

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年6月4日現在

機関番号：34310
研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2011～2013
課題番号：23500403
研究課題名 (和文) シナプス前末端ミトコンドリアの形態機能相関
研究課題名 (英文) structure and function of mitochondria at presynaptic terminal
研究代表者
齋藤 直人 (SAITOH, Naoto)
同志社大学・生命医科学部・准教授
研究者番号：90334226
交付決定額 (研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要 (和文)：中枢神経シナプス伝達を維持するためには、シナプス前末端を機能させ続けるだけのエネルギー供給が必要である。神経前末端において神経活動に依存したエネルギー供給を行うためには、シナプス前末端のミトコンドリアが神経活動をモニターする必要がある。シナプス前末端のミトコンドリアは微小管に結合することによって、自身を正しい位置に固定することで、神経活動をモニターできる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Mitochondrial function is essential for various aspects of living cell. Its morphological feature should be also important for living cell dynamics especially for the energy supply. I focus on the presynaptic mitochondria because presynaptic terminal is the specialized machine in terms of vesicular traffic which is controlled by the activity of neuron. First of all, I checked that presynaptic mitochondria is free moving or not. FCS analysis revealed that nocodazole, famous microtubule disrupting reagent, has affected the presynaptic mitochondrial stability. I conclude that the linking with microtubule might ensure the activity dependency of presynaptic energy supply from the mitochondria. To address this issue, I developed the novel cAMP probe. It can visualize the cAMP dynamics inside the mitochondria. It has been believed that [cAMP]_{mt} is important modulator for electron transport activity. I have proposed the hypothesis that presynaptic activity induce the [cAMP]_{mt} increase, which depend on microtubule platform, then up-regulate ATP production for energy use of synaptic transmission.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

真核細胞にとって、ミトコンドリアの第一の機能と言えばやはり酸化リン酸化、つまり潤沢な ATP の供給であろう。しかしそれ以外の面でも、ホスト細胞の様々な機能に直接または間接的に関わりを持っている。また、その形態も決して一様ではなく、個々の細胞の事情に合わせてダイナミックに変化させる能力を有する。神経細胞は特に ATP 消費の激しい細胞である。この主たる理由は、活動電位の発生に伴うイオンの流入流出に起因する Na/K ATPase などの活性化である。次に ATP 消費の多い部位はシナプス後電位

を生じるシナプス後部である。これらを合わせて約 8 割の ATP を消費しており、一般的な細胞活動の維持に使われる分を足し合わせると 9 割を超える。これに対して、シナプス小胞に伝達物質を蓄え、そのシナプス小胞を常に動かし続け、カルシウムポンプを働かせたりするシナプス前末端の ATP 消費量は、全体の 6%程度と一見控えめであるが、シナプス前末端が非常に小さな構造であることを考えると、むしろ贅沢なエネルギー供給が必要であるとも考えられる。以上の点に着目しつつ、シナプス前末端のミトコンドリアの機能を解明する。

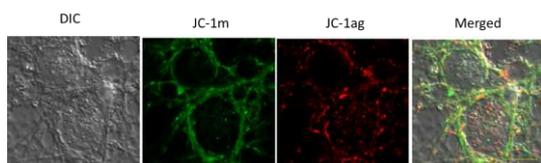
蝸牛神経核から台形体内側核に投射するシナプスには巨大なシナプス前末端があり、(ヘルドの)カリックスと呼ばれている。1対1結合のグルタミン酸作動性であり、常時100Hz以上のシナプス伝達を行う高信頼性が特徴である。中枢神経シナプス前末端としては異例に大きいため光学顕微鏡下で観察できるカリックスには、集積したミトコンドリアを取り囲むようにシナプス小胞が局在し、リング状に放出部位が形成される。私はこれまでに、この特徴的なシナプス結合を、培養下で再現する系を確立した。これを培養カリックスと呼ぶ。培養カリックスには次のような特徴がある。①遺伝子導入や発現抑制などの実験が容易である。②高分解能での光学顕微鏡下での観察に適している(特に本研究課題では蛍光相関分光法を適用する上で重要である)。この培養カリックスを用いてシナプス前末端のミトコンドリアの動態を観測することによって、シナプス前末端にミトコンドリアが集積するメカニズムを明らかにすることを計画した。

