

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590307

研究課題名(和文) ドパミンニューロンの開口放出とシナプス小胞の動態制御におけるシンタキシンの役割

研究課題名(英文) Roles of syntaxin1A in the regulation of exocytosis and synaptic vesicle movement in dopaminergic neuron

研究代表者

笹川 展幸 (Sasakawa, Nobuyuki)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：20187107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：マウス副腎髄質クロマフィン細胞およびドパミンニューロンの開口分泌の制御機構におけるシンタキシン1Aの役割を主題として研究を進めた。CaMK との結合能欠損シンタキシン1Aノックインマウス由来の細胞と野生型マウス由来の細胞を比較し、開口分泌現象をアンペロメトリー法、分泌小胞可視化解析法等で捉え、以下の結果を得た。シンタキシン1Aは分泌小胞の供給機構および膜融合過程の動態に重要な役割を演じている可能性が示唆された。分泌小胞の動態制御においても役割を演じている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chromaffin cells were enzymatically dissociated from adrenal medulla from male C57BL mice. By use of amperometry, single exocytotic events were analyzed in single mouse chromaffin cells with a carbon fiber microelectrode. To characterize a single exocytotic event detected as a single current spike, the spike parameters and the frequency of events were analyzed. To clarify the implication of the interaction of syntaxin 1A and CaMKII in the regulation of exocytosis, we examined the events frequency and the kinetics of single events in the cells prepared from R151G syntaxin 1A knock-in mice. The significant reduction was observed in the frequency of exocytotic events evoked by acetylcholine in knock-in cells. The frequency distribution of the spike height, middle width and area were slightly shifted to smaller values in knock-in cells. Syntaxin 1A knock-in seemed to affect not only the event frequency but also the kinetics of the fusion process.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：exocytosis chromaffin cell amperometry dopaminergic neuron

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 神経終末からのシナプス小胞 (SSV) および副腎クロマフィン細胞のような分泌細胞からの有芯小胞 (LDCV) の開口分泌反応では、分泌部位にドックしていた分泌小胞と細胞膜との融合が起こる。その過程にはシナプス終末や分泌細胞また分泌小胞に局在する種々の蛋白質の相互作用、さらにそれらを制御するカルシウムイオンなどの小分子が必要であると考えられている。しかし、分泌反応の全容を理解するためには、少なくとも分泌小胞と細胞膜との融合過程の調節機構と、刺激に伴い急速に開口分泌を起こす分泌小胞のプールと、分泌を維持するための予備プールからの供給過程の両調節機構を明らかにすることが必要である。また、SSV と LDCV の開口分泌過程には、多くの共通点もあるが、数々の相違点やいまだ不明な点も多く残っている。特にドパミンニューロンからの SSV の開口分泌反応 (SSV と細胞膜の膜融合過程) はフルフェージョンの割合が少なく、多くは Kiss and Run の型式を取るものと思われるが、その実態とメカニズムはほとんど解っていない。

## 2. 研究の目的

微小炭素線維電極を用いたアンペロメトリー法による開口分泌過程のキネティクス解析法と、高速レーザー共焦点顕微鏡を用いた分泌小胞の細胞内動態 4 次元解析法の 2 つの実験系を用い、分泌小胞と細胞膜との膜融合反応と小胞の供給の調節機構に注目し、特にアミン系神経伝達に重要なシタキシン 1A 分子の役割を解析する。

## 3. 研究の方法

(1) R151G シタキシン 1A (CaMK との結合能欠損) ノックインマウス (KI) (新潟大院・医歯総合・分子細胞機能・五十嵐道弘教

授より提供頂いた) 由来の副腎髄質クロマフィン細胞とドパミンニューロンを酵素による分散法で調整し、3 - 4 日間培養後、各種実験に用いた。また、基礎的検討には牛副腎髄質由来のクロマフィン細胞も用いた。

(2) アンペロメトリー法による実験には、コラーゲンコートした 35 mm ガラスボトムディッシュに培養した細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/well) を使用した。単一細胞からのカテコラミン分泌の測定には、微小炭素繊維電極 (ProCFE, 先端直径  $5 \mu\text{m}$ ) を作用電極として用い、電極を細胞表面に軽く当たる距離に置き、+650 mV の電位を印加した。カテコラミンの電解電流を voltammetric-ampereometric amplifier で検知し、4kHz でサンプリングした。MacLab/4s でデジタル化し、Chart5.5.1 を用いてスパイク数、キネティクス指標を測定・解析した。この方法は Wighman ら (PNAS, 88, 10754-10758, 1991)、Sasakawa ら (Cell Mol Neurobiol., 25, 777-787, 2005, Neuropharmacol., 60, 1364-1370, 2011) を参考にした。

(3) 細胞内遊離カルシウム濃度の測定は、細胞を  $10 \mu\text{M}$  の Fura-2 AM で処理後、洗浄し、刺激に伴う蛍光強度の変化を励起波長 340 nm、380 nm、蛍光波長 510 nm で蛍光顕微鏡を用い測定した。

