

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 8 年 6 月 1 7 日現在

機関番号 : 3 8 0 0 5

研究種目 : 若手研究(B)

研究期間 : 2012 ~ 2015

課題番号 : 2 4 7 0 0 4 0 6

研究課題名 (和文) P K G による小胞エンドサイトーシス制御機構とその生後発達変化に関する研究

研究課題名 (英文) PKG-dependent regulation of synaptic vesicle endocytosis and its postnatal development

研究代表者

江口 工学 (Eguchi , Kohgaku)

沖縄科学技術大学院大学・細胞分子シナプス機能ユニット・スタッフサイエンティスト

研究者番号 : 8 0 4 7 0 3 0 0

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,400,000 円

研究成果の概要 (和文) : 本研究はPKGを介したシナプス小胞エンドサイトーシス制御機構の解明を目的とした。申請者は聴覚系シナプス calyx of Heldにおいて、前末端内PKGが小胞エンドサイトーシスを加速していることを電気生理的・薬理学的手法で明らかにした。また、PKGはシナプス後細胞から放出されたNOにより逆行性に活性化すること、PKGがRhoAやRhoキナーゼを介して前末端のPIP2量を制御してエンドサイトーシスを加速していることを解明した。PKGによるエンドサイトーシスの加速は生後発達と共に出現し、また神経活動依存的に働くことから、高頻度・長時間のシナプス伝達の信頼性を向上させることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : Synaptic vesicle endocytosis is required to maintenance of synaptic transmission. This study showed that presynaptic PKG accelerates vesicle endocytosis in calyx of Held synapses in auditory brainstem of rats. PKG was retrogradely activated by nitric oxide released from postsynaptic MNTB principal neuron. Activated PKG activated monomeric G protein RhoA and RhoA-associated protein kinase (Rho-kinase), and regulated presynaptic PIP2 contents. The increase of PIP2 in presynaptic terminals accelerated vesicle endocytosis. The inhibition of PKG or Rho-kinase by these inhibitors impaired the fidelity of synaptic transmission at high frequency. At immature calyx before hearing onset, the acceleration of vesicle endocytosis was absent. I conclude that this NO/PKG/Rho-kinase retrograde cascade for the acceleration of vesicle endocytosis is directed toward establishment of the sustained high frequency transmission at the synapse.

研究分野 : 神経生理学

キーワード : シナプス エンドサイトーシス PKG Rhoキナーゼ シナプス小胞

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系における情報伝達は神経細胞間接合部(シナプス)において行われる。送信側の神経末端(シナプス前末端)からは活動電位に応じて神経伝達物質が放出され、受信側の神経細胞(シナプス後細胞)の受容体を通して電気信号が伝達される。神経伝達物質は前末端内のシナプス小胞に充填されており、小胞膜と末端細胞膜の融合によって開口放出(エキソサイトーシス)される。開講後、細胞膜に融合した小胞膜は末端内に取り込まれ(エンドサイトーシス)、再び小胞へと再形成され、伝達物質の再充填を経て再利用される。末端内のシナプス小胞数はこの小胞再生機構によって維持されている。シナプス前末端におけるシナプス小胞の再生機構は神経情報伝達の維持に必須であり、その最初のステップであるエンドサイトーシスの制御機構の研究は脳機能を理解する上で重要である。

申請者は予備実験において、PKG 阻害剤がラット脳幹聴覚系シナプス calyx of Held の小胞エンドサイトーシスを抑制することを発見した。この知見に基づき、PKG 依存性小胞エンドサイトーシス制御機構の詳細を解明し、その生理的意義を明らかにすることを目的とし、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究は予備実験の結果に基づき、ラット脳幹巨大シナプス calyx of Held における PKG 依存性小胞エンドサイトーシス制御機構を解明することを目的とした。具体的な項目として、

(1) PKG の上流分子カスケードの解明

(2) PKG の下流分子カスケードの解明

(3) PKG 依存性エンドサイトーシス調節機構の生後発達変化

(4) PKG 依存性小胞エンドサイトーシス制御機構の生理学的意義の解明

の4項目を目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、標本として生後1~2週のラット脳幹急性スライスを用い、calyx of Held シナプスにおける小胞エンドサイトーシス制御機構を調べた。エンドサイトーシスの観測にはシナプス前末端へのパッチクランプ法と、その応用である細胞膜容量測定法を用いた。PTIOを除くPKG阻害剤やその他阻害剤、活性剤、抗体などはパッチクランプ記録用ガラス電極からシナプス前末端内に直接注入した。これは細胞外からの投与とは違い、シナプス後細胞やグリア細胞などへの非特異的作用を最小限に抑えることや、末端内への迅速な投与が可能であり、本研究方法の特色の一つである。また、小胞エンドサイトーシス制御機構がどのようにシナプス伝達に影響するかについては、シナプス前末端および後細胞から同時にパッチクランプ記録を行

い、前末端へと各種阻害剤等を注入しながら活動電位を発火させ、それに対する後シナプス応答(EPSCまたは活動電位)を記録し、その変化を調べた。

4. 研究成果

(1) PKG を活性化する代表的な因子として、一酸化窒素(NO)が挙げられる。Calyx of held シナプスにおいてシナプス後細胞がNOを放出するという報告があったことから(Steinert et al., 2010)、PKGの上流でNOが働いていると予想した。NO除去剤PTIOを細胞外に灌流したところ、小胞エンドサイトーシスが遅延した。このことは、シナプス前末端の外からNOが届き、エンドサイトーシスを制御していることを示唆している。シナプス後細胞からのNO放出はNMDA受容体依存性である(Steinert et al., 2010)ことから、NMDA受容体アンタゴニストを細胞外に灌流してNMDA受容体を阻害したところ、PTIOと同様に小胞エンドサイトーシスは抑制された。さらに、NOが前末端内PKGを介して小胞エンドサイトーシスを制御していることを確認するため、PKG活性分子であるcGMPを末端内に注入したところ、PTIOの小胞エンドサイトーシス阻害作用は消失した。以上の結果から、PKGはシナプス後細胞から放出されたNOによって逆行性に活性化し、小胞エンドサイトーシスを制御していることが明らかとなった。

