



# Localization of synaptotagmin in the Regenerating Sprouts Emanating from the Nodes of Ranvier

上原, 香

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1495

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001495>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	うえ はら かおり 上 原 香	（大阪府）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1021号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成8年3月31日	
学位論文題目	Localization of synaptotagmin in the Regenerating Sprouts Emanating from the Nodes of Ranvier （ランヴィエ絞輪部から発芽した再生神経におけるシナプトタグミンの局在について）	
審査委員	主査 教授 水 野 耕 作 教授 岡 村 均 教授 藤 原 美 定	

## 論文内容の要旨

### 〔緒言〕

末梢有髄神経では、中心の軸索がその周囲を幾重ものミエリン鞘に覆われており、その外側にシュワン細胞の細胞質が存在し、最外側を基底膜で包まれている。ランヴィエ絞輪部はミエリン鞘とシュワン細胞の裂隙であるが、基底膜は絞輪部でも連続しており、有髄神経の最外側を途切れることなく包んでいる。外力により有髄神経が損傷されると、まず損傷部より近位のランヴィエ絞輪部に小胞が集積し、同部の軸索形質膜が膨化し、さらには突出して再生神経となる。再生神経は基底膜に接触した後はそれを足場として、基底膜とシュワン細胞形質膜の間を伸長していく。

再生神経はその伸長に際して再生神経の本幹が伸びるのではなく、一番遠位端部の成長円錐と呼ばれる部分に膜成分が付加され、その膜成分が伸長した分の表面膜として用いられると考えられている。成長円錐は、無構造な細胞基質の中に大小様々な小胞、多胞小体、被覆小胞などを多数含むのが特徴である。

*in vitro*の実験では、成長円錐内部に豊富に存在する小胞が表面膜に $\text{Ca}^{2+}$ 依存性に融合し、表面膜の拡大を惹起するという報告があるが、膜融合に関与する分子の詳細はいまだ不明である。

シナプトタグミンは分子量65000のシナプス小胞膜蛋白で、シナプスにおける $\text{Ca}^{2+}$ 依存性開口分泌に関与すると考えられている。したがって我々はシナプトタグミンの再生神経における局在を解析し、末梢神経再生機能における役割を明らかにする目的で本実験を行った。

### 〔対象と方法〕

#### (1) 神経の損傷

今回の実験では体重200-250 gのSprague-Dawley種のラット牝成獣を使用した。ラットはネンブタール（体重1 kgあたり50mg）を腹腔内に注入して麻酔し、左坐骨神経を露出して大腿部中央の高さで1-0絹糸を用いて結紮した。結紮から24時間後に再度ネンブタール（体重1 kgあたり50mg）による腹腔内麻酔下に結紮糸を解放した。さらに24時間後エーテル麻酔下に、固定液として2%

paraformaldehydeと8% sucroseを含む0.15M NaCl in 20mM Sodium phosphate Buffer at pH7.5 (PBS) を用いて、心血管系灌流を行なった。結紮損傷を加えた部分の近位部から遠位部まで含めて坐骨神経を摘出した。

以下の操作はすべて4℃の条件下で行なわれる。

灌流液にて4時間浸漬固定の後、徐々に濃度を上げたsucroseを含むPBSにて浸漬固定を行なった。これを、Embedding Medium for Frozen Tissue Specimens (OCTコンパウンド) 中に包埋して瞬間凍結したあと、クリオスタットを用いて15μmの厚さの切片に薄切した。切片をスライドガラス上にマウントした後、anti-synaptotagmin mAb (1 μg/ml) を用いて48時間反応させ、Horseradish-peroxidase (HRP) 免疫染色した。

## (2) 光学顕微鏡観察

組織切片をPBSで洗浄後、anti-Mouse IgG Abと反応させ1% glutaraldehydeを含有するPBSで固定した後、0.03% 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB液) と反応させ、0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えた同液で反応を停止させた後、光学顕微鏡で観察した。

## (3) 電子顕微鏡観察

光学顕微鏡にて観察した切片を2% OsO<sub>4</sub>, 0.1M Sodium cacodylate bufferを用いてオスミウム染色し、徐々に濃度を上げたエタノール及びn-Butylglycidyl ether (QY-1) にて脱水処理しEpon 812樹脂で包埋した。これをLKB Ultratomeにて50nmの厚さの超薄切片に薄切して、JEOL 100S X電子顕微鏡にて観察を行なった。

対照群として、anti-synaptotagmin mAbの代わりにnon-immunemouse IgGを用いたものを同様に光学顕微鏡、電子顕微鏡で観察した。

## 〔結果〕

光学顕微鏡所見：結紮部は坐骨神経にくびれた部分として残っていた。同部より近位の部分では、多数の細い糸状のシナプトタグミン免疫反応が遠位の部分に向かって伸びているのが認められた。これらの免疫反応は結紮部より2mm以内の範囲に特に多く存在した。これらは損傷に反応したランヴィエ絞輪部から伸びてきた再生神経と思われる。強拡大では、絞輪部から細い糸状の免疫反応が親軸索の表面に沿って、近位側と遠位側の両方に向かって伸びていた。

電子顕微鏡所見：同一の神経内から様々な軸索の再生段階の所見が得られた。これは損傷部からの距離などの条件によって、各ランヴィエ絞輪部の損傷に対する反応に差が生じるためと思われる。

