のリサイクルのため active zone と non-active zone でそれぞれ固有の Ca^{2+} チャンネルにリンクした 二つのエンドサイトシスが起る。(3). 二つのリサイクル機構は、運動神経の活動に応じて協力してシナプス伝達を維持している。(4). これらの小胞のリサイクルから放出に至る過程に、tubulin の動的変化が関与している。

研究成果の概要 (英文) : The present study revealed that (1) there were multiple Ca^{2+} channels at motor nerve terminals of Drosophila larvae. (2) After exocytosis of synaptic vesicles at nerve terminals, endocytosis, the first step of vesicle recycling, occurred at active zone and non-active zone linked to each specific Ca^{2+} channels. (3) Both endocytosis contribute coordinately to maintain synaptic transmission, depending on degree of motor nerve activity. (4) In addition, changes in tubulin states, monomer or dimer and their distribution, were associated with dynamics of synaptic vesicles. These results suggest that changes in synaptic vesicle traffic underlines plastic changes in synaptic transmission after strong activity of motor nerve.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2008 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経・筋肉生理学

キーワード：ニューロン・シナプス機能

1. 研究開始当初の背景

最近 Heidelberg 大学の Schuster 教授のグループはショウジョウバエの幼虫を自発的に運動させると神経筋シナプスの信号伝達が長期的に増強されることを報告した(我々も協同研究者として参画した。Neuron 2006, 50;723-733)。電気生理学的に二つの異なるメカニズムが経時的に関与していることが分かった。初期では、quantal size の増大があり、これは reserve pool からの大きい小胞がシナプス伝達に関与しており、後期には quantal contents の増大がおこる。更に、時間が経つと神経終末の形態的变化が起こり、bouton の数、シナプスの数の増加が起こる。これらの一連の変化は自発運動によって引き起こされるという点で、この系はシナプス可塑性のモデルとして優れている。この可塑的变化の系の背景として、以下の事実がある。

(1) 神経終末には、多種類の Ca^{2+} チャンネルが存在することが報告されている (J.Neurosci. 1999, 19; 726-736)。

(2) ショウジョウバエ運動神経終末での速いシナプス伝達には Cacophony-encoded Ca^{2+} チャンネルが必要である (J.Neurosci. 2004, 24; 282-285)。

(3) ショウジョウバエ神経筋シナプスには 2 種類の endocytosis がある(未発表)。

(4) ショウジョウバエ運動神経終末には少なくとも 3 種類の Ca^{2+} チャンネルがある(未発表)。

2. 研究の目的

本研究計画はショウジョウバエ幼虫の自発運動によって引き起こされたシナプス可塑性のメカニズムを解明することにある。特に、シナプス前終末において神経伝達物質の放出に至る分子カスケードを電気的、光学的測定法を用いて解析する。このカスケードに関与する諸分子の機能を解明するために、ショウジョウバエの突然変異体および形質変換株を用いる。カルシウムは普遍的なメッセンジャーであるために、その特異性は時間的、空間的によって確保されている。可塑的变化における伝達物質の放出、再利用、等にカルシウム動態がどのような機構によって関与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエ前終末の Ca^{2+} imaging を行い、神経終末の Ca^{2+} 動態を解析する。

(2) シナプス前終末にある 3 種類の Ca^{2+} チャ

ネルの性質を、遺伝学的、薬理的に解析する。そして、それらがどのようにシナプス小胞の exocytosis, recycling (endocytosis を含む)に関与するか、電気生理学的、光学的方法を用いて解析する。

(3) 各シナプスにおける放出確率をシナプス後での Ca^{2+} imaging を行い、解析する。

4. 研究成果

本研究課題で、自発運動による運動神経筋シナプスにおける可塑的变化を説明できる以下の実験事実が明らかにされた。

(1) シナプス小胞の exocytosis に関与する Ca^{2+} チャンネルは従来言われていた cacophony-encoded Ca^{2+} チャンネル以外に別のチャンネルが存在することが明らかになった。

①. cacophony-encoded Ca^{2+} チャンネルはシナプス伝達に不可欠のためその欠損株は致死である。しかし embryo までは発育するため、embryo の神経筋伝達を調べた。普通の Ca^{2+} 濃度では神経刺激による速いシナプス伝達は起こらなかった。②. 外液の Ca^{2+} 濃度を上げると遅いシナプス伝達がおこった。これは、クモ毒から得られた Ca^{2+} チャンネル遮断薬の PLTXII で抑制されたが La^{3+} では抑制されなかった。このことより、この放出に関与する Ca^{2+} チャンネルは、伝達物質放出部位の近くに存在する exocytosis に関与する新しい Ca^{2+} チャンネルと考えられた。