2. 研究の目的

シナプス前末端のミトコンドリアは、シナプスのイラストには必ず描かれるほどポピュラーであるが、その動態や機能に関しては未知のままである。これは、一般的なシナプス前末端が小さすぎるため、その中のシナプス前末端ミトコンドリアに着目して研究することが難しかったことがあげられる。本研究課題では、新たに開発した培養カリックスなどを用いることで、シナプス前末端ミトコンドリアを可視化し、その動態を追う。また、その形態的特徴とリンクさせながら、シナプス前末端ミトコンドリアの新たな機能的側面を見だしていく。シナプス前末端のミトコンドリアは、アルツハイマー病などの神経変性疾患において最初期の障害部位としても注目を浴びている。本研究の中では活性酸素や一酸化窒素ラジカルなどは直接扱わないが、シナプス前末端ミトコンドリアの形態・動態の解析や機能解析が明確になれば、将来的にはその障害や機能不全に対しても定量的研究を行えるものと考えている。

3. 研究の方法

蛍光相関分光機能を持つ共焦点レーザー顕微鏡を用いて培養カリックスなどのミトコンドリアのイメージングおよび測光を行う。

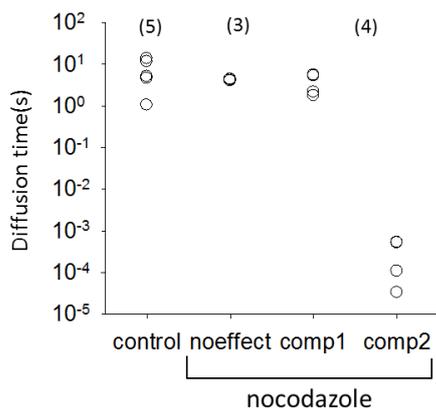


これにより、シナプス前末端ミトコンドリアの形態形成に関わる分子機序を明らかにす

る。蛍光相関分光法では共焦点スポットに入る蛍光の揺らぎを観測し自己相関をとることで、対象物の拡散時間を求めることが出来る。この手法でシナプス前末端ミトコンドリアの拡散時間を求めると、およそ数秒の値が出る。これは、このミトコンドリアが固定されて非常に小さな揺らぎしか示さないためと考えられる。この細胞を nocodazole、colchicine などの微小管脱重合剤で処理をする。微小管による固定から解放されて、ミトコンドリアのくねくねした揺らぎが大きくなった場合、拡散時間に早い成分(0.1~1ミリ秒程度)が生じるであろう。次に、共焦点レーザー顕微鏡や冷却 CCD カメラシステムでイメージングできるような、ミトコンドリアのセカンドメッセンジャー動態を解析できるツールを作製する。これにより、形態的特徴とシナプス前末端内での機能を結びつけ、新たな概念を提供する。