(2) PKGの下流分子として、単量体G蛋白RhoAおよびRhoA依存性蛋白リン酸化酵素(Rhoキナーゼ)が働いていると予想し、Rhoキナーゼ阻害剤を末端内に注入したところ、PKG阻害剤と同様に小胞エンドサイトーシスを抑制した。また、RhoA活性剤をPKG阻害剤と共に末端内に注入すると、PKG阻害剤の作用は消失した。このことから、PKGがRhoA/Rhoキナーゼを介して小胞エンドサイトーシスを制御していることが明らかとなった。また、生化学的手法(ELISA、質量分析法)や免疫染色法により、PKG阻害剤やRhoキナーゼ阻害剤が末端内PIP₂量を減少させることを発見した。PIキナーゼ阻害剤PAOによってPIP₂量を減らすと、小胞エンドサイトーシスが阻害された。また、小胞エンドサイトーシスに対するPAOやPKG阻害剤、Rhoキナーゼ阻害剤の作用は、PIP₂を共に前末端内に注入することによって抑えられた。さらに、抗PIP₂抗体を前末端内に注入してPIP₂をマスクすることによって、小胞エンドサイトーシスは抑制された。以上の結果から、PKG/RhoA/Rhoキナーゼがシナプス前末端内PIP₂を介して小胞エンドサイトーシスを制御していることが明らかになった。

(3) PKG阻害剤による小胞エンドサイトーシスの抑制は、聴覚獲得後(生後2週)のcalyx of Heldでのみ観測され、獲得前(生後1週)

では見られなかった。また、免疫染色法を用いて calyx of Held における PKG の発現量を聴覚獲得前後で比較したところ、獲得後では獲得前に比べ有意に増えていた。このことから、PKG 依存性小胞エンドサイトーシスは生後発達に伴って PKG 発現量が増えることによって出現することが示唆された。

(4) PKG 依存性小胞エンドサイトーシス制御機構の生理的意義を解明するため、シナプス前末端・後細胞同時記録により、シナプス伝達の信頼性を調べた。前末端を高頻度 (100 Hz) で刺激して活動電位を連続発火させ、後細胞での活動電位発火率 (追従率) を測定した。1 分間刺激し続けると、コントロール群でも PKG 阻害剤投与群でも追従率は徐々に低下したが、PKG 阻害剤存在下では追従率の低下が有意に早くなった。このことから、PKG 依存性小胞エンドサイトーシスが高頻度のシナプス伝達を維持する上で重要な役割を担っていることが明らかとなった。

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3件)

1. 江口工学, 高橋智幸. 高頻度シナプス伝達を支えるシナプス小胞エンドサイトーシス制御機構. *生物物理*, 査読あり, 2014:54(1):15-18.
DOI:10.2142/biophys.54.015.
2. Taoufiq Z*, Eguchi K*, Takahashi T. Rho-Kinase Accelerates Synaptic Vesicle Endocytosis by Linking Cyclig GMP-Dependent Protein Kinase Activity to Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate Synthesis. *Journal of Neuroscience*, 査読あり, 2014:33(29):12099-104.DOI: 0.1523/JNEUROSCI.0730-13.2013 (*Equally contributed)
3. Eguchi K, Nakanishi S, Takagi H, Taoufiq Z, Takahashi T. Maturation of a PKG-Dependent Retrograde Mechanism for Exocytotic Coupling of Synaptic Vesicles. *Neuron*, 査読あり, 2012:74(3):517-529.DOI: 10.1016/j.neuron.2012.03.028

〔学会発表〕(計5件)

1. Eguchi K, Taoufiq Z, Takahashi T. Rho-kinase accelerates synaptic vesicle endocytosis by modulating phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. 9th FENS. 2014年7月5-9日. Milan, Italy.
2. Eguchi K, Taoufiq Z, Takahashi T. PKG accelerates vesicle endocytosis via

Rho-associated protein kinase at the calyx of Held synapse. 第90回日本生化学会大会. 2013年3月27-29日. 東京都江戸川区.

3. Taoufiq Z, Eguchi K, Takahashi T. A novel physiological function of Rho-kinase in synapse: homeostasis balance of vesicle exocytosis and endocytosis by modulating phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. Neuroscience2013. 2013年11月9-13日. San Diego, USA.
4. Eguchi K, Nakanishi S, Taoufiq Z, Takagi H, Takahashi T. Postnatal development of PIP2-dependent vesicle endocytosis at the calyx of Held. Neuroscience2011. 2011年11月12-16日. Washington D.C., USA.
5. Eguchi K, Nakanishi S, Takagi H, Takahashi T. Postnatal development of retrograde upregulatory mechanism of vesicle endocytosis at a fast synapse. 第34回日本神経科学大会, 2011年9月14-17日. 神奈川県横浜市.
6. Eguchi K, Nakanishi S, Taoufiq Z, Takagi H, Takahashi T. The role of postnatal development of PKG-dependent vesicle endocytosis at the calyx of Held. 第89回日本生化学会大会. 2012年3月29-31日. 長野県松本市.

〔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

江口 工学 (EGUCHI, Kohgaku)

沖縄科学技術大学院大学・細胞分子シナプ
ス機能ユニット・スタッフサイエンティス
ト

研究者番号：80470300

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：