

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650169

研究課題名（和文） シナプス蛋白輸送を担うエネルギー供給のライブイメージング

研究課題名（英文） Live imaging of energy supply for synaptic protein transport

研究代表者

持田 澄子 (MOCHIDA SUMIKO)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：30096341

研究成果の概要（和文）：幼若ラットの上頸交感神経節細胞を単離培養して発育途上（培養3週）と成熟シナプス（培養6週）を形成した神経のミトコンドリア、シナプトフィジンとCASTを蛍光蛋白CFP、RFPとGFPを発現させて可視化して3つの蛋白動態の同時ライブイメージングを試み、様々な神経刺激パターンに応じた蛍光蛋白の移動を観察して、ひとつの神経軸索でのミトコンドリア・シナプス小胞蛋白・アクティブゾーン蛋白の軸索移動速度、シナプスへの蓄積がミトコンドリアの軸索移動を制御する機能蛋白阻害によって変化することを確認した。

研究成果の概要（英文）：Preparing synaptic contacts in developing (three weeks in culture) and mature (6 weeks in culture) superior cervical ganglion (SCG) neurons, I performed live image of axonal transport of CFP-labeled mitochondria, RFP-labeled synaptophysin, a synaptic vesicle protein, and GFP-labeled CAST, an active zone protein, applying various action potential firing pattern to a presynaptic neuron. Their conduction velocity in the axon and their accumulation in the axon or into the terminal were impaired with dysfunction of a motor adaptor protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学・ミトコンドリア・軸索輸送・シナプス

1. 研究開始当初の背景

シナプス前終末では、シナプス小胞が様々なステージにあり、其々のステージを担う蛋白群の相互作用が国内外の多くの研究によって生化学的・分子生物学的に明らかにされた (Südhof, T.C. The synaptic vesicle cycle. Annu Rev Neurosci 27, 509-547, 2004 他)。また、これらのシナプス蛋白群を軸索輸送するモーター分子、モーター分子と cargo を仲介するアダプター分子、それぞれの cargo 分子も明らかにされていた (review, Hirokawa, et al., Kinesin

superfamily motor proteins and intracellular transport. Nat Rev Mol Cell Biol 10, 682-696, 2009 他)。これらの個々の蛋白分子についての研究結果は蓄積されていた。しかし、成熟神経においても神経活動によって制御されることが予測されるこれら蛋白群の合成 → 軸索輸送 → シナプス前終末での機能複合体構築という一連の統合的な生理制御メカニズムはこれまでに解析されていない未開の研究課題であった。

本研究代表者は、シナプス前細胞に遺伝子の

導入・RNA 干渉法 (RNAi) の適用が容易な独自のモデル実験系を用いて、シナプス伝達に不可欠な神経終末蛋白の機能解析を試み、神経終末蛋白質の機能解析研究の進展に積極的な役割を果たしてきた (Di Giovanni, J. et al., *Neuron* 67, 268-79, 2010; Mochida, S. et al., *Neuron* 57, 210-216, 2008; Krapivinsky, G., et al., *Neuron* 52, 485-496, 2006)。本研究代表者独自の実験系の利点と熟練した実験技術を生かして、国内外の研究協力者から市販されていない分子プローブの提供を得ながら、「蛋白群の合成 → 軸索輸送 → シナプス前終末での機能蛋白複合体構築」という一連のシナプス構築メカニズムの神経活動に依存した生理的制御の詳細を明らかにすることができる研究手法を確立していた。

2. 研究の目的

DNA を microinjection してミュータント蛋白や蛋白相互作用機能ドメインを強制発現させてミトコンドリア軸索配置に関わる蛋白機能を阻害、あるいは siRNA や shRNA を導入して蛋白発現を阻害したシナプス前細胞で、シナプス活動に依存した「蛋白群の合成 → 軸索輸送 → シナプス前終末での機能蛋白複合体構築」を複数の蛋白質を蛍光蛋白でラベルしたライブイメージングを用いて解析し、神経活動とミトコンドリアの移動、ミトコンドリアのエネルギー供給、それにとまなうシナプス前終末蛋白輸送形態を明らかにする。

