2P173

蛍光相関分光法による神経軸索内輸送の測定

○武都 拓也^{1,2}、田村 守²、金城 政孝² (¹ 北大院理・生物学、² 北大・電子科学研・超分子)

蛍光相関分光法 (FCS) は、共焦点光学系により作られる微小領域 (< 10⁻¹⁵l) の中を出入りする分子の蛍光強度の揺らぎから得られる自己相関関数を解析することで、分子の数や拡散定数を求める単一分子レベルの検出法である。FCSは高い空間分解能を持ち、低濃度 (< nM) の分子も高感度で検出可能である。さらに光が持つ非侵襲的な性質を利用して、近年生体細胞内の分子間相互作用の解析にも有効であると考えられている。私たちはこれらの FCS の特徴を生かして神経軸索内輸送のメカニズムについての研究を行っている。本報告では、神経細胞内部の蛍光分子 (4-mer ペプチドおよび EGFP) の挙動から、ヤリイカ軸索神経内の物質の運ばれ方に関して検討した。

実験では、ヤリイカ巨大軸索神経を人工海水下で取り出し、蛍光分子を注入したのちに共焦点顕微鏡下で蛍光強度を測定、蛍光の揺らぎから得られた自己相関関数に対して最大3成分まで含む解析を行った。全ての測定において自己相関関数による解析を行ったところ、速い拡散定数 (10⁻⁶~10⁻⁸cm²/s) を持つ成分と遅い拡散定数 (< 10⁻⁸cm²/s) を持つ2つの拡散の成分が検出された。前者は、水溶液中で計測したペプチドやEGFPの拡散定数に対して2~3倍ほど小さくなっていた。この値は、今まで報告されてきた細胞質中での拡散定数に近い値を示していることから、速い成分は細胞質中での自由な拡散に由来することが示唆される。後者は、前者よりも10倍ほど動きにくく、見かけ上分子量が大きくなる様に観察された。またこの成分は分子(ペプチドやEGFP)の大きさに依存せず、一定の値を持っていたことから、軸索内で輸送に乗った複合物を見ているものと示唆される。またこの遅い拡散が輸送に乗っていると考えると、従来提唱されてきたタンパク質の輸送速度に比べてかなり速いスピードで輸送されている可能性が示唆された。

T.Muto, M.Tamura and M.kinjo : Measurement of axonal transport using fluorescence correlation spectroscopy

2P175

親和性の異なる2種類のNGF受容体の細胞内動態解析

○木曾 香奈子、中西 守、平嶋 尚英 (名古屋市・薬)

【目的】神経成長因子 (NGF) 受容体には、高親和性受容体である TrkA と低親和性受容体である p75 があり、神経細胞の分化、成長、維持からアポトーシスに至る多様な生理作用に関わっている。一方 p75 は TrkA に対する補助的な役割のほか、単独でシグナル伝達を担っている可能性も示唆されているが、未だその働きについては不明な点が多い。そこで本研究では、TrkA と p75 の細胞内分布と動態を観察し、NGF の作用との関わりを追究する。【方法】PC12細胞は TrkA と p75 の両方を発現しており、神経細胞の分化、成長や細胞死の研究に適した細胞である。本研究ではラットの TrkA と p75 をコードする DNA をスペクトル特性の異なる蛍光蛋白質 (yellow fluorescent protein; YFP, cyan fluorescent protein; CFP) の発現ベクターに組み込み、PC12細胞に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて単一細胞における NGF 受容体の細胞内分布と動態を観察、解析した。【結果】NGF で PC12 を神経細胞様に分化させる前後で観察を行なったが、いずれの場合も TrkA、p75 ともに細胞膜への均一な分布が見られた。TrkA、p75 を共発現させた場合も単独発現の場合と同様、細胞膜への一様な分布が見られたほか、TrkA 単独発現の場合よりも突起伸長が促進されることが確認された。また、神経様に分化した細胞では、軸索や成長円錐部分に TrkA、p75 の輸送顆粒が観察された。これらの動態及び分布と軸索の成熟の度合との関係についても報告する。

K.Kiso, M.Nakanishi and N.Hirashima : The analysis of intracellular dynamics of NGF receptors with different affinities