再生の最初の段階では、軸索のランヴィエ絞輪部に小胞が集積する。この時小胞の周囲にシナプトタグミンの免疫反応が認められた。絞輪部から発芽した再生神経は基底膜とミエリン鞘の間の空間を近位側と遠位側の両方に向かって伸びていたが、このように長く伸びた再生神経の先端部は小胞や空胞、ミトコンドリアなどを豊富に含む典型的な成長円錐の形態を示し、その小胞や空胞の周囲、あるいは形質膜表面などにシナプトタグミン免疫反応が認められた。だが、再生神経が親軸索へとつながる根幹部は細胞骨格に富むが小胞は少なく、細胞質にも形質膜表面にも免疫反応はほとんど認められなかった。

なお、正常坐骨神経では、シナプトタグミンの免疫反応は特に認められなかった。

## 〔考察〕

最近、シナプス小胞の開口分泌では、小胞膜のシナプトタグミンが他のシナプス膜融合関連蛋白と

複合体を形成し、シナプス前膜の $\text{Ca}^{2+}$ に結合して、シナプス前膜と小胞の膜融合を誘導する事が明らかになった。また、シナプトタグミンを除去したマウスでは、正常マウスと比較して、 $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性の神経伝達物質放出は変化がないのに対して、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の神経伝達物質放出は著明に減少する事も分かっている。これらの報告は、シナプトタグミンがシナプスの伝達物質放出を惹起するための $\text{Ca}^{2+}$ センサーとして機能している可能性を示唆するものである。

今回の実験でシナプトタグミンは、ランヴィエ絞輪部から発芽した再生神経の小胞や空胞、形質膜に、初期から十分に伸長した後までずっと存在することが明らかになった。さらに、伸長した再生神経ではシナプトタグミンは先端の成長円錐に特に強い集積を示した。したがって、シナプトタグミンに免疫反応を示す小胞や空胞は成長円錐の表面でおこる膜付加に関係し、シナプトタグミンは小胞・形質膜間の $\text{Ca}^{2+}$ 依存性膜融合の調節因子として機能している可能性が高い。

*in vitro*では、成長円錐には表面膜の供給源もしくは酵素放出のため多種多様な小胞や空胞が充満している。成長円錐における $\text{Ca}^{2+}$ 依存性膜融合に関与する分子の特定にはいまだ至っていないが、形態学的には、直径約150nmの澄明な空胞が形質膜に付加されることが分かっている。しかし*in vivo*での再生神経における膜の供給源や膜付加のメカニズムは明らかになっていない。

今回の実験により、神経再生の初期では再生神経と親軸索の絞輪部にシナプトタグミンを含む小胞が存在し、一方、長く伸長した再生神経では、シナプトタグミンはその先端の成長円錐に強い集積を示すという結果が得られた。成長円錐はシナプトタグミンに免疫反応を示す小胞が充満していたが、根幹部にはほとんどシナプトタグミンの局在は認められなかった。このことから、伸長した再生神経では、根幹部の形質膜のシナプトタグミンが再び小胞に回収されて選択的に成長円錐に運ばれ、膜融合を調節する機能を司っている可能性が考えられる。

今回の実験結果は*in vivo*での末梢有髄神経再生においてシナプトタグミンが重要な役割を果たしていることを示唆するものであり、今後、神経再生のメカニズムを解明していく上で大きな足掛かりになるものと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

### はじめに

有髄神経が損傷されると、損傷部より近位のランヴィエ絞輪部から再生神経が生じる。しかし、再生神経は本幹が伸長するのではなく、最も遠位端にある成長円錐と呼ばれる部分で成長する。この際、成長円錐では多量の表面膜が必要となる。*in vitro*では成長円錐内部の小胞が表面膜に $\text{Ca}$ イオン依存性に融合して表面膜になるといわれるが、膜融合に関与する分子の詳細は不明である。シナプトタグミンはシナプス小胞膜蛋白の一種で、シナプスの伝達物質の放出を惹起するための $\text{Ca}$ イオンセンサーとして機能していると考えられている。本研究者はシナプトタグミンの再生神経における局在を解析し、末梢神経の再生機能における役割を明らかにする目的で本研究を行った。

### 方法と材料

体重200から250 gのDawleyラットを使用し、坐骨神経を結紮損傷し、24時間後に結紮糸を解放した。その24時間後に屠殺し、坐骨神経を摘出した。瞬間凍結した後に、anti-synaptotagminに48時間反応させてHorseradish-peroxidase (HRP) 免疫染色した。その後、光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡にて観察した。

### 結果

光学顕微鏡所見：シナプトタグミン免疫反応は結紮部より2mm以内の範囲に特に多く存在した。これらは損傷に反応したランヴィエ絞輪部から伸びてきた再生神経と思われた。

電子顕微鏡所見：再生の初期の段階では、軸索のランヴィエ絞輪部に小胞が集積するが、その周囲にシナプトタグミンの免疫反応が認められた。絞輪部から発芽した再生神経は基底膜とミエリン鞘の間隙を近位と遠位の両方向へ伸びる。再生神経の先端部は成長円錐の形態を示し、シナプトタグミン免疫反応が認められた。

なお、正常の坐骨神経では、シナプトタグミンの免疫反応は特に認められなかった。

#### 考察

シナプトタグミンは、ランヴィエ絞輪部から発芽した再生神経の小胞、空胞あるいは形質膜に再生初期のみならず十分に伸長した時期までもずっと存在することが明らかになった。さらに先端の成長円錐に特に強い集積を示した。このことは、根幹部の形質膜のシナプトタグミンが再び小胞に回収されて選択的に成長円錐に運ばれ、膜融合を調節する機能をつかさどっている可能性が考えられた。

#### 結語

本研究は未だ不明な点の多い再生神経の機序について研究したものである。再生神経が伸長していくには、膜融合が必要であるが、その解明に、従来あまり行われていないシナプトタグミンの局在を研究し、この物質が膜融合に重要な役割を果たしていることを明らかにした点において、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。