

神経伝達物質の放出機構における細胞骨格系蛋白質の役割

Role of cytoskeleton in the mechanism of exocytosis in adrenal chromaffin cells

代表研究者 上智大学・生命科学研究所・助手 今泉 美佳
Assistant, Life Science Institute, Sophia University
Mica OHARA-IMAIZUMI

Previously, we have reported that myosin light chain kinase (MLCK) plays an essential role in ATP-dependent priming of Ca^{2+} -induced exocytosis in adrenal chromaffin cells, suggesting that actin-myosin interaction is involved in the priming of exocytosis in these cells. To further clarify the implication of actin-myosin interaction in the mechanism of exocytosis, we studied effects of a novel actin depolymerizing agent, Mycalolide B (MLB) and Cytocharasin D (CD) on the organization of the cortical F-actin, on Ca^{2+} -induced catecholamine (CA) release from digitonin-permeabilized cells, and on the kinetics of CA release from intact adrenal chromaffin cells by use of the real-time monitoring technique. MLB, that is known to inhibit actin-activated myosin Mg^{2+} -ATPase, depolymerized the cortical F-actin and inhibited ATP-dependent release from digitonin-permeabilized cells. MLB changed the kinetics of CA release from intact cells: the half decay time of the secretory response to a persistent stimulation with acetylcholine (ACh) was shortened, and the decay of the response to repetitive stimulation was accelerated in MLB-treated cells. These effects of MLB on the kinetics of CA release was quite similar to the effects of the specific inhibitor of MLCK, wortmannin (WT). On the other hand, CD that affects organization of the cortical F-actin but does not interfere that actin-myosin interaction had no effect on the kinetics of CA release, though the cortical F-actin was apparently disrupted. These results, together with our previous findings, suggest that cortical F-actin and the actin-myosin interaction are important for ATP-dependent priming of exocytosis. The results also suggest that the impairment of ATP-dependent priming reduces the recruitment of the secretory vesicles to releasable pool and consequently affects the kinetics of the physiological response.

研究目的

シナプスでの情報伝達は、シナプス小胞に貯蔵されている神経伝達物質が開口放出によってシナプス前部からシナプス間隙に放出されることにより行われている。神経細胞の主要なアウトプットであるこの開口放出機構の解明は、脳の機能を分子レベルで理解するために非常に重要な課題である。ここ数年開口放出機構解明に向けて急速に研究が進んでおり、この機構に様々な蛋白質が関わっていることがわかってきたが、未だ不明な点が多い。

我々は最近、伝達物質放出のモデル系である高透過性副腎髄質クロマフィン細胞を用いた実験により、開口放出機構のうち、特に分泌顆粒を放出可能な状態にするプライミング過程にミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)が必須であることを明らかにし、細胞骨格系、アクチン-ミオシン相互作用が開口放出のプライミング過程に重

要な役割を持つことを示唆している。そこで本研究ではこのアクチン-ミオシン相互作用及びアクチンフィラメントの役割を明確にするために、主にそれらの阻害物質で処理を行ったクロマフィン細胞を用いて、高透過性細胞および正常細胞からのカテコールアミン放出の測定解析を行い、組織化学実験結果との関連を検討した。さらに、これらの実験結果に基づき、開口放出機構における細胞骨格系蛋白質の役割の考察を行った。

研究経過

アクチン-ミオシン相互作用及びアクチンフィラメントの役割を明確にするために、以下の阻害物質で処理を行った細胞を主に用いて、カテコールアミン放出実験及び組織化学実験を行った。

① Mycalolide B (MLB) : アクチンフィラメント

を切断し、モノマーと結合してこれを隔離し、アクチンを脱重合させる働きを持つ²⁾。結果としてアクチンフィラメントをモノマーに解離させ、アクチン-ミオシン相互作用を阻害する。