3. 研究の方法

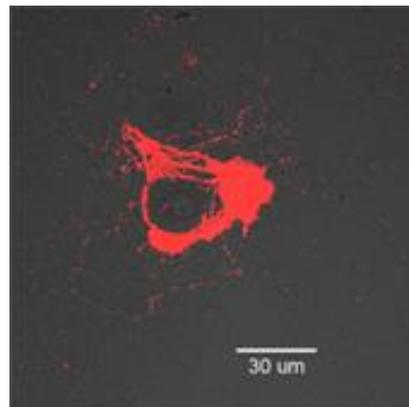
シナプス活動に依存した「蛋白群の合成 → 軸索輸送 → シナプス前終末での機能蛋白複合体構築」におけるミトコンドリアの軸索内配置とエネルギー供給を解析するために、ミトコンドリアを軸索の適所に配置する蛋白群の DNA を microinjection してミュータント蛋白や蛋白相互作用機能ドメインを強制発現させて機能を阻害、あるいは siRNA や shRNA を導入してそれらの蛋白発現を阻害したひとつのシナプス前細胞で、複数の蛋白質を異色蛍光蛋白でラベルしたライブイメージングを行ない、様々な刺激パターンに応じた神経活動による蛍光ラベル蛋白 (3-4 種類) の動態をリアルタイム、あるいは継時的に追跡観察することによって、神経活動に依存したミトコンドリア移動、エネルギー供給、それにとまなうシナプス前終末蛋白輸送形態の詳細を解析する。さらに、Caged-Ca²⁺、あるいは Caged-ATP を使って、蛋白機能阻害による効果のレスキューを試みる。

4. 研究成果

平成 23 年度には、幼若ラット (生後 7 日) の上頸交感神経節細胞を単離し、神経成長因子存在下で数週間培養して神経細胞間にシナプスを形成し、発育途上 (培養 3 週) と成熟シナプス

(培養 6 週) を形成した神経のミトコンドリアを GFP 可視化して、様々な刺激パターン与えたときのミトコンドリアの動態を観察して、神経活動に依存してミトコンドリアの移動速度が変化することを確認した。さらに、神経軸索をシナプス前終末に輸送され、シナプス前終末で機能する蛋白として、SNARE 蛋白質 syntaxin を GFP 可視化、シナプス小胞膜蛋白質の synaptophysin を RFP 可視化、また、active zone 蛋白質の CAST を GFP 可視化して、様々な神経刺激パターンに応じた神経軸索の移動を観察し、神経軸索での蛍光の分布強度、移動速度、シナプスへの蓄積を指標として解析を試みた。

同様の培養細胞を用いて、平成 24 年度には、ミトコンドリアを CFP 可視化、synaptophysin を RFP 可視化、CAST を GFP 可視化して、三つの蛋白の同時ライブイメージングを試みた。様々な神経刺激パターンに応じた蛍光蛋白の移動を観察して、ひとつの神経軸索でのミトコンドリア・シナプス小胞蛋白・アクティブゾーン蛋白の軸索移動速度、シナプスへの蓄積を比較した。



Control siRNA を transfection した培養上頸交感神経細胞のミトコンドリアの分布 (赤色蛍光像) : 隣接する神経細胞体を取り囲む神経軸索中に多数のミトコンドリアが分布し、移動している。

さらに、ミトコンドリアを軸索の適所に配置する蛋白群のうち、モーター分子 KIF5B のアダプター蛋白である syntabulin、モーター分子 dynein のアダプター蛋白である syntaphilin の siRNA による機能阻害を試みた。これらの蛋白のノックダウンは、軸索内ミトコンドリアの分布に異常をきたした。syntabulin のノックダウンは、軸索でのミトコンドリアが 30% に減少し、細胞体付近に留まっていた。一方、syntaphilin のノックダウンは、ミトコンドリアの軸索内移動が増した。そこで、syntabulin をノックダウンした神経細胞で、CFP 可視化-ミトコンドリア、RFP 可視化-synaptophysin、GFP 可視化-CAST を観察して、ひとつの神経軸索でのミトコンドリア・シナプス小胞蛋白・アクテ

イブゾーン蛋白の軸索移動速度、シナプスへの蓄積の違いを、研究実施期間終了後も継続して検討している。

研究実施期間中に計画していた Caged-Ca²⁺、あるいは Caged-ATP を使って、蛋白機能阻害による効果のレスキューを試みる実験は 24 年度内に実施できなかったが、今後も研究を継続して解析する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Magupalli, V.G., Mochida, S., Jiang, X. Westebroek, R.E., Nairn, A.C., Scheuer, T. & Catterall, W.A. Ca²⁺-independent Activation of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Bound to the C-terminal Domain of CaV2.1 Channels. *J. Biol. Chem.* 査読有 288(7):, 637-48, 2013. doi: 10.1074/jbc.M112.369058
- (2) Leal, K., Mochida, S., Scheuer, T. & Catterall, W.A. Fine-tuning synaptic plasticity by modulation of presynaptic Ca_v2.1 channels with calcium sensor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 査読有 109(42), 17069-74, 2012. doi: 10.1073/pnas.1215172109.
- (3) Vogl, C., Mochida, S., Wolff, C., Whalley, B.J., Stephens, G.J. The Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Ligand Levetiracetam Inhibits Presynaptic Ca²⁺ Channels through an Intracellular Pathway. *Mol Pharmacol.* 査読有 82,199-208, 2012. doi: 10.1124/mol.111.076687.
- (4) Bucci, G., Mochida, S. & Stephens, G.J. Ca_v2.2 Ca²⁺ channel peptides inhibit the G protein modulation and synaptic transmission. *J Physiol.* 査読有 589(13), 3085-3101, 2011. doi: 10.1113/jphysiol.2010.204735.
- (5) Mochida, S. Ca²⁺/Calmodulin and presynaptic short-term plasticity. *ISRN Neurology* 査読有 vol. Article ID 919043, 7 pages, 2011. doi: 10.5402/2011/919043. (review article)
- (6) Mochida, S. Activity-dependent regulation of synaptic vesicle exocytosis and presynaptic short-term plasticity. *Neuroscience Research* 査読有 70(1),16-23, 2011. doi: 10.1016/j.neures.2011.03.005. (up-date article)

