

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591287

研究課題名(和文) アルコール誘因性神経機能障害の分子機構—非小胞性シナプス輸送による解析—

研究課題名(英文) Alterations of synaptic transcytosis induced by ethanol exposure: non-vesicular synaptic transport in the rat

研究代表者

竹内 義喜 (Takeuchi, Yoshiki)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：20116619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：神経終末のHRP酵素などは小胞に含まれないことから、従来の小胞性輸送とは全く異なった輸送と考えられる。これら未知の非小胞性シナプス輸送を解明するため、ラットの迷走神経にWGA-HRPを注入し孤束核領域を観察した。正常動物ではシナプスの変化は全くみられなかったが、Rab3A-siRNAとの混合注入やアルコール依存症動物では、HRP反応産物を含んだ神経終末が次の神経細胞に陥凹し離断されていくのがみられた。このような形態は下垂体後葉の神経終末でも観察され、離出様分泌と名付けられた。機能的には神経細胞障害によるシナプスの脆弱性があるとき、このようなたんぱくシナプス輸送が働くものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neuronal tracer of HRP is considered to be transported independently at synapse. To investigate this transport, the solitary nucleus was observed at the electron microscopic level after WGA-HRP injection into the rat vagus nerve. Animals receiving injection of WGA-HRP with Rab3A-siRNA or alcohol treatment revealed apocrine-like structures of terminals which contained HRP reaction product and indent into secondary neurons. Finally, these structures were observed to be separated completely from axon terminals. Quite similar structures were found in the posterior pituitary in animals receiving same injections into the hypothalamus or alcohol treatment. The apocrine-like structures of hypothalamic terminals showed to contain HRP reaction product and large dense core vesicles, and be frequently separated into the vascular space. The present study apparently confirmed the existence of synaptic transport of proteins which was quite different from previous vesicular synaptic transport.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：シナプス輸送 非小胞性 アルコール 離出分泌 透出分泌 タンパク輸送 内分泌 下垂体後葉

1. 研究開始当初の背景

神経機能はシナプスに基づく神経回路網形成によりはたらしめられる。さらに、神経終末に存在するたんぱくを含む物質のシナプス輸送は、従来の小胞性輸送に従うという絶対的定説がある。しかしながら、アミノ酸や蛍光物質、酵素などでは、とくに中枢の視覚系において、シナプス輸送が容易になされるとの報告があるが、その形態的証明は全くなされていない。

2. 研究の目的

神経終末では HRP のような酵素たんぱくは非常に大きな反応産物として認められる。このような物質は小胞の数十倍もの大きさを示すにもかかわらず、経シナプ的に二次ニューロンに移動する。この輸送メカニズムは明らかに小胞非依存性であり、特に視覚系の領域で頻りにみられる。いいかえれば、従来の小胞性シナプス輸送とは全く異なる輸送経路がシナプスに存在すると考えられる。その未知の経路と、脳の神経機能に強い影響を与えるアルコール疾患との関連性について明らかにすることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

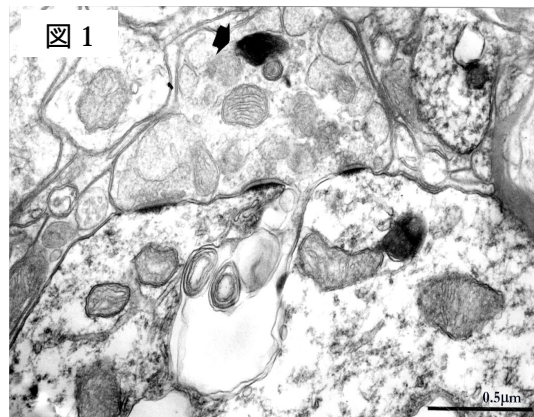
神経トレーサー (WGA-HRP) を 10 μ l Hamilton microsyringe により雄ラット頸部迷走神経に注入し、孤束核領域で HRP 反応産物を含む神経終末を電子顕微鏡にて観察した。実験では、神経機能障害を作成するため、WGA-HRP と Rab3A-siRNA を混合注入した。一方、アルコール依存症実験動物を作成し、同様の WGA-HRP 注入実験を行った。さらに、二次ニューロンと対峙しない神経終末を観察するため、下垂体後葉を研究対象とし、視床下部に 1 μ l の syringe を用いて、上記と同様の WGA-HRP 注入実験を行い視床下部 下垂体系の観察を行った。本実験において、Rab3A-siRNA を混合注入した場合、Rab3A 発現を迷走神経の下神経節および孤束核で PCR により明らかにした。HRP 反応には DAB 法を使用し、電子顕微鏡観察に付した。TMB 法は電子顕微鏡的観察には用いず光学顕微鏡的組織観察にのみ行った。これは神経終末およびシナプス周辺の膜の保持および反応産物の形態をより正常に保つためである。TMB 法の特徴としては、HRP 反応液を pH3.3 まで低くするため、組織破壊とくに膜破壊が起き、電子顕微鏡観察において膜を含む物質の構造解析には不適であるからである。