② Cytochalasin D (CD)：アクチンフィラメントのberbed endをcappingすることで脱重合させる一方、アクチン重合の核となるアクチンオリゴマーに結合して、核化を促進させる。結果として短いアクチンフィラメントの形成を促進させる働きを持つ。短いアクチンフィラメントはミオシンと相互作用ができるので、アクチン-ミオシン相互作用は阻害しない²⁾。

③ Wortmannin (WT)：ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK)の特異的阻害剤。MLCKを阻害することでミオシンのリン酸化を阻害し、その結果、アクチン-ミオシン相互作用を阻害する。

クロマフィン細胞は牛副腎髄質から調製し、10%牛胎児血清を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium中で単層培養または浮遊培養し、培養4~10日の細胞を実験に用いたり。各実験前に、培養液をLocke's溶液に置き換え、37℃の条件下、各阻害物質存在下でpreincubation (MLBの場合は1h, CD, WTの場合は30min)を行った。

(1)高透過性細胞系を用いたカテコールアミン放出実験：界面活性剤(digitonin)処理により高透過性化したクロム親和細胞系では、細胞外液にCa²⁺、MgATPを添加することで開口放出が引き起こされ、またdigitoninによる形質膜の孔は蛋白質分子や抗体を通わせる事ができるので、直接に細胞内環境をコントロールすることができ、開口放出機構の研究には非常に有効である。また、高透過性細胞による研究により、開口放出機構は2過程、すなわち1)放出可能な状態へ分泌顆粒を準備する顆粒の供給過程 (MgATP依存性プライミング過程) と、2)放出可能な状態に準備されている顆粒からCa²⁺によって直ちに引き起こされる開口過程 (Ca²⁺依存性開口過程) から成ることが明らかになっており、高透過性細胞系はこれら2過程を区別して研究することができる³⁾。本研究では、阻害物質処理を行った高透過性細胞を用いて、カテコールアミン放出の変化を測定解析し、アクチン-ミオシン相互作用およびアクチンが2過程に果たす役割を調べた。

(2)組織化学実験：上記の高透過性細胞からのカテコールアミン放出測定実験に並行して、細胞膜直下のアクチンフィラメントの動態変化を共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いた蛍光組織化学実験(Rhodamine-Phalloidin染色)により測定解析

し、カテコールアミン放出測定実験との関連を考察した。

(3)正常細胞を用いた生理的なカテコールアミン放出動態測定：正常細胞からの伝達物質放出動態測定法として、細胞外液灌流系と電気化学検出器を組み合わせたリアルタイムモニタリング法を我々はすでに確立している⁴⁾。阻害物質処理を行った正常細胞からの放出動態解析を行い、高透過性細胞で得られた結果との関連を考察することにより、正常細胞からの生理的放出におけるアクチン-ミオシン相互作用およびアクチンフィラメントの役割を検討した。

研究成果

図1に示したように、Rhodamine-Phalloidin染色による細胞内アクチンフィラメントの観察を行うと、Control細胞では細胞膜直下にリング状に濃いアクチン層の蛍光染色が観察された。In vitro実験でアクチンフィラメントをモノマーに解離させる作用が報告されているMLB²⁾で処理した細胞では、細胞膜直下のアクチン層の切断・消失が濃度依存性に観察された。アクチンフィラメントを短い断片とするCDで処理した細胞では、濃度依存性にアクチン層の切断が観察されたが、顕著な消失は観察されなかった。