(4) 小胞の細胞内動態 4 次元解析は、小胞を LTG (LysoTrackerGreen DND26 でラベルし、高速スキャンレーザー共焦点顕微鏡 (LSM 5-LIVE: カールツァイス) で小胞の細胞内動態を可視化 4 次元解析した。

なお、本研究における実験データは、平均値及び標準偏差を算出して表記した。統計検定は t-検定をもちい、 $p < 0.01$  または  $0.05$  で有意差を判断した。

#### 4. 研究成果

KI マウス由来のクロマフィン細胞で KCl 刺激による開口放出をアンペロメトリ法を用い測定し、WT 由来細胞と比較した。各濃度の KCl で 3 分間刺激し、得られたスパイク数(開口頻度)を計測した。KI では開口頻度の抑制が認められ、KCl (60mM)において有意であった(図.1)。

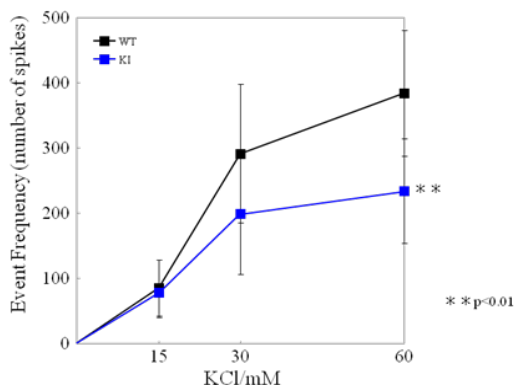
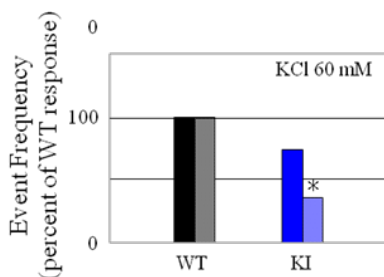


図.1 (WT: n=11-17, KI: n=5-8)

KCl (60mM)での3分間刺激を刺激直後のバースト期間(0~1分)と分泌顆粒の供給がなされるその後の期間(1~3分)においてそれぞれで得られるスパイク数を分別計測し、WTで得られるスパイク数を基準に比較した。図.1で有意な抑制が見られたKCl60mMにおいて、顕著で有意な抑制が1~3分の期間で観察された(図.2)。



\* p<0.05

■ 0-1 min ■ 1-3 min  
■ 0-1 min ■ 1-3 min

図.2 (WT: n=17, KI: n=8)

図には示さないが、KI マウス由来のクロマフィン細胞でアセチルコリン (ACh) 刺激による開口放出をアンペロメトリ法を用い測定し、WT 由来細胞と比較した。KCl 刺激時と同様に、KI では開口頻度の有意な抑制が認められ、かつ、ACh (30 μM) 刺激後の 1~3 分の期間において顕著な抑制が認められた。

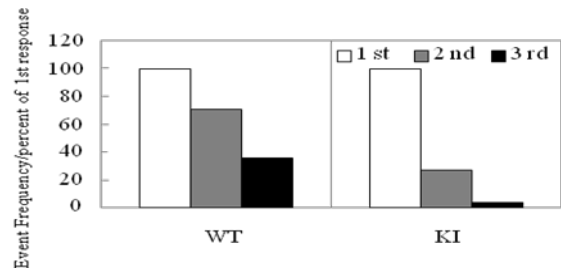
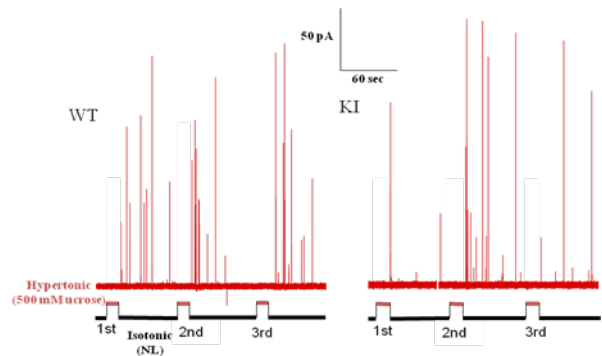


図.3 (WT: n=6, KI: n=5)

Gil, A. (Neuroscience, 98, 605-614, 2000) らは、高張溶液(シュークローズ 500mM)処理後、等張液(通常の Locke's 液)に変換した際に分泌反応が見られ、この分泌は readily releasable pool からの分泌反応であることを報告している。この方法に準じ、図.3では、WT と KI 由来細胞の分泌反応を比較した。図.3上は WT と KI それぞれの標準的な実験トレースを示している。等張液から 30 秒間高張液で処理しその後 2 分間に出現するスパイクを計測し集計した(図.3下)。高張処理が 1st, 2nd, 3rd とくり返される

にしたがい、KI 細胞で得られる反応が WT に比べ、急速に減弱する事が示され、KI 細胞では readily releasable pool の減少が示唆された。