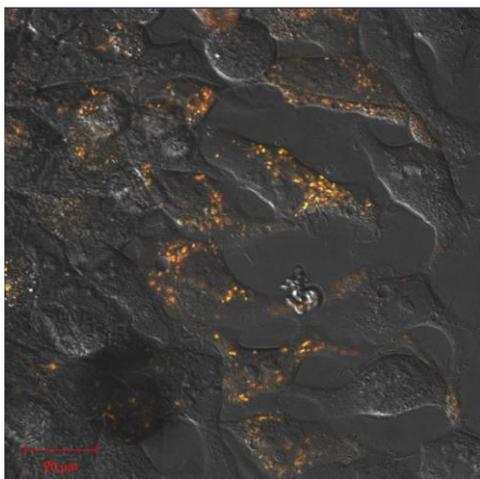
4. 研究成果

本研究課題では、シナプス前末端のミトコンドリアの形態が、どのような機能と関連するのかに着目して研究を進めた。シナプス前末端のミトコンドリアの代謝活性がカルシウムによって調節されていることを示す論文が報告されている。一方、ミトコンドリアの代謝活性はカルシウム以外にも cAMP によって調節されることがよく知られている。シナプス前末端のミトコンドリアは、神経の活動に依存して自身の ATP 合成活性を調節していると考えの方が自然に思えるが、そのことを直接示す証拠は少ない。光学顕微鏡下で時系列的に観察すると、シナプス前末端ミトコンドリアはほぼ全て不動のままである。このことから既に輸送経路からは外れていることが予想される。不動である理由には2つの可能性があるだろう。1) ミトコンドリアは自由な状態にあるが、シナプス前末端という限られたスペースの中にいるため不動に見える。2) ミトコンドリアは実際に何らかの構造物にアンカーしている。これらの可能性は時系列観察では見分けが付かないため、蛍光相関分光法(FCS)を適用する。ミトコンドリアは不動でも、実際にはくねくねとその形態を変化させていると考えられる。そのため何処かに固定されているときと、微小空間とはいえ自由に動けるときとでは、ミトコンドリアから発せられる蛍光の自己相関(時間)に違いが生じる。シナプス前末端にある細胞骨格分子としてはアクチンフィラメントが有名であるが、微小管やニューロフィラメントも少量ながら存在する。FCSを用いた解析によって、シナプス前末端のミトコンドリアは Nocodazole に感受性を示すことから、微小管に結合した状態で局在していると考えられる(アクチン線維には依存しない)。一



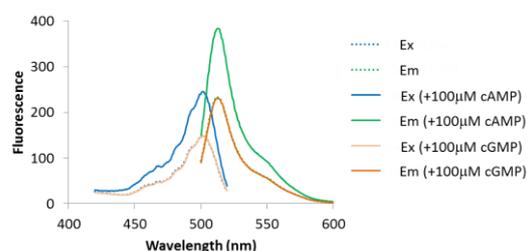
方、シナプス前末端のミトコンドリアは神経活動にともなって流入したカルシウムを取り込むことで、ミトコンドリア内のカルシウム濃度を上昇させることが報告されている。このシナプス前末端ミトコンドリアのカルシウム濃度上昇が、微小管との結合状態に依存するのではないかと考えている。また、ミトコンドリアの代謝活性を十分に上昇させるためには、ミトコンドリア内 cAMP の上昇に伴って電子伝達系が活性化される必要があると考えられるが、これまでミトコンドリア内 cAMP の動態を解析した報告はない。そこで、新規 cAMP 蛍光プローブを作製し、これにミトコンドリア局在化シグナルを付加することで、ミトコンドリア内の cAMP 動態を解析できるようにした。これを用いること

3xmito-CC sensor



で、シナプス前末端ミトコンドリアが神経活動に伴って cAMP 濃度を上昇させるような系が存在するのかが確かめることが出来る。また、シナプス前末端ミトコンドリアの cAMP 濃度上昇が、やはり微小管との結合に依存するのかがどうかをテストすることが出来ると考えられる。しかしそもそも、シナプス前末端の cAMP が生理的条件下で変動しうる

のか否か、直接検証されていない。cAMP 濃度はこれを産生するアデニル酸シクラーゼと分解するホスホジエステラーゼの活性のバランスで決定されると考えられる。シナプス前末端のモデルシナプスとして Calyx of Held があるが、同シナプス前末端には Gs や Gi 共役型の GPCR は未だ明らかではない。報告されている GPCR は Go 共役型として電位依存性カルシウムチャンネルを抑制するものが主である。カルシウム依存性アデニル酸シクラーゼの存在は否定できない。つまりカルシウムの後段で cAMP 濃度が調節されている可能性はある。また可溶性アデニル酸シクラーゼが培養カリックスに局在するかどうかは明らかではないが、局在が確認出来た場合には、重炭酸イオンによって cAMP 濃度が調節されている可能性が高い。以上の論理は細胞質の cAMP がミトコンドリア内の cAMP 濃度に影響することを前提としているようであるが、この点に関しては異論も提出されている。私自身、ミトコンドリア内の cAMP 濃度は細胞質のそれから隔離されて、ほぼ独自のダイナミクスを持っていると考えられる結果を得ている。以上のような可能性を一つずつ検証するために、新規 cAMP 蛍光プローブの作製は不可避であった。



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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

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）

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 直人 (Saitoh, Naoto)
同志社大学・生命医科学部・准教授
研究者番号：90334226

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：