MLBおよびCDの分泌への影響を調べるために、まずMLBおよびCD処理した正常クロマフィン細胞にアセチルコリン刺激を行い、カテコールアミン放出を調べた。その結果、アクチン-ミオシン相互作用を阻害するMLB処理細胞では、濃度依存性にカテコールアミン放出が抑制されたが、アクチン-ミオシン相互作用を阻害しないCD処理細胞では影響が見られなかった。MLBが開口放出機構の2過程のうち、プライミング過程と開口過程のどちらの過程を抑制しているのかを調べるために、高透過性細胞からのCa²⁺依存性カテコールアミン放出のタイムコースに及ぼすMLBの影響について検討した。高透過性細胞からのCa²⁺依存性カテコールアミン放出のタイムコースでは、まず放出可能な状態にプライミングされた顆粒からCa²⁺依存性に1.5分以内の速い放出が起こる (図2)。この放出はATP存在下でも、非存在下でも共通して見られるのでATPを必要としない放出である。一方、Ca²⁺刺激開始2分後以降からATP存在下のみ持続的に放出が観察される部分はATP依存性プライミングによって維持されている放出と考えることができる。図3に示したように、MLB処理を行った高透過性細胞では、MLCK阻害を介してアクチン-ミオシン相互作用を阻害するWTと同様に、プライミングにより維持されている

ATP依存性放出が選択的に濃度依存性に抑制された。これらの結果は、アクチン-ミオシン相互作用とアクチンフィラメントが開口放出機構のプライミング過程に重要な役割をもつことを強く示唆している。

これらアクチン-ミオシン相互作用を阻害し、プライミングを抑制するMLB, WTを用いて、正常細胞からのカテコールアミン放出動態を検討したところ、これらの阻害物質により、放出応答の持続が阻害され、また繰り返し刺激に対する放出応答の急激な減衰が観察された(図4)。一方、プライミングに影響を及ぼさないCD処理細胞では、放出応答に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、プライミング過程とは正常細胞からの生理的な放出においては、放出応答持続のため、また繰り返し応答するために必要な過程であることが示唆され、高透過性細胞の研究から見出されているプライミング過程の生理的意義が明らかとなった。

開口放出におけるアクチンに関するこれまでの報告によると、クロマフィン細胞の形質膜直下には膜と並行に走るアクチンネットワークが遍在しており、このネットワークは顆粒が膜へ接近することを妨げるバリアーとなっているという仮説⁵⁾が提唱されており、開口放出に伴ってネットワークの脱重合が観察される。形質膜直下にはCa²⁺依存性アクチンフィラメント切断蛋白質、Scinderin, Gelsolinが存在しており、開口放出に伴うアクチンフィラメントと同じ局在変化を示す⁶⁾。

しかしながら、今回の実験結果は、このアクチンをバリアーとする仮説では説明できない。MLB処理細胞ではアクチンフィラメントが切断されているにも関わらず、プライミング阻害による開口放出が阻害されている。すなわち、バリアー以外のpositiveな役割を果たすアクチンフィラメントが開口放出には必要であり、アクチン-ミオシン相互作用を介してプライミングを可能にさせる重要な役割を担っていることが考えられる。なお、活性化したScinderin, Gelsolinは切断、capping機構によりアクチンフィラメントをミオシンと相互作用しやすい長さにすることがin vitro実験により報告されている。プライミング過程において適度に切断されたアクチンフィラメントが活性化ミオシンと相互作用を持つことが推察される。

文献 1) Kumakura, K., Sasaki, K., Sakurai, T., Ohara-Imaizumi, M., Misonou, H., Nakamura, S., Matsuda, Y., and Nonomura, Y. (1994) *J. Neurosci.*, 14, 7695-7703. 2) Saito, S., Watabe, S., Ozaki, H., Fusetani, N., and Karaki, H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 29710-29714. 3) Bittner, M.A. and Holz, R.W. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 16219-16225. 4)

Kumakura, K., Ohara, M., and Sato, G.P. (1986) *J. Neurochem.*, 46, 1851-1858. 5) Aunis, D., & Bader, M.-F. (1988) *J. Exp. Biol.*, 139, 253-266. 6) Trifaro, J.M., Vitale, M.L., Rodriguez Del Caxtillo, A. (1993) *J. Physiol.*, 87, 89-106.