[学会発表] (計 15 件)

- ① Mochida, S. Temporal regulation of calcium channels and short-term plasticity. 3rd International Calcium Channel Conference. (Guest speaker) 平成 25 年 3 月 27 日, Krabi, Thailand
- ② Mochida, S. Dynamin isoforms decode

action potential firing for synaptic vesicle recycling. WS Protein molecules regulation for synaptic vesicle state. 第 35 回 日本分子生物学会年会 (Work shop organizer) 平成 24 年 12 月 11 日, 福岡

- ③ 持田澄子, 神経伝達物質放出の時空間ダイナミクス、生理研研究会「神経シナプス伝達の時空間ダイナミクス」、平成 24 年 11 月 27 日、岡崎
- ④ Tanijuji, S., Mochida, S. Dynamin isoforms decode action potential firing for synaptic vesicles recycling. Neurotransmission GRC, 平成 24 年 8 月 1 日, Water Valley, USA
- ⑤ Vogl, C., Mochida, S., Whalley, B.J., Tanifuji, S. & Stephens, G.J., Functional analysis and distribution pattern of synaptic vesicle 2 (SV2) isoforms in superior cervical ganglion neurons. 8th FENS Forum of Neuroscience, 平成 24 年 7 月 17 日, Barcelona, Spain
- ⑥ 谷藤章太、持田澄子、発火頻度に依存したシナプス小胞サイクリングを担うダイナミンアイソフォーム、第 89 回 日本生理学会大会、平成 24 年 3 月 30 日、松本
- ⑦ 谷藤章太、持田澄子、交感神経ダイナミンアイソフォームの役割、生理研研究会「シナプス伝達概念志向型研究」(研究会オーガナイザー)、平成 23 年 12 月 5-6 日、岡崎
- ⑧ Tanijuji, S. Mori, M., Mochida, S. Dynamin isoform selective and activity dependent vesicle recycling in sympathetic neurons. Neuroscience 2011, 平成 23 年 11 月 14 日, Washington DC, USA
- ⑨ Tanijuji, S., Mori, M., Mochida, S. Contribution of dynamin isoforms to synaptic vesicle recycling in sympathetic neurons. 第 34 回神経科学学会大会 Neuro2011, 平成 23 年 9 月 16 日, 横浜.
- ⑩ Mori, M., Tanijuji, S., Mochida, S. Ca²⁺ channels and Ca²⁺-binding proteins mediating synaptic transmission of sympathetic neurons. 第 34 回神経科学学会大会 Neuro2011, 平成 23 年 9 月 16 日, 横浜.
- ⑪ Mochida, S. Spatial and temporal regulation of calcium channels, 8th IBRO World Congress of Neuroscience (symposium) 平成 23 年 7 月 18 日, Florence, Italy
- ⑫ Vogl, C., Whalley, B.J., Mochida, S., Stephens, G. Levetiracetam inhibits synaptic transmission through inhibition of presynaptic voltage-dependent Ca²⁺ channels in superior cervical ganglion neurons. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, 平成 23 年 7 月 18 日, Florence, Italy
- ⑬ Bucci, G., Mochida, S., Stephens, G. Ca_v2.2 peptides on G protein inhibit synaptic

transmission and G protein modulation in superior cervical ganglion neurons (SCGNs).
8th IBRO World Congress of Neuroscience, 平成 23 年 7 月 16 日, Florence, Italy

⑭ 森 倫範、谷藤章太、持田澄子、培養交感神経アセチルコリン放出を担うシナプス前終末 Ca²⁺チャンネルサブタイプ、第 88 回 日本生理学会大会、平成 23 年 3 月 28 日、横浜

⑮ 谷藤章太、持田澄子、ダイナミンアイソフォームに依存した交感神経細胞シナプス小胞サイクリング、第 88 回 日本生理学会大会、平成 23 年 3 月 28 日、横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.tokyo-med.ac.jp/physiol/mochida3.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

持田 澄子 (MOCHIDA SUMIKO)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：30096341