3P225

神経細胞樹状突起における微小管依存的な RNA 結合タンパク質 SYNCRIP の輸送 -mRNA 顆粒の構成要素として-

○坂内 博子^{1,2}、深津 和美²、水谷 顕洋^{2,3}、夏目 徹⁴、家村 俊一郎⁴、池上 徹²、井上 貴文^{2,3}、御子柴 克彦^{1,2,3,5}（¹ 理研・脳センター・発生神経生物、² 東大・医科研・脳神経、³ 科技構・ICORP・カルシウム振動、⁴ 産総研・生物情報解析、⁵ NTT-IMSUT・神経情報）

記憶・学習の基礎となるシナプス可塑性の誘導には刺激に応じたシナプスの再編成が必要不可欠であるが、それに神経細胞樹状突起における局所的タンパク質合成が関与していることが近年明らかになってきた。核酸タンパク質複合体“mRNA 顆粒”は樹状突起への特定の mRNA の輸送を担い mRNA 翻訳の制御に関わっていると考えられているが、リボソームタンパク質など一部のタンパク質を除きその構成要素はほとんど明らかになっていない。本研究では、RNA 結合タンパク質 SYNCRIP (hnRNP Q1/NSAP1) が mRNA 顆粒の構成要素であることを示すデータを報告する。SYNCRIP は海馬の樹状突起に顆粒状で存在し、RNA と mRNA 顆粒の構成要素 EF1 α 、stau1 と共局在した。蛍光タンパク融合 SYNCRIP は、培養神経細胞樹状突起内を微小管依存的に約 0.05 μ m で両方向に輸送されていた。さらに、多波長リアルタイムビデオ顕微鏡法により、SYNCRIP が stau1 と IP₃ 受容体タイプ 1 の mRNA と同じ顆粒で輸送されることも明らかにした。SYNCRIP は非神経細胞においては *c-jun* の mRNA を安定化するタンパク質複合体の一員であると報告されており、神経細胞樹状突起においても mRNA の安定化、さらにはシナプス可塑性の制御に関わっている可能性が考えられる。HEK293EBNA 細胞における、SYNCRIP と相互作用するタンパク質のプロテオミクス解析の結果も併せて報告する。

H. Bannai, K. Fukatsu, A. Mizutani, T. Natsume, S. Iemura, T. Ikegami, T. Inoue, K. Mikoshiba : An RNA-interacting protein, SYNCRIP (hnRNP Q1/NSAP1), is a component of mRNA granules transported on microtubules in neuronal dendrites

3P227

カエル神経筋接合部における連続刺激による Ca²⁺ 非依存性の神経伝達物質放出増大機構の解明

○平田 伸幸¹、豊田 正嗣^{1,2}、鈴木 直哉¹（¹ 名大院・理・物理、² 名大院・医・細胞情報医学）

カエル神経筋接合部において Ca²⁺ 非存在下での高頻度刺激が自発放出頻度 (MEPP 頻度) を増大させると報告されてきた。本研究室において、このプレシナプス過程での活性化が終板電位 (EPP) にも影響するかを細胞内記録法、及びイメージング法で検証し、以下のことを報告してきた (03' 生物物理学会)。細胞外を Ca²⁺ フリーリンガー (0.2mM EGTA, 5mM Mg²⁺, pH 7.4) とし、高頻度刺激 (100Hz, 50 秒) を与えた。高頻度刺激前後に、局所的に測定シナプスに 0.9mM Ca²⁺ を吹きかけ、0.25Hz のテスト刺激で EPP を起こした。高頻度刺激中は細胞外に Ca²⁺ が存在していないにも関わらず、刺激前に比べ刺激後は EPP が約 5 倍増加し、130 秒程度の減衰時定数で刺激前のレベルに戻った。さらに、この可塑性は細胞内 Ca²⁺, Mg²⁺ に非依存的で、刺激回数に依存的であることが分かっている。この可塑性の分子機構を探るべく、PKA の阻害剤である H-89、活性化剤である forskolin を投与したが効果はなかった。一方、カゼインキナーゼ 2 の阻害剤である DRB を投与したところ、約 40% 抑制された。よって、この可塑性機構の活性化にカゼインキナーゼ 2 が部分的に寄与している可能性が高い。現在、DRB よりも更に特異性の強い阻害剤 (emodin, apigenin) の効果についても検証中である。一方、高張溶液が Ca²⁺ 非依存的に MEPP 頻度を増大させるという報告がある。我々の見出した可塑性機構が高張溶液による増強機構と関連性があるか、特にそのシグナル伝達の下流にある細胞接着分子であるインテグリンの関与の有無について報告する。

N. Hirata, M. Toyota, N. Suzuki : Analysis of tetanus-induced Ca²⁺-independent short term enhancement of EPP at th frog neuromuscular junction