(2) 神経終末には tubulin が存在しており、シナプス小胞のリサイクルに関与していることが明らかになった。従来 tubulin はシナプス小胞のある部位には存在しないと考えられていたため、シナプス小胞のリサイクルには関与していないと考えられていた。しかし、我々は tubulin が小胞のリサイクルに関与していることを示す以下の知見を得た。

① シナプス前終末にシナプス小胞のある部位に tubulin が存在していた。② tubulin を taxol によって安定化させると、シナプス小胞の endocytosis は抑えられ、シナプス伝達も低下した。③ tubulin 遺伝子の変異株でもシナプス小胞の endocytosis は抑えられ、シナプス伝達も低下した。④ 温度感受性変異株 shibire で高温で endocytosis を抑えると tubulin が終末に蓄積していた。このことは、endocytosis の途中の過程で、tubulin の蓄積が終末で起こることを示している。

(3) シナプス小胞の endocytosis に関与する Ca^{2+} チャンネルは少なくとも 2 種類あり、一つは R-BayK によって特異的に抑制されるものであり、もう一つは La^{3+} によって特異的に抑

制される Ca^{2+} チャンネルである。R-BayK によって特異的に抑制されるものはシナプスの active zone (伝達物質が放出される部位を含んでいる神経終末の局所部位) に存在し straightjacket 遺伝子がエンコードする Ca^{2+} チャンネルであることが明らかになった。 La^{3+} によって特異的に抑制されるものはおそらく non-active zone (active zone の外側) に存在すると推定される。①. シナプス小胞の endocytosis を選択的に抑制する薬をスクリーニングした結果、 La^{3+} のほかに R-BayK も endocytosis を選択的に抑制することをみだした。②. Ca^{2+} チャンネル変異株のスクリーニングをした結果、 straightjacket の変異株は R-BayK-sensitive endocytosis が起こらなく、 La^{3+} -sensitive endocytosis は正常であった。③. straightjacket の遺伝子が encode するたんぱく質の抗体を作成し、細胞染色を行ったところ、このチャンネルは、 active-zone に存在するが、放出部位とは違った部位に存在した。これらの事実は、ショウジョウバエ運動神経終末のシナプスの active-zone には、伝達物質の放出に関与する cacophony-encoded Ca^{2+} チャンネルと我々が見つけたもう一つの Ca^{2+} チャンネルそして現在の実験で見出した endocytosis に関与する straightjacket-encoded Ca^{2+} チャンネルの 3 種類があることを示している。④. Endocytosis に関与する Ca^{2+} チャンネルはもう一つあり、 La^{3+} で抑制される (La^{3+} -sensitive) Ca^{2+} チャンネルである。恐らく non-active zone に存在することが予想されるが、まだ同定されていない。

(4). ショウジョウバエ運動神経終末のシナプス小胞の endocytosis には、二種類の経路があり、運動神経の活動状態に依存してその貢献を替え、協調して、シナプス伝達を維持していることが明らかになった。①. 一つを Active zone endocytosis とよぶ。この endocytosis は R-BayK で抑制され、 straightjacket 変異株では観察されなかった。この endocytosis が起こっている時、 dynamin (endocytosis 部位を示す) は active zone に存在していた。つまり、この endocytosis は active zone で起こっている。この endocytosis はたんぱく質リン酸化を進める薬物で減少され、脱リン酸化薬で増加される性質をもつ。②. 二つ目は Non-active zone endocytosis と呼ぶ。この endocytosis が起こっている時、 dynamin は non-active zone に存在していた。また、 non-active zone にのみ結合を示す filipin は active zone endocytosis には何も変化を与えず non-active zone endocytosis のみを抑制した。 Active zone endocytosis とは逆に、 non-active zone endocytosis はたんぱくり

ン酸化を進める薬物で増加され、脱リン酸化薬処理で減少する性質をもつ。これらの結果は、シナプス小胞の endocytosis 経路には、二つの経路があり、一つは、 active zone で起こり、 straightjacket-encoded Ca^{2+} チャンネルにリンクしている。もう一つは、 non-active zone で、起こる endocytosis の経路であり、まだ同定されていないが La^{3+} -sensitive Ca^{2+} チャンネルにリンクしている。たんぱく質のリン酸化が二つの経路を分けている。③. 運動神経を比較的低い頻度で刺激した時、 endocytosis は R-BayK で抑制され、 La^{3+} では抑制されなかった。また、 straightjacket 変異株でも endocytosis が著明に抑制されていた。刺激頻度を高めた時、 endocytosis は初期では、 R-BayK で抑制され、 straightjacket 変異株で抑制された。一方、後期では、 endocytosis は、 La^{3+} で著しく抑制されたが、 R-BayK では抑制が少なかった。シナプス電位は、高い頻度の神経刺激によるものは La^{3+} で抑制された。以上の結果から、運動神経の活動が低い時は、伝達物質放出部位の近くの active zone でシナプス小胞の endocytosis が起こり、リサイクルされた小胞はすぐにシナプス伝達に関与することが考えられる。一方、運動神経の活動が高まると、 active zone での endocytosis にくわえて non-active zone でも endocytosis が起こるようになり、おそらく reserve pool を経て、新しくリサイクルされた小胞もシナプス伝達に関与するようになる。つまり、運動神経の活動が高まると、新しい機構がシナプスの伝達機構に加わってくることを示している。