今後の課題と発展

(1) 開口放出機構における細胞骨格系による調節系と他の因子 (SNARE蛋白質、フュージョン蛋白質、GTP結合蛋白質など) による調節系との相互関係を明らかにし、開口放出機構をさらに明確にしていく。特に、開口放出機構のCa²⁺センサーとしての重要な役割を果たしている小胞膜蛋白質シナプトタグミンとの関係をまず明らかにしていく予定である。

(2) 共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いた組織化学的手法により、蛍光ラベルした分泌顆粒とアクチン、ミオシンの開口放出中の変化を測定し、カテコールアミン放出実験結果との関連を考察する。

(3) クロマフィン細胞の研究により得られた知見は、神経終末からの伝達物質放出機構に共通すると考えられるため、中枢由来の培養神経細胞からの伝達物質放出における細胞骨格系の役割について比較検討を行う。

この開口放出機構を明確にすることは、脳の機能を分子レベルで理解するために非常に重要な課題である。細胞骨格系の役割を継続してさらに明らかにしていくことは、開口放出機構解明の大きな進展につながる。

発表論文リスト

1. 今泉美佳, 御園生裕明, 池田顕, 熊倉鴻之助 (1995) 開口放出機構におけるアクチン・ネットワークの役割, *神経化学*, 34, 296-297
2. 今泉美佳, 熊倉鴻之助 (1995) 高透過性細胞を用いたエクソサイトーシスの解析, *実験医学*, 別冊, 脳・神経研究プロトコール, 羊土社 pp.165-174
3. Ohara-Imaizumi, M., Fukuda, M., Niinobe, M., Misonou, H., Ikeda, K., Murakami, T., Kawasaki, M., Mikoshiba, K., and Kumakura, K. (1995) Distinct roles of C2A and C2B domains of synaptotagmin in the regulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *New Aspects of Molecular Neurosecretory Mechanisms; the Abstracts of Satellite Symposium of 15th ISN Meeting*, 125-126.
4. Kumakura, K., Ohara-Imaizumi, M., Sakurai, T., Mochida, S., Misonou, H., Kobayashi, H., and

Nonomura, Y. (1995) The role of myosin light chain kinase, myosin II, and F-actin in regulated exocytosis. *New Aspects of Molecular Neurosecretory Mechanisms; the Abstracts of Satellite Symposium of 15th ISN Meeting*, 88-90.

5. 今泉美佳 (1996) 開口放出機構とシナプトタグミン (ミニレビュー), *神経化学*, 35, 34-40

6. 村上猛, 今泉美佳, 御園生裕明, 川崎雅一, 若井豪, 熊倉鴻之助 開口放出機構におけるアクチン・ネットワークとアクチン-ミオシン相互作用の役割, *神経化学*, 35, 518-519

7. Mica Ohara-Imaizumi, Mitsunori Fukuda, Michio Niinobe, Hiroaki Misonou, Ken Ikeda, Takeshi Murakami, Masakazu Kawasaki, Katsuhiko Mikoshiba and Konosuke Kumakura. (1996) Distinct Roles of C2A and C2B Domains of Synaptotagmin in the Regulation of Exocytosis in Adrenal Chromaffin Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (投稿中)