4. 研究成果

本研究では神経トレーサーとして単体の HRP を使用せずに、レクチンと結合した WGA-HRP を使用した。これはレクチン結合 HRP の軸索輸送が非常に促進されることによる

のと、細胞膜とくに神経終末のシナプス前膜との affinity が高まるとの報告によるものである。結果として HRP 単体より、シナプス輸送が促進されるとのことであるが、本研究においても軸索内あるいは神経終末内において多数の HRP 反応産物が認められた。

正常動物における神経終末ではシナプスの変化はなかった。しかしながら、WGA-HRP と Rab3A-siRNA を混合注入した場合や、アルコール依存症動物では神経終末から二次ニューロンのほうへ突出する特殊な形態が観察された。すなわち、シナプス前膜と後膜がともに二次ニューロン側に陥入している形態を示し、この神経終末部の突出部には HRP

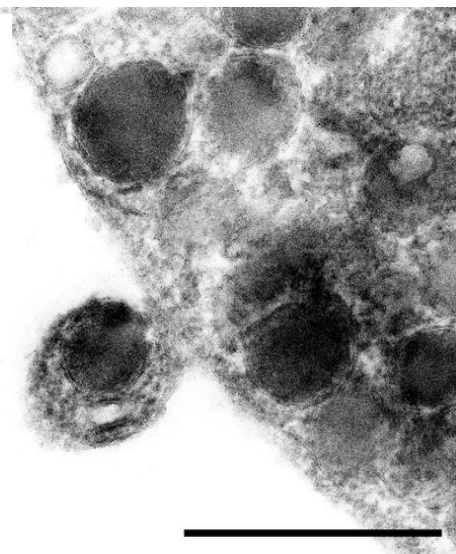


反応産物のみならず、シナプス小胞・大顆粒・lamellar body・扁平 cisternae などが含まれた。また、autophagosome 様の構造物もみられ、細胞ダメージに対する神経細胞保護作用の存在あるいはオートファジーを伴う細胞死があることを示唆した (図1. 矢印の HRP 反応産物によりこの神経終末は迷走神経由来であることがわかる。アルコール依存症実験動物。Scale bar=0.5 μ m)。さらに、この突出した構造物は離断される像を示し、二次ニューロンに移動していくのがみられた。これは明らかに従来のシナプス輸送と異なる経路の存在を示すものである。これらの構造物は離断される像を示したためこれを、離出様分泌構造 (apocrine-like structure) と名付けた。この分泌構造はシナプスにおけるバンドの部位では絶対見られず、必ずその結合部位の周辺あるいはバンドとバンドの間で起こった。出現頻度については非常に低く、400 メッシュの 1 hole 当たり 0-1 程度であった。WGA-HRP と Rab3A-siRNA を混合注入した場合、迷走神経下神経節と孤束核における Rab3A たんぱくの発現は著明に減少していたため、siRNA の影響があったと結論付けることができた。

さらに、上記の構造はシナプス前膜と後膜が存在する条件下での出現であるため、神経終末そのものの形態学的変化を詳細に観察するのは困難である可能性が考えられる。そこで、この現象をより頻出させるため、二次ニューロンと対峙しない神経終末が存在する領域を観察する必要があった。観察には、

下垂体後葉を用い、そこに存在する血管周囲腔に対峙する視床下部からの神経終末を用いた。神経終末は、従来の報告と同様、HRP 反応産物や大有芯顆粒および小胞を含んだ。

図 2



多くの有芯顆粒は electron dense であったが、その特徴は開口分泌像が全くみられなかったことであった。これらの像とは対照的に、有芯顆粒や HRP 反応産物を含む神経終末の一部が血管周囲腔に突出するものであった(図 2)。electron dense 有芯顆粒を含む視床下部からの神経終末。開口分泌はなく、血管周囲腔に突出する構造を示した。WGA-HRP と Rab3A-siRNA の混合液の視床下部への注入。Scale bar=0.2 μ m)。これは、前述の apocrine-like structure と同様の構造を示すものであった。また、この構造物は離断されるのも同様であり、それにより血管周囲腔には有芯顆粒や HRP 反応産物が浮遊しているのがしばしば観察された。これらは時間と共に血中に溶解するものと推測される。つまり、下垂体後葉におけるホルモン分泌も、開口分泌以外に離出様分泌があり、従来全く報告がない新しい分泌様式と考えられる。この分泌様式は正常動物の下垂体後葉でも見られたのが特徴であったが、Rab3A-siRNA との混合注入あるいはアルコール依存症実験動物のほうがはるかに出現頻度は高かった(400 メッシュの 1hole 当たり 1-4 程度)。また、非常に稀なものとして、従来、有芯顆粒および小胞輸送の開口分泌以外の輸送経路の存在が指摘されてきた透出様分泌構造 (diacrine-like structure) もみられた。この構造物においては、神経終末から、融合した顆粒あるいは HRP 反応産物の漏出が認められた。離出様分泌構造の存在はその他、アルコール依存症実験動物において、海馬の CA1 領域にも存在することが明らかとなったため、脳全体に見られる可能性が高いと考えられる。