3P226

神経刺激時のシナプス前末端内 Ca²⁺ 上昇とミトコンドリアの活性化

○鈴木 直哉、平田 伸幸（名大院・理学・物理）

カエルの神経筋接合部シナプスにおいて、1.8mM Ca²⁺ を含む正常リンガー中で 100Hz の高頻度刺激を数秒間行った場合には、シナプス前末端内の Ca²⁺ 濃度上昇が 2 相性で生じ、初めの 0.2 秒程度で急激な上昇が起き、その後はゆっくりとした上昇になることを我々はすでに報告している (S. Suzuki et al, Pflügers Arch 2000 440:351)。しかし、この報告の時には、高親和性の Ca²⁺ 感受性色素を使用しており、数 μ M 程度以上での Ca²⁺ 濃度の定量性にやや問題があった。そこで、低親和性の Ca²⁺ 感受性色素 (Oregon Green 488 BAPTA 6F, K_d = 13 μ M at 21 °C pH=7.2) を使用し定量的な解析を行った。その結果、初めの 0.2 秒程度の急激な Ca²⁺ 上昇は 3.5 μ M / 秒程度の上昇 rate で、その後のゆっくりとした上昇の rate は 0.2 μ M / 秒程度であった。Rotenone と oligomycin でミトコンドリアを阻害すると、初めの 0.2 秒程度の急激な Ca²⁺ 上昇の rate はあまり変化せず、その後の上昇 rate は 2 μ M / 秒程度と阻害前の 10 倍となり、シナプス前末端内の Ca²⁺ 除去機構へのミトコンドリアの寄与が再確認された。さらに、TMRE (Tetramethylrhodamine ethyl ester) を用いてミトコンドリアの活性化の可視化を行った。TMRE で数時間処理すると神経末端と筋細胞のミトコンドリアが染色され、連続刺激中に神経末端の TMRE の蛍光の増加が見られた (筋細胞の TMRE の蛍光は刺激しても不変)。これは、ミトコンドリアが活性化された (ミトコンドリアの膜電位が深くなった) ことを示す。ミトコンドリアは刺激開始後 1 秒程度かかっている活性化状態に移行し、刺激終了後 3 ~ 4 秒程度で活性化状態から戻った。ミトコンドリアの活性化は連続刺激の初めの 0.2 秒程度の急激な Ca²⁺ 上昇より遅く、活性化状態からの戻りも連続刺激終了直後の 0.5 秒程度の急激な Ca²⁺ 濃度減少より遅かった。前末端内の Ca²⁺ 動態とミトコンドリアの活性化について議論する。

N. Suzuki and N. Hirata : Tetanus induced Ca²⁺ increase and activation of mitochondria in presynaptic terminals

3P228

遺伝子ノックダウンと行動解析によるホヤ重力感受遺伝子の同定

○津田 基之¹、有銘 預世布¹、稲田 京子¹、櫻井 大介¹、堀江 健生¹、日下部 岳広¹、香村 芳樹²、大月 恒³（¹ 兵庫県大院・生命理、² JASRI、³ 大分大）

ホヤは無脊椎動物であるがヒトと同じボディープランをもつ原索動物である。ホヤ幼生の脳胞の 2 つの黒色素胞のうち、前者が重力を感じする平衡器、後者が光受容器であることをレーザー細胞破壊、行動解析により明らかにした。黒色素メラニンを合成するチロシナーゼ遺伝子を欠損すると、ヒトでは聴覚障害が生じる。チロシナーゼ遺伝子をノックダウンしたホヤ幼生の行動解析により、これが重力感受遺伝子であることを明らかにした。聴覚研究は他の感覚器と比べて著しく遅れていたが、ヒトゲノムの解読終了にともない分子生物学的研究が進み、聴覚異常の原因遺伝子が約 50 示された。我々はこれらの結果をもとに、ホヤゲノムのデータ・ベースを検索し、現在数種のホヤ重力感受遺伝子の解析を進めている。特にヒトの内耳の有毛細胞に局在する電位発生モーター・タンパク質である Prestin 遺伝子、ステレオシリアを繋ぐ先端糸の主成分 CD23 遺伝子、機械刺激感受性イオンチャネル TRPM 遺伝子の相同遺伝子がホヤゲノムで見いだしており、その遺伝子発現、タンパク質の局在のプローブを作成している。これらの結果をもとに、微小重力環境でホヤの発生過程で重力感受遺伝子およびその遺伝子産物の発現がどの様に影響を受けるかを明らかにする。

M. Tsuda, Y. Arime, K. Inada, D. Sakurai, T. Horie, T. Kusakabe, Y. Kohmura and H. Ohtsuki : Identification and characterization of gravity sensing genes by gene knockdown and behavioural analysis