2P174

ニューロンの神経突起形成に対するアクチン結合蛋白質コフィリンの関与

戸島 拓郎¹、高橋 正行²、大日方 昂³、○伊藤 悦朗¹ (¹ 北大・院理・生物学、² 北大・院理・化学、³ 千葉大・理・生物)

本研究では、雑種神経細胞株 NG108-15 を用いて、ニューロンにおける神経突起形成を制御する細胞内シグナル伝達経路について解析した。NG108-15 は、細胞内 cAMP 濃度の上昇により神経細胞に分化することが知られている。まずはじめに、NG108-15 がジブチリル cAMP (DBcAMP) 処理によりたくさんの神経突起を伸長することを確認した。次に、DBcAMP の入った培養液に KCl を添加して細胞を培養したところ、有意に神経突起の数が減少した。この脱分極刺激による神経突起の退縮は、L 型電位依存性カルシウムチャネルの阻害剤であるニフェジピンと、カルシウム依存的脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの阻害剤であるシクロスポリン A によって抑制された。ところで、伸長中の成長円錐中には細胞骨格蛋白質であるアクチンが濃縮して存在しており、そのアクチンが盛んに重合・脱重合を繰り返すことで成長円錐の運動性が制御されている。そこで、次にわれわれはアクチン結合蛋白質の一つであるコフィリンのリン酸化状態を等電点電気泳動法を用いて調べた。その結果、コフィリンは DBcAMP 処理によってリン酸化され、脱分極刺激によって脱リン酸化されることが明らかになった。この脱分極刺激によるコフィリンの脱リン酸化は、シクロスポリン A 処理により抑制された。以上の結果から、神経突起の伸長と退縮は、それぞれ cAMP・カルシウムの下流でコフィリンがリン酸化・脱リン酸化を受けることで制御されている可能性が示された。

T. Tojima, M. Takahashi, T. Obinata and E. Ito : Involvement of cofilin phosphorylation in neuriteogenesis in a neuroblastoma x glioma hybrid cell line

2P176

Cd²⁺ のシナプス前末端内蓄積による自発放出頻度上昇

○鈴木 直哉、木島 博正 (名大院・理学・物理)

トノサマガエル神経筋シナプス標本を用いて、Cd²⁺ による MEPP (自発放出) 頻度の連続刺激後増強に関して調べた。Ca²⁺ を加えていないリンガー外液 (EGTA は入っていない、5mM Mg²⁺ を含む) で 100Hz で 5000 発の連続刺激を行なうと、刺激前に比べて MEPP 頻度が 20~30 倍程度に上昇した。この頻度上昇は連続刺激後に 2 分程度の減衰時定数で連続刺激前の頻度に戻っていった。このリンガー外液に 25 μM の Cd²⁺ をさらに加えて、同様の実験を行なったところ、連続刺激により刺激前に比べて MEPP 頻度は同様に 20~30 倍程度に上昇したが、この頻度上昇は連続刺激後に数十分経っても連続刺激前の頻度に戻らず、連続刺激前の頻度の 5~6 倍程度の頻度のままであった。次に、EGTA-AM であらかじめ処理し、シナプス前末端内に十分に EGTA を負荷しておいた標本において同様の実験を行なった。Cd²⁺ を加える前のリンガー外液では、EGTA を負荷していない標本の時とは同様の強度の MEPP 頻度増強が観察されたが、Cd²⁺ を加えた外液では、連続刺激による自発放出頻度増強は数倍程度にまで抑えられ、連続刺激後には刺激前の頻度レベルに 2 分程度の減衰時定数で戻っていった。これは昨年度の年会で報告した Ca²⁺ フリー外液中 (1mM EGTA, 5mM Mg²⁺ を含む) での連続刺激によるシナプス前末端への Mg²⁺ 蓄積による自発放出頻度上昇に対する Ca²⁺ チャネルブロッカー (*ω*-conotoxin GVIA) の効果と同じであった。EGTA は Cd²⁺ を非常に強くキレートすることから、連続刺激後に頻度が 5~6 倍程度に上昇したままになってしまうという現象は外液の Cd²⁺ が連続刺激によりシナプス前末端内に流入・蓄積することにより生じていると考えられる。当日は、蛍光色素によるシナプス前末端内の Cd²⁺ イメージング等の結果についても報告する予定である。

N.Suzuki and H.Kijima : Enhancement of MEPP frequency induced by the accumulation of Cd²⁺ in presynaptic terminals