分泌反応において、細胞内カルシウム濃度の上昇は重要な役割を演じているので、刺激に伴う細胞内遊離カルシウム濃度変化を KI 由来細胞と WT 細胞で比較した(図.4)。図.4 上は KCl (60mM) で刺激した際の細胞内遊離カルシウム濃度変化のトレースである。図.4 下は KCl (60mM) で刺激後、測定された最高値を比較した。WT と KI 間に有意な差は認められなかった。このデータは、図.1,2 の KI で見られた分泌反応の抑制は、分泌反応の過程において細胞内遊離カルシウム濃度上昇以降のステップにその要因があることを示している。図.1 から図.4 の結果を総合すると、KI 由来細胞では分泌反応の有意な抑制が認められるが、その原因は分泌顆粒の供給機構の何らかの障害が原因であることが示唆される。

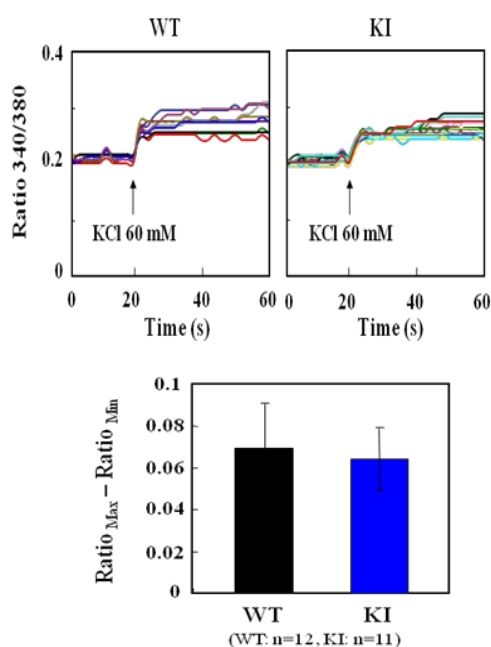


図.4

表.1

	V.M. DA neuron	Mouse Chromaffin cell
Vesicle diameter in nm	SSV 40-60	LDCV 100-200
Peak height(pA)	6.7 ± 2.91	25.9 ± 10.6
Peak area (fC)	3.9 ± 2.29	224 ± 65.3
#molecules/1000	12.6 ± 7.31	709 ± 188
Rise time (µsec)	300 ± 90	3340 ± 161
Middle-width (µsec)	470 ± 120	12800 ± 2190

表.1 では WT マウスより調整したドパミンニューロンと副腎髄質クロマフィン細胞の開口分泌の動態指標を比較した。1つの小胞から分泌されるドパミンとアドレナリンの分子数はドパミンニューロンではクロマフィン細胞の約 1/50 であり、開口速度は約 10 倍速い事が示された。統計的処理に耐える十分なデータ量が得られなかったが、KI 由来ドパミンニューロンでは WT と比較して上記開口分泌の動態指標(開口速度)が若干遅くなる傾向が認められたが、その他の指標に大きな差はなかった。また、KI 由来のクロマフィン細胞における分泌小胞の刺激前および刺激後の小胞供給期間の細胞内動態は WT に比べ、抑制傾向が認められた。今後、データ量の増加とドパミンニューロンでの解析を目指し研究を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4編)

Kikuchi-Utumi, K, Ishizaka, M., Matsumura, N., Watanabe, M., Aoyama, K., Sasakawa, N., Nakaki, T., Involvement of the 1D-adrenergic receptor in methamphetamine-induced hyperthermia and neurotoxicity in rats. Neurotox Res. 2013; 80: 2886-2893. 査読有 PMID:23283760

Nakamura, K., Kohda, T., Shibata, T., Tsukamoto, K., Arimitsu, H., Hayashi, M., Mukamoto, M., Sasakawa, N and Kozaki, S.

Unique biological activity of botulinum D/C mosaic neurotoxin in murine species. *Infect. Immun.*, 2012; 80: 2886-2893. 査読有  
PMID:22665374

Sasakawa, N., Ohara-Imaizumi, M., Fukuda, M., Kobayama, H., Kumakura, K. Dissociation of inositol-polyphosphates from the C2B domain of synaptotagmine facilitates spontaneous release of catecholamines in adrenal chromaffin cells. A suggestive evidence of a fusion clamp by synaptotagmin. *Neuropharmacol.*, 2011; 60: 1364-1370. 査読有 PMID:21402086

[学会発表] (計4編)

中村佳司, 幸田知子, 柴田優斗, 塚本健太郎, 有満秀幸, 向本雅郁, 笹川展幸, 小崎俊司. Unique biological activity of botulinum D/C mosaic neurotoxin. 第85回日本細菌学会総会; 2012/3/27, 長崎

林 光紀, 柴田優斗, 中村佳司, 小崎俊司, 笹川展幸. Effects of D/C mosaic botulinum neurotoxin on the regulation of exocytosis in single adrenal chromaffin cells. 第85回日本薬理学会総会; 2012/3/15, 京都

[図書]  
該当なし

[産業財産権]  
該当なし

[その他]  
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹川 展幸 (SASAKAWA, Nobuyuki)  
上智大学・理工学部・教授  
研究者番号: 20187107