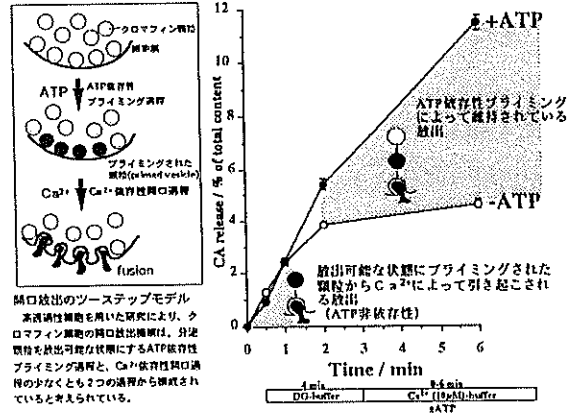


図2. 高透過性細胞からのカテコールアミン放出のタイムコース

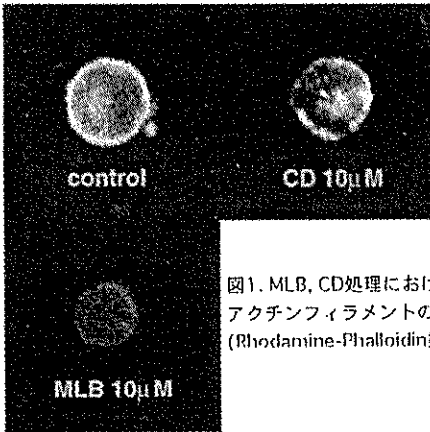


図1. MLB, CD処理におけるアクチンフィラメントの変化 (Rhodamine-Phalloidin染色)

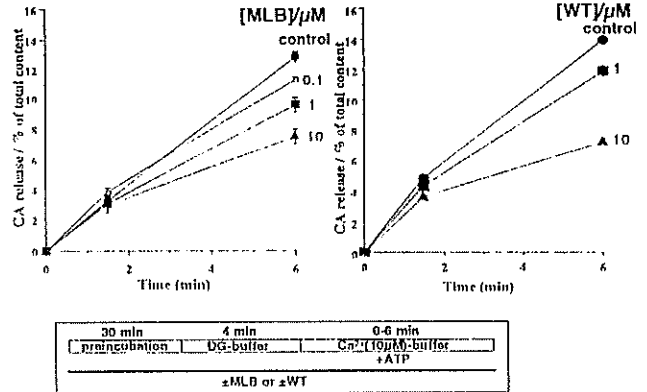


図3. 高透過性細胞からのCa²⁺依存性カテコールアミン放出のタイムコースに及ぼすMLBとMLCK阻害剤 Wortmannin (WT)の作用

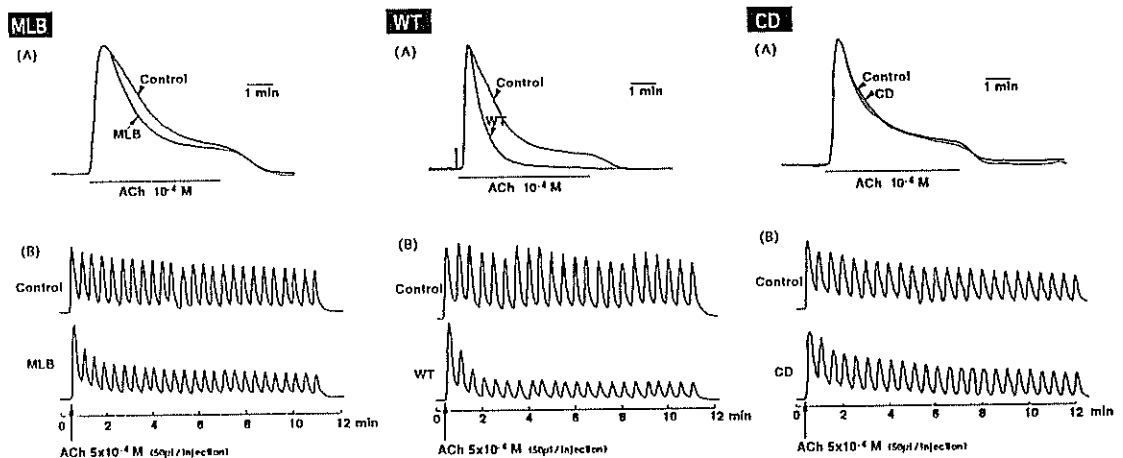


図4. 正常細胞からのカテコールアミン分泌動態に及ぼすMLB, CD およびMLCK阻害剤 Wortmannin (WT)の作用 (リアルタイムモニタリング法による測定)

(A) 10⁻⁴ M AChの持続刺激(5分間)に対する分泌応答に及ぼす作用

(B) 5x10⁻⁴ M AChの繰り返しパルス刺激(30秒毎, 10分間)に対する分泌応答に及ぼす作用