離出様分泌構造を示す神経細胞体およびその周辺のグリア細胞の変化については、アルコール依存症実験動物の迷走神経下神経節細胞で観察が行われた。神経節細胞の細胞内

小器官には顕著な変化はなかったものの、神経節細胞周辺のいわゆる衛星グリア細胞、とくにマイクログリア細胞の要素を持ったものとの関連性において fine foot process による神経節細胞体へのマイクログリア細胞の貪食作用という非常に特異的な微細構造所見を得た。

今回の研究成果として特筆すべきは、シナプスにおける情報伝達に関連する Rab3A の発現を siRNA により抑制した場合や、アルコール依存症による神経機能障害を発症させた場合は、シナプス部で従来の小胞性輸送と全く異なった輸送経路が出現してくることであった。これはシナプスの機能的脆弱性が起こった時に、分子生物学的変化としてシナプスにどのような変化が発症するかということを明らかにした最初の報告である。迷走神経を用いた本研究では、アルコール誘因性神経機能障害は神経節細胞の衛星グリア細胞の活性化および神経細胞ダメージに対する保護作用またはプログラム細胞死の存在の示唆、さらに神経終末におけるシナプス輸送の変化の存在などを明らかにすることができた。従来、アルコール依存症の疾患においては多彩な神経症状や身体症状が発症することが知られている。しかしながら、どのようなシナプスの変化が伴っているのか、その本質的なメカニズムは明らかにされておらず、本研究はシナプス輸送の面での新しい解明に貢献するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Takeuchi Y, Liu JQ, Matsumoto Y, Miki T, Ohta K, Warita K, Suzuki S, Tamai M. Secretion-related structures of hypothalamo-hypophysial terminals in the rat posterior pituitary. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 査読有, 90(3), 2013, 69-76

Takeuchi Y, Miki T, Liu JQ, Ohta K, Warita K, Matsumoto Y, Suzuki S, Tamai M, Ameno K, Bedi KS, Yakura T. Morphological evidence of an altered process of synaptic transcytosis in adult rats exposed to ethanol. *Alcohol and Alcoholism*, 査読有, 47(6), 2012, 671-676. Doi:10.1093/alcalc/ags085

Takeuchi Y, Matsumoto Y, Miki T, Warita K, Wang ZY, Bedi KS, Yakura T, Liu JQ. Alteration of the expression levels of Rab3A affects the extent of transcytosis of HRP-labeled marker proteins in rat CNS neurons. *Neuroscience and Medicine*, 査読有, 2, 2011, 282-287

〔学会発表〕(計 8 件)

Liu JQ, Transsynaptic transport of WGA conjugated Amyloid- in the nucleus of solitary tract of the rat, 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013 年 3 月 28 日～2013 年 3 月 30 日, サポートホール高松(高松市)

Yakura T, Alterations of synaptic transcytosis induced by ethanol exposure: apocrine-like structure in the rat, 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2012 年 3 月 26 日～2012 年 3 月 28 日, 山梨大学甲府キャンパス(甲府市)

竹内義喜, 下垂体後葉における透出および離出様分泌, Neuroscience 2011/第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 14 日～2011 年 9 月 17 日, パシフィコ横浜(横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 義喜 (TAKEUCHI, Yoshiki)
香川大学・医学部・教授
研究者番号: 20116619

(2) 研究分担者

三木 崇範 (MIKI, Takanori)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号: 302574294

(3) 研究分担者

今川 智敬 (IMAGAWA, Tomohiro)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号: 20232605

(4) 研究分担者

中村 和彦 (NAKAMURA, Kazuhiko)
弘前大学・医学部・教授
研究者番号: 80263911

(5) 研究分担者

太田 健一 (OHTA, Kenichi)
香川大学・医学部・助教
研究者番号: 50403720

(6) 研究分担者

鈴木 辰吾 (SUZUKI, Shingo)
香川大学・医学部・助教
研究者番号: 50451430

(7) 研究分担者

割田 克彦 (WARITA, Katsuhiko)

香川大学・医学部・助教

研究者番号: 40452669

(8) 研究分担者

松本 由樹 (MATSUMOTO, Yoshiki)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号: 90335844