この研究課題のショウジョウバエ幼虫で得られた結果 ; ①. シナプス小胞の endocytosis に関与する Ca^{2+} チャンネルが active zone と non-active zone に存在すること、更にそこで起こる endocytosis にリンクすることを示した。この結果は、これまで、 endocytosis は必ず exocytosis とカップリングしており、同じ Ca^{2+} チャンネルを通過してきた Ca^{2+} が exocytosis と endocytosis に関与するという考えを完全に打ち破るものである。②. Tubulin が神経終末でシナプス伝達時にその動態、分布を変化させるということを示した。この結果は、従来 tubulin は神経では軸索に存在し、神経終末には存在しない、神経終末は actin がシナプス小胞の trafficking に関与するという考えを変えさせるものである。

シナプス小胞のリサイクル、 trafficking は神経活動が高まった時にシナプス伝達に関与するメカニズムである。本研究課題で得られた endocytosis に関する Ca^{2+} チャンネルの同定、 endocytosis の性質の解明、そのシナ

プス伝達での役割が自発運動の後にシナプス伝達が上昇するメカニズムの背景にあるのではなからうか。今後は、どのようにして、active zone endocytosisにnon-active zone endocytosisが加わってくるか、その時、それぞれのCa²⁺チャネルの数、分布、性質がどのように変化していくか、そのメカニズムは何か、解明する必要がある。これらの研究を通じて、自然に起こっているシナプスの可塑性の機構が明らかにされるであろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Xuan L., Kuromi H et al. 7 名、2nd author. (2010). Bicaudal-D binds clathrin heavy chain to promote its transport and augments synaptic vesicle recycling. EMBO J. (2010). 29; 992-10006. (査読あり)。
2. Kuromi, H., Ueno, K. and Kidokoro, Y. (2010). Two types of Ca²⁺ channel linked to two endocytic pathways coordinately maintain synaptic transmission at the Drosophila synapse. Europ. J. Neurosci. 32; 335-346. (査読あり)。
3. Ueno, K. and Kidokoro, Y. (2008). Adenyl cyclase encoded by AC78C participates in sugar perception in Drosophila melanogaster. Europ. J. Neurosci. 28; 1956-1966. (査読あり)。
4. Hou, J. Tamura, T. Kidokoro, Y. (2008). Delayed synaptic transmission in Drosophila cacophony (null) embryos. J. Neurophysiol. 100; 2833-2842. (査読あり)。
5. Tamura, T., Hou, J. Reist, NE, Kidokoro, Y. (2007). Nerve-evoked synchronous release and high K⁺-induced quantal events are regulated separately by synaptotagmin I at Drosophila neuromuscular junction. J. Neurophysiol. 97; 540-549. (査読あり)。

[学会発表] (計 3 件)

1. 上野耕平、齊藤実; 培養シヨウジョウバエのうにおける神経応答の高速スキニング共焦点レーザー顕微鏡による可視化。32回日本神経科学大会、平成21年9月16日-18日。名古屋国際会議場。
2. 黒見坦、上野耕平、城所義明; シナプス

小胞リサイクルにおけるNa/K ATPaseの役割。31回日本神経科学大会。平成20年7月10-12日。東京国際フォーラム。

3. Kuromi, H., Ueno, K., Kidokoro, Y.; Two distinct pathways for endocytosis and synaptic transmission at the drosophila neuromuscular junction. Neuroscience 2007, 2007, 11, 25-31. San Diego.

[図書] (計 1 件)

1. Kuromi H. Synaptic vesicle recycling. Encyclopedia References of Neuroscience. 2008; 2420-2422.

[産業財産権] なし

○出願状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒見 坦 (KUROMI HIROSHI)

いわき明星大学・薬学部・教授

研究者番号: 30009633

(2) 研究分担者

城所 良明 (KIDOKORO YOSHIAKI)

東北大学大学院・生命科学研究所

・客員教授

研究者番号: 00053083

上野 耕平 (UENO KOUHEI)
財団法人東京都医学研究機構・東京都
神経科学総合研究所・研究員
研究者番号：40332558

(3) 連携